



HAL
open science

Développement instrumental en spectrométrie de masse pour le diagnostic in vitro en microbiologie clinique

Arnaud Vernier

► **To cite this version:**

Arnaud Vernier. Développement instrumental en spectrométrie de masse pour le diagnostic in vitro en microbiologie clinique. Autre. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10010 . tel-00986856

HAL Id: tel-00986856

<https://theses.hal.science/tel-00986856>

Submitted on 5 May 2014

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.

N° d'ordre : 010-2014

Année 2014

THÈSE DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

ÉCOLE DOCTORALE DE PHYSIQUE ET D'ASTROPHYSIQUE

DIPLÔME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 16 janvier 2014

par

M. VERNIER Arnaud

Développement instrumental en spectrométrie de masse pour le diagnostic *in vitro* en microbiologie clinique

Directeur de thèse : Philippe Dugourd

JURY :	M. Gérard Bolbach	<i>Rapporteur</i>
	M. Jean-Philippe Charrier	<i>Examineur</i>
	M. Philippe Dugourd	<i>Directeur de thèse</i>
	M. Jérôme Lemoine	<i>Co-directeur de thèse</i>
	M. Serge Martin	<i>Examineur</i>
	M. Christian Rolando	<i>Rapporteur</i>

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Études et de la Vie
Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles
Mérieux

Directeur : Mme le Professeur C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme le Professeur C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en
Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DÉPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Département GEP

Directeur : M. N. SIAUVE

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : Mme S. FLECK

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme le Professeur I. DANIEL

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et
Sportives

Directeur : M. C. COLLIGNON

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

École Supérieure de Chimie Physique Électronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Administrateur provisoire : M. N. LEBOISNE

Remerciements

S'il est une chose qu'il est difficile de rédiger ce sont bien des remerciements. Non parce qu'il n'y a personne à remercier mais bien parce que trop de monde doit avoir droit à son merci, à son souvenir ému ou à son commentaire impertinent. Cela est particulièrement vrai en ce qui concerne cette thèse car elle doit beaucoup à beaucoup de personnes qui ont toutes contribué à faire de ces trois années de recherche trois années mémorables.

Je souhaiterais commencer par remercier Mme Christine M'Rini de l'Institut Mérieux sans qui rien de cela n'aurait été possible. Et, puisque j'ai commencé mes remerciements – bien arbitrairement je dois l'avouer – par le côté bioMérieux de la filiation de cette thèse, autant poursuivre dans cette voie. Je remercie donc MM. Gaspard Gervasi et Alain Theretz pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe R&D Protéomique. Mes plus sincères remerciements vont à Jean-Philippe Charrier pour ses conseils, ses remarques avisées et nos discussions toujours intéressantes et constructives sur l'avenir de la spectrométrie de masse. Je tiens à remercier aussi Tanguy Fortin pour son aide et son éclairage sur la MRM³.

Je souhaite poursuivre mes remerciements, là aussi de façon arbitraire, par toute l'équipe du LSA : tout d'abord à Jérôme Lemoine qui a co-dirigé ce travail, à Arnaud Salvador pour son aide précieuse, à Romain Simon pour son expertise technique et à Catherine Fonbonne. Mes remerciements les plus chaleureux vont à Fabien Chirot qui, je puis le dire, a co-dirigé ce travail si ce n'est sur le papier, du moins dans les faits, et avec qui j'ai passé beaucoup de temps à discuter théorie et à sortir des sentiers battus. Je remercie aussi vivement Marion Girod pour sa gentillesse et son humour.

Poursuivons ce tour d'horizon avec l'équipe SpectroBio de l'ILM (anciennement LASIM) dans laquelle j'ai passé le plus clair de mon temps. Je remercie tout d'abord vivement Philippe Dugourd de m'avoir ouvert les portes de son équipe et d'avoir dirigé ce travail de thèse. Merci aussi à Rodolphe Antoine, Driss Rayane et Michel Broyer. Je souhaite bon courage à Steven Daly et Tristan Doussineau pour la suite de leurs post-docs et à Frédéric Poussigue, Marin Vojkovic et Anne-Laure Simon pour leurs doctorats. Merci aussi à Luke Macaleese pour sa disponibilité et son humour (and may the Force be with you...). Je terminerai enfin ce paragraphe en remerciant la personne avec laquelle j'ai probablement passé le plus de temps dans l'équipe, à savoir Franck Bertorelle. Merci pour les innombrables déjeuners, les discussions vaguement scientifiques mais toujours amusantes, ton amour de la polenta crémeuse et des clusters d'or et d'argent, ton accent du sud-ouest et ta sempiternelle question : Combien de pages ?

Remerciements

Et en parlant de déjeuner, je remercie tous ceux qui ont partagé les miens durant ces trois ans : Alexis Mosset, Matthias Hillenkamp, Jean Lermé (dit aussi le Coyote), Véronique Chavret (la maman des thésards, et en particulier la mienne durant ces trois ans), Véronique Boutou, Bruno Concina, Sad Mezzour, Francisco Pinto, Xavier Dagany, Jacques Maurelli, Christian Clavier et Guillaume Montagne. Je remercie de même Serge Martin et Richard Bredy pour les quelques jours d'exception passés à Gröningen.

Merci à tous ceux que je n'ai pas cités, mais sans qui ce manuscrit n'aurait pas vu le jour : mes parents, mes amis et ma famille et tous ceux que j'aurai oublié de citer (et il y en a...).

Je terminerai en remerciant ceux avec qui j'ai partagé mon bureau pendant deux ans, ceux dont la gaieté et l'humour mettaient de l'ambiance dans le bureau 206 du bâtiment Kastler, ambiance qui débordait d'ailleurs dans tout l'étage : un grand merci donc à Claire Brunet et Quentin Enjalbert. Merci aussi à Bruno Bellina qui certes n'était pas dans notre bureau mais dont l'humour filtrait souvent jusqu'à nous.

Bien que nos renseignements soient faux,
nous ne les garantissons pas.

Erik Satie *in* Mémoires d'un amnésique

Croire tout découvert est une erreur profonde
C'est prendre l'horizon pour les bornes du monde.

Antoine-Marin Lemierre *in*

L'Utilité des découvertes faites dans les arts et dans les sciences sous le règne de Louis XIV

New directions in science are launched by new tools much more often than by new
concepts.

The effect of a concept driven revolution is to explain old things in new ways.
The effect of a tool-driven revolution is to discover new things that have to be explained.

Freeman Dyson *in* Imagined Worlds

Avant-propos

La spectrométrie de masse est une méthode d'analyse quasiment universelle : un spectromètre de masse est capable de détecter, de quantifier ou d'identifier une molécule pouvant être ionisée en phase gazeuse à partir d'échantillons de natures diverses. Elle trouve de plus en plus sa place dans l'arsenal mis à disposition des laboratoires d'analyse médicale aux côtés d'outils plus anciens comme les tests ELISA, les dosages biochimiques ou les méthodes de la microbiologie traditionnelle.

C'est ainsi que l'identification de microorganismes par spectrométrie de masse MALDI-ToF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) est adoptée par un nombre croissant de laboratoires de microbiologie clinique. Il s'agit d'une rupture technologique majeure dans le domaine du diagnostic *in vitro*. L'analyse est extrêmement simple, précise et rapide (quelques minutes suffisent contre plusieurs heures avec une méthode conventionnelle). De plus, le coût par test est modeste, une fois que l'instrument a été acquis.

La société bioMérieux S.A. (Marcy l'Étoile – France), leader mondial en microbiologie clinique et industrielle et acteur majeur du diagnostic *in vitro*, a développé Vitek®-MS, seule solution de spectrométrie de masse pour l'identification microbiologique validée et enregistrée en Europe, en Chine, au Japon et en Amérique du nord. Elle souhaite tout naturellement rester en position de pointe dans ce domaine en explorant de nouvelles voies.

L'Université de Lyon, le CNRS et bioMérieux ont ainsi collaboré pour développer le dosage spécifique de protéines par spectrométrie de masse en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring), en adaptant la technique utilisée depuis une quinzaine d'année pour le dosage de « petites molécules » (vitamines D₂ et D₃ par exemple). Ces travaux sont à l'origine de deux développements : le dosage multiplexé de protéines conférant aux bactéries une résistance aux antibiotiques et le dosage de biomarqueurs sanguins par un nouveau procédé de spectrométrie de masse baptisé MRM³. Le mode MRM³ permet d'augmenter considérablement la sensibilité et la spécificité du mode MRM classique lorsqu'appliqué à l'analyse de matrices complexes, ce qui pourrait être particulièrement avantageux pour des applications en microbiologie clinique. Le mode MRM³ est cependant trop lent pour permettre un multiplexage suffisamment dense pour cette application.

La société bioMérieux, le CNRS et l'Université de Lyon ont alors proposé une méthode d'éjection simultanée et sélective, depuis un piège ionique quadrupolaire, d'ions de rapports masse/charge différents afin de diminuer le temps de cycle de chaque dosage MRM³. Ce mode d'éjection a été protégé par un brevet conjoint¹. Appliqué à la méthode d'analyse d'échantillons par MRM³, il augmente la sensibilité (en diminuant le temps de cycle) et la spécificité (en améliorant le rapport signal sur bruit). Il constitue donc un progrès indéniable dans le domaine de la détection de molécules dans des échantillons d'origine biologique.

Ce mémoire décrit la théorie d'une telle éjection simultanée et sa mise en œuvre expérimentale.

Le phénomène physique utilisé afin d'éjecter simultanément des ions de masses sélectionnées lorsque ceux-ci sont confinés dans un piège quadrupolaire est le phénomène de résonance paramétrique. Afin de pouvoir l'utiliser à nos fins une étude théorique et numérique poussée du comportement des ions dans un piège radiofréquence a été réalisée : c'est l'objet des deux premiers chapitres de ce mémoire. La conception d'un système expérimental permettant de vérifier les résultats théoriques est décrite dans le troisième chapitre ; le quatrième présente quant à lui les résultats expérimentaux obtenus en les confrontant aux résultats théoriques.

¹ Brevet FR 2950697 : Procédé de Détection de Molécules par Spectrométrie de Masse

Table des matières

REMERCIEMENTS	5
AVANT-PROPOS	9
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET NOTATIONS	13
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	17
CHAPITRE I THÉORIE ET APPLICATION DE LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE	23
I.1 HISTORIQUE ET CONTEXTE D'UTILISATION DE LA TECHNOLOGIE	25
I.2 PRINCIPE DE L'IONISATION EN PHASE GAZEUSE.....	30
I.3 PRINCIPE DU PIÉGEAGE D'IONS DANS DES PIÈGES RADIOFRÉQUENCES	33
I.4 PRINCIPE DE L'ANALYSE EN MASSE DANS LES PIÈGES RADIOFRÉQUENCES	40
I.5 PRINCIPES DE LA DÉTECTION D'IONS.....	46
I.6 COUPLAGES DE LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE	47
I.7 TRAITEMENT INFORMATIQUE DES DONNÉES ET POSTPROCESSING.....	55
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	58
CHAPITRE II THÉORIE PHYSIQUE ET MATHÉMATIQUE DU PIÉGEAGE	
QUADRUPOLAIRE	65
II.1 PIÈGE QUADRUPOLAIRE IDÉAL.....	67
II.2 PIÈGE QUADRUPOLAIRE RÉEL.....	87
II.3 SIMULATION INFORMATIQUE DU COMPORTEMENT DES IONS	95
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	115
CHAPITRE III MONTAGE EXPÉRIMENTAL	119
III.1 PRÉSENTATION GÉNÉRALE	121
III.2 SPECTROMÈTRE DE MASSE : LE 2000 QTRAP	122
III.3 ÉLECTRONIQUE DE PILOTAGE.....	124
III.4 RÉGLAGES DE L'ÉLECTRONIQUE DE PILOTAGE	127
III.5 MÉTHODE D'ANALYSE DES RÉSULTATS.....	131

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 133

**CHAPITRE IV EXCITATIONS SIMULTANÉES, COMPARAISON THÉORIE /
EXPÉRIENCE 135**

IV.1 REMARQUES PRÉLIMINAIRES..... 137
IV.2 AVEC UNE EXCITATION 138
IV.3 AVEC DEUX EXCITATIONS..... 142
IV.4 APPLICATION À UN MÉLANGE TERNAIRE 143
IV.5 CONCLUSION DES EXPÉRIMENTATIONS 146

CONCLUSION 147

ANNEXES 149

A. GÉNÉRALISATION DE L'APPROXIMATION DU Puits DE POTENTIEL.....151
B. PROGRAMME INFORMATIQUE CALCULANT β EN FONCTION DES PARAMÈTRES A ET Q 154
C. PUBLICATIONS 156

Liste des abréviations et notations

AC	Alternating Current
AO	Amplificateur Opérationnel
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
CID	Collision Induced Dissociation
DC	Direct Current
DIT	Digital Ion Trap
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EM	Electron Multiplier
ESI	ElectroSpray Ionization
FFT	Fast Fourier Transform
FWHM	Full Width at Half Maximum
GBF	Générateur de Basses Fréquences
GC	Gaz Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LC	Liquid Chromatography
LIT	Linear Ion Trap
LMCO	Low Mass Cut-Off
LOD	Limit Of Detection
LOQ	Limit Of Quantitation
MALDI-ToF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight
MRM	Multiple Reactions Monitoring
MS	Mass Spectrometry
PEG	Poly Éthylène Glycol (n° CAS : 25322 – 68 – 3)
PSA	Prostate Specific Antigen
Q1	Premier quadripôle d'un triple quadripôle
q2	Deuxième quadripôle d'un triple quadripôle servant de cellule de collision
Q3	Troisième quadripôle d'un triple quadripôle
QIT	Quadrupole Ion Trap
QMF	Quadrupole Mass Filter
QqQ	Triple quadripôle dont le deuxième sert de cellule de collision
QUISTOR	QUadrupole Ion STORe
RF	Radiofréquence
SNR	Signal to Noise Ratio
SRM	Selected Reaction Monitoring
TD-DFT	Time Dependent Density Functional Theory

Liste des abréviations et notations

ϕ	Potentiel électrique dans l'espace
β	Valeur du rapport $z \frac{\Omega_{\text{ion}}}{\Omega}$
ν	Valeur du rapport $\frac{\Omega_{\text{excitation}}}{\Omega}$
ϕ_0	Potentiel électrique appliqué aux électrodes du quadripôle
ϵ_0	Permittivité diélectrique du vide ($8,85 \cdot 10^{-12} \text{ F.m}^{-1}$)
ρ_{max}	Densité maximale des ions dans un piège radiofréquence (en cm^{-3})
β_x	Valeur du paramètre β du mouvement des ions selon l'axe ox
β_y	Valeur du paramètre β du mouvement des ions selon l'axe oy
\bar{D}	Pseudo-potentiel dans l'approximation de Dehmelt
a	Premier paramètre de Mathieu (lié à la composante continue du potentiel)
e	Charge élémentaire ($1,60 \cdot 10^{-19} \text{ C}$)
E_c	Énergie cinétique
f_0	Fréquence de coupure dans le modèle du filtre passe-bas d'ordre 2
G_0	Gain (exprimé en $\text{Th.kHz}^2/\text{mV}$) de la fonction de transfert de la chaîne d'amplification dans le modèle du filtre passe-bas d'ordre 2
H	Fonction périodique dans l'équation de Hill
H	Fonction de transfert de la chaîne d'amplification (en $\text{Th.kHz}^2/\text{mV}$)
k_B	Constante de Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$)
L	Longueur d'un QMF ou d'un LIT
m	Masse d'un ion (en kg ou en Da)
M	Matrice de monodromie associée à une équation de Hill
m/z	Ratio masse sur charge d'un ion (en Th ou en Da)
m_{gaz}	Masse d'une molécule de gaz (en kg)
N_{max}	Nombre maximal d'ions dans un piège
P	Pression (en Pa)
q	Deuxième paramètre de Mathieu (lié à la composante alternative du potentiel)
Q	Facteur de qualité dans le modèle du filtre passe-bas d'ordre 2
q'	Amplitude relative d'une excitation ($q' = V_{\text{excitation}}/V$)
q_1	Paramètre de Mathieu associé à un potentiel d'excitation
R	Résolvante d'un système différentiel linéaire
r_0	Rayon caractéristique du piège quadrupolaire
r_e	Rayon des électrodes dans un système LIT ou d'un QMF à électrodes circulaires
T	Température (en K)
U	Valeur du potentiel électrique continu appliqué aux électrodes du quadripôle
U_{ion}	Tension d'offset équivalente correspondant à la charge d'espace du nuage d'ions stabilisé dans un piège
V	Amplitude du potentiel électrique alternatif appliqué aux électrodes du

	quadripôle
V'_{GBF}	Tension d'excitation en sortie d'un GBF avant la chaîne d'amplification
V_{GBF}	Tension de confinement en sortie d'un GBF avant la chaîne d'amplification
z	Charge d'un ion (en nombre de charges élémentaires, sans unité)
θ	Angle de repérage dans une représentation polaire
ξ	Paramètre adimensionnel temporel dans les équations de Mathieu
σ_{gaz}	Section efficace de collision d'une molécule de gaz (en m^2)
Ω	Pulsation du potentiel électrique de confinement (en rad.s^{-1})
$\Omega_{\text{excitation}}$	Pulsation du potentiel électrique d'excitation (en rad.s^{-1})
Ω_{ion}	Pulsation fondamentale de résonance des ions dans un piège radiofréquence (en rad.s^{-1})

Liste des tableaux et figures

Figure I-1 : Gamme de concentration (en échelle logarithmique) de quelques marqueurs protéiques du plasma. Les protéines présentes dans un plasma normal y sont représentées, mais aussi les protéines provenant de tissus malades ainsi que les marqueurs inflammatoires (d'après [6]) _____	27
Figure I-2 : Calutron du site de Oak Ridge – Tennessee, USA – utilisé lors du projet Manhattan pour enrichir l'uranium destiné à la bombe A (d'après le United States Department of Energy) _____	29
Figure I-3 : Schéma de principe de la formation d'un électrospray. Lorsque la tension entre le capillaire et la contre électrode est suffisante, le cône de Taylor se rompt et expulse un spray de gouttelettes chargées (d'après [14]) _____	31
Figure I-4 : Schémas d'une source APCI. L'analyte solvaté (ici issu d'une LC) est nébulisé par un gaz chauffé, le spray est désolvaté dans une chambre de désolvatation, les molécules sont ionisées par une décharge corona puis introduites dans le spectromètre de masse via un capillaire de transfert et un skimmer (d'après [23] et le département de Chimie de l'université de Pittsburgh) _____	32
Figure I-5 : Section transversale d'un LIT à géométrie hyperbolique (d'après [30]) _____	35
Figure I-6 : LIT à géométrie hyperbolique, vue isométrique (d'après [31]) _____	35
Figure I-7 : Coupe transversale d'un LIT à électrodes cylindriques _____	36
Figure I-8 : Piège tridimensionnel (d'après [40]) _____	38
Figure I-9 : Schéma de principe d'un piège tridimensionnel (d'après [41]) _____	38
Figure I-10 : Représentation en fonction de la distance à la sortie du détecteur de : a) E_z , le champ électrique axial, une valeur négative de E_z ramenant les ions vers le centre du détecteur, une valeur positive les en éloignant; b) La position du cône de réflexion selon la distance à l'axe (d'après [48]) _____	42
Figure I-11 : LIT à éjection radiale. La segmentation des électrodes (Front section et Back section) permet d'améliorer l'admittance du système en ajustant les valeurs des champs RF dans l'espace (d'après [51]) _____	43
Figure I-12 : Diagramme de stabilité lorsque $\phi_0 t = U - V \cos \Omega t$. En abscisse le paramètre q' est proportionnel à m/z et inversement proportionnel à V , en ordonnée le paramètre a' est égal à U/V . Les ions compris dans la zone sous la courbe sont stables, ceux qui sont à l'extérieur sont instables _____	44
Figure I-13 : Schéma de principe d'un multiplicateur d'électron à dynodes discrètes (d'après Shimadzu Corp., Kyoto, Japon) _____	46
Figure I-14 : Schéma de principe de la MS/MS avec quelques méthodes de fragmentation possibles (CID, SID, IRMPD) (d'après [22]) : la première étape permet de sélectionner une masse d'ion parent, la seconde permet d'effectuer l'analyse en masse des ions fragments _____	48
Figure I-15 : Schéma de principe du fonctionnement du mode SRM (identique au mode MRM) (d'après Christopher Petzold - Lawrence Berkeley National Laboratory, USA) _____	50

Figure I-16 : Schéma de principe du fonctionnement de la MRM ³ . À l'issue de la phase SRM, l'ion fils est à nouveau fragmenté, le spectre de masse des fragments est alors obtenu. (d'après ABSciex)	51
Figure I-17 : Schéma de principe d'une analyse en mode LC/MRM ³ . À l'issue de la phase SRM, l'ion fils est à nouveau fragmenté, le spectre de masse des fragments permet de détecter des ions « petits-fils » (ou de seconde génération) caractéristiques de la transition sélectionnée. La sommation de leurs intensités au cours du temps permet de reconstituer un chromatogramme	52
Figure I-18 : Schéma d'un appareil de type QqQ (à l'instar du 2000QTrap d'ABSciex), q ₂ représente la cellule de collision sous diazote, Q ₁ et Q ₃ sont des QMF (dans le cas du 2000QTrap, Q ₃ peut aussi fonctionner en mode LIT et servir de cellule de collision annexe). Les IQ représentent les optiques d'entrée/sortie et Q ₀ est un quadripôle servant de guide d'ions, d'après [84]	54
Figure I-19 : Exemple de chromatogramme obtenu par LC/MS. Le point à l'instant t du chromatogramme est calculé par intégration des pics caractéristiques de la molécule à étudier (ici ses différents états de charge) sur le spectre de masse obtenu à l'instant t (d'après [92])	56
Figure II-1 : Exemple de trajectoires stables et instables d'un ion dans un QMF	69
Figure II-2 : Diagramme de stabilité d'un ion dans un QMF idéal selon l'axe Ox, les zones grisées représentent l'ensemble des couples (a ; q) tels que l'équation du mouvement des ions selon l'axe Ox soit stable (d'après [2])	70
Figure II-3 : Intersection des diagrammes de stabilité des ions dans un QMF idéal selon les axes Ox et Oy, l'illustration montre cinq zones de stabilités conventionnellement numérotées (d'après [4])	71
Figure II-4 : Première zone de stabilité des ions dans un QMF idéal (d'après [6])	72
Figure II-5 : Diagramme de stabilité d'un QMF idéal. Une droite traversant la zone de stabilité au voisinage de l'apex figure un rapport U/V constant permettant de laisser passer les ions de masse m ₂ mais pas ceux de masses m ₁ ou m ₃ (d'après [9])	74
Figure II-6 : Analogie mécanique du système de piégeage radiofréquence. À tout instant l'ion est sous l'influence d'un potentiel en selle à cheval dont la courbure varie périodiquement avec le temps (d'après [10])	75
Figure II-7 : Graphe de β en fonction de q lorsque a = 0 (mode RF-only)	77
Figure II-8 : Graphe des valeurs propres de la matrice de monodromie en fonction de sa trace	83
Figure II-9 : Diagramme de stabilité de l'équation de Meissner sans offset. Ce diagramme est symétrique par rapport à l'axe $\tau = 50\%$	86
Figure II-10 : Schéma de l'entrefer d'un QMF à électrodes circulaires. La couronne circulaire grisée représente la zone où les ions sont accélérés par les non linéarités du champ et sont perdus (d'après [28])	88

Figure II-11 : Décalage de la valeur du LMCO (déterminée par calcul théorique ou par simulation numérique) en fonction du pourcentage de composante hexapolaire ou octopolaire ajoutée. Lorsque celui-ci est à 0, le LMCO vaut 0,908 comme le prévoit la théorie des équations de Mathieu (d'après [30]) _____ 89

Figure II-12 : Décalage de la valeur de β en fonction du pourcentage de composante hexapolaire ou octopolaire ajoutée. Le paramètre B représente l'écart (en %) entre la valeur de β calculée dans le cadre de la théorie des équations de Mathieu et celle déterminée par simulation numérique (d'après [30]) _____ 89

Figure II-13 : Décalage des limites du diagramme de stabilité lorsque une contribution ε d'un champ octopolaire est ajouté au champ quadripolaire (d'après [31]) _____ 90

Figure II-14 : Lignes d'instabilité d'après l'équation II-36 pour N allant de 3 à 10 (d'après [32]) _____ 91

Figure II-15 : Diagramme de stabilité « réaliste » d'un QMF simulé par le logiciel SIAQ. Le diamètre de chaque point noir est proportionnel à la transmittance du système. Les points rouges figurent les limites théoriques du diagramme de stabilité, données par l'équation II-7 _____ 97

Figure II-16 : Graphe des transmittances d'ions soumis à une excitation en fonction de l'intensité relative q' de l'excitation _____ 98

Figure II-17: Graphe des transmittances d'ions soumis à deux excitations en fonction de l'intensité relative q' de l'excitation _____ 100

Figure II-18 : FFT spatiale du mouvement d'un ion de 750 Th dans un champ généré par les potentiels $U = 0$ V, $V = 50$ V et $\Omega = 0,6 \cdot 10^6$ rad.s⁻¹. Les différentes fréquences de giration (données par l'équation II-17 page 78) y sont visibles. L'énergie cinétique moyenne de cet ion est portée en regard en fonction de la fréquence et de l'amplitude de l'excitation à laquelle il est soumis. _____ 102

Figure II-19 : Évolution de l'énergie cinétique moyenne avec l'amplitude relative de l'excitation _____ 103

Figure II-20 : Diagramme de stabilité dans le plan (q ; q') lorsque $\nu_1 = 0,33$. La figure (a) montre le diagramme obtenu lorsque la phase φ_1 est nulle et la figure (b) lorsque la phase vaut 1,0 rad _____ 108

Figure II-21 : Diagramme de stabilité dans le plan (q ; q') lorsque $\nu_1 = 0,33$ obtenu par intersection de tous les diagrammes de stabilités pour φ_1 variant de 0 à 2π _____ 109

Figure II-22 : Diagramme de stabilité indépendant de la phase dans le plan (q ; q') pour $\nu_1 = 0,188$. Les paramètres n et K des résonances (cf. équation II-23 page 79) y sont repérés _____ 110

Figure II-23 : Évolution de la largeur de la vallée d'instabilité Δq correspondant à la résonance du premier ordre en fonction de l'amplitude relative de l'excitation q' _____ 111

Figure II-24 : Graphe de σ en fonction de $1/q$, la droite de régression ainsi que les points de mesure y figurent _____ 112

Figure II-25 : Diagrammes de stabilité théoriques dans le plan (q ; q'). (a) : pour $\nu_1 = 0,188$. (b) pour $\nu_1 = 0,344$. (c) pour $\nu_1 = 0,188$ et $\nu_2 = 0,344$ _____ 113

Figure III-1 : Schéma d'un 2000QTrap, q2 représente la cellule de collision sous diazote, Q1 et Q3 sont des QMF (dans le cas du 2000QTrap, Q3 peut aussi fonctionner en mode LIT et servir de cellule de collision annexe). Les IQ représentent les optiques d'entrée/sortie et Q0 est un quadripôle servant de guide d'ions (d'après [2]) _____ 123

Figure III-2 : Schéma du montage additionneur de tensions. Celui-ci permet d'additionner jusqu'à trois tensions avec une impédance d'entrée de 50Ω et une impédance de sortie nulle _____ 125

Figure III-3 : Schéma de principe du système électronique de pilotage branché aux électrodes du Q3. Les signaux de sortie des GBF sont additionnés, amplifiés et déphasés de π rad par le balun avant d'être imposés aux électrodes du Q3 de l'instrument _____ 126

Figure III-4 : Tensions en entrée et en sorties du balun. Le balun permet, pour une tension sinusoïdale d'entrée donnée, d'obtenir sur les voies de sortie deux signaux de même fréquence, d'amplitude cinq fois plus élevée, dont l'un est en phase avec l'entrée et l'autre en opposition de phase _____ 126

Figure III-5 : Exemple d'un spectre de masse d'une solution de PEG 600 en mode positif. Balayage en masse en Q1 (balayage de 100 Th à 1500 Th en 1s, somme de 300 scans). Tension d'entrée du GBF : 400 mV, 600 kHz. Le spectre en masse du PEG présente principalement des pics espacés de 44 Th (correspondant au m/z d'une unité monomérique monochargée) et des pics espacés de 22 Th (m/z d'une unité monomérique bichargée) mais aussi des pics espacés de 11 Th, 5,5 Th etc. _____ 128

Figure III-6 : Gain du montage (exprimé en $\text{Th.kHz}^2/\text{mV}$). Le modèle proposé est celui d'un filtre passe-bas d'ordre 2 de gain $G_0 = 1,0 \cdot 10^6 \text{ Th.kHz}^2/\text{mV}$, de fréquence de coupure $f_0 = 0,85 \text{ MHz}$ et de facteur de qualité $Q = 2,5 \cdot 10^6$ _____ 129

Figure III-7 : Exemple de spectres de spectres de masse (solution de PEG 600 en mode positif. Balayage en masse en Q1 100 Th à 1500 Th en 1s, somme de 300 scans). Le spectre (b) montre une déplétion entre 794 Th et 801 Th (par rapport au spectre (a)) d'après le critère décrit dans le corps du texte _____ 132

Figure IV-1 : Comparaison entre les valeurs théoriques et expérimentales des ratios m/z (en Th) excités par une fréquence donnée au premier ordre ($K = 1$ et $n = 0$) _____ 138

Figure IV-2 : Exemples de spectres de masse pour la solution de PEG 600. Le spectre (a) correspond au spectre de référence, le spectre (b) correspond à un spectre mesuré lorsqu'une tension d'excitation de 90 kHz ($v = 0,1$) et d'amplitude relative 0,05 est appliquée à Q3. Cette excitation provoque l'apparition d'une bande d'instabilité entre les masses 720 Th et 750 th _____ 140

Figure IV-3 : Comparaison entre un diagramme de stabilité dans le plan (q ; q') obtenu par l'étude des équations de Hill (zones noires) et les bornes des zones d'instabilité relevées expérimentalement (points rouges). Figure (a) : $v = 0,188$ et figure (b) : $v = 0,344$. Les déplétions centrées sur les masses de 346 Th et 195 Th correspondent à des résonances de paramètres $K = 1$ et $n = 0$. Les déplétions centrées sur les masses de 105 Th et 117 Th correspondent à des résonances de paramètres $K = 1$ et $n = 1$. Les autres vallées de déplétion correspondent à des résonances d'ordres plus élevés _____ 141

Figure IV-4 : Comparaison entre un diagramme de stabilité dans le plan (q ; q') obtenu par l'étude des équations de Hill ($\nu_1 = 0,188$ et $\nu_2 = 0,344$, les amplitudes relatives de ces deux potentiels d'excitation sont identiques et égales à q' , conformément à l'équation II-61) et les bornes des zones d'instabilité relevées expérimentalement _____ 142

Figure IV-5 : Formules développées des molécules de nadolol, d'acébutolol et de propranolol (de bas en haut) _____ 144

Figure IV-6 : Spectres de masse d'un mélange de propranolol ($m/z = 259$ Th), de nadolol ($m/z = 309$ Th) et d'acébutolol ($m/z = 336$ Th). (a) : spectre de masse obtenu sans excitation ; (b) : spectre de masse obtenu avec une excitation à $q' = 0,01$ centrée sur $m/z = 259$ Th ; (c) : spectre de masse obtenu avec une excitation à $q' = 0,01$ centrée sur $m/z = 336$ Th ; (d) : spectre de masse obtenu avec deux excitations à $q' = 0,01$ centrés respectivement sur 259 Th et 336 Th _____ 145

Chapitre I Théorie et application de la spectrométrie de masse

I.1	HISTORIQUE ET CONTEXTE D'UTILISATION DE LA TECHNOLOGIE	25
I.1.1	CONTEXTE DE L'UTILISATION DE LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE.....	25
I.1.1.1	Utilisation en quantification de biomolécules	25
I.1.1.2	Limites de la technologie.....	28
I.1.2	RAPPELS HISTORIQUES	28
I.2	PRINCIPE DE L'IONISATION EN PHASE GAZEUSE.....	30
I.2.1	SOURCES ESI	30
I.2.2	SOURCE APCI.....	31
I.3	PRINCIPE DU PIÉGEAGE D'IONS DANS DES PIÈGES RADIOFRÉQUENCES	33
I.3.1	THÉORÈME D'EARNSHAW	33
I.3.2	GÉOMÉTRIES UTILISÉES.....	34
I.3.2.1	Pièges bidimensionnels	34
I.3.2.1.1	Pièges à électrodes hyperboliques	34
I.3.2.1.2	Pièges à électrodes cylindriques	36
I.3.2.2	Pièges tridimensionnels	37
I.4	PRINCIPE DE L'ANALYSE EN MASSE DANS LES PIÈGES RADIOFRÉQUENCES	40
I.4.1	GÉOMÉTRIES D'ÉJECTION, EFFETS DE BORDS.....	40
I.4.1.1	Effets de bords dans les LIT	40
I.4.1.2	Éjection axiale	41
I.4.1.3	Éjection radiale.....	42
I.4.2	ANALYSE EN MASSE, CONSIDÉRATIONS PHYSIQUES	43
I.4.2.1	Analyse à l'apex	44
I.4.2.2	Analyse par ajout de composantes radiofréquences	45
I.5	PRINCIPES DE LA DÉTECTION D'IONS.....	46
I.6	COUPLAGES DE LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE	47
I.6.1	COUPLAGE HPLC/MS OU LC/MS	47
I.6.2	COUPLAGES MS/MS, MS ^N , MRM ³	48
I.6.2.1.1	Mode MRM.....	49
I.6.2.1.2	Mode MRM ³	50
I.6.2.2	Principe de la CID	53
I.6.3	MISE EN ŒUVRE.....	53
I.6.3.1	Dans un spectromètre de masse en tandem spatial.....	53
I.6.3.2	Dans un spectromètre de masse en tandem temporel	54
I.7	TRAITEMENT INFORMATIQUE DES DONNÉES ET POSTPROCESSING.....	55
I.7.1	CAS DE LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE SEULE.....	55
I.7.1.1	Détermination de l'état de charge d'un ion et de sa masse.....	55
I.7.1.2	Détermination de la formule brute d'un ion et de sa structure.....	55
I.7.2	CAS DE LA HPLC/MS ^N OU DE LA LC/MS ^N	56

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES58

1.1 *Historique et contexte d'utilisation de la technologie*

1.1.1 *Contexte de l'utilisation de la spectrométrie de masse*

La spectrométrie de masse est une technologie permettant tout à la fois la séparation d'ions de masses différentes, la détection d'ions de masse donnée et l'identification de leur structure chimique. Couplée à des techniques chromatographiques telles que la chromatographie liquide haute performance (cf. section I.6.1 page 47) la spectrométrie de masse permet de détecter une molécule et de la quantifier avec une grande sensibilité et une très grande spécificité dans un mélange complexe, en particulier d'origine biologique.

1.1.1.1 *Utilisation en quantification de biomolécules*

L'utilisation de la spectrométrie de masse pour la détection et la quantification de marqueurs biologiques (marqueurs de pathologies tels que la PSA¹ dans le sang [1], ou bien de virulence et de résistance aux antibiotiques dans le cas d'analyses microbiologiques) présente potentiellement de grands avantages sur les technologies traditionnellement utilisées (tests ELISA² ou antibiogrammes par exemple). En effet d'une part sa grande spécificité permet de limiter le nombre d'étapes de préparation et de purification de l'échantillon et, d'autre part, sa grande sensibilité permet une quantification sur des échantillons de faibles volumes d'analyte. Cette dernière propriété permettrait en particulier, dans le cas d'analyses en bactériologie, d'accélérer le processus de caractérisation moléculaire des agents pathogènes (résistance, virulence, typage, etc.) en supprimant, ou au moins en diminuant, le temps de mise en culture (cf. [2]–[5]). L'alliance d'une grande sensibilité et d'une grande spécificité permet en outre la détection ou la quantification de molécules présentes à faibles concentrations dans des matrices complexes, telles que le plasma dans lequel les échelles de concentration s'étendent sur huit ordres de grandeur et où 99 % de la masse totale en protéines provient de 22 protéines seulement (cf. [6], [7] et Figure I-1).

Cette simplification des procédures de l'analyse en microbiologie ou en biologie raccourcit certes le temps d'analyse mais aussi diminue le nombre d'interventions sur l'échantillon, et donc le nombre d'erreurs humaines possibles, limite la possibilité de contaminations croisées et diminue la consommation de réactifs, ce qui réduit drastiquement les coûts d'analyse.

¹ Prostate Specific Antigen

² Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay

I.1 Historique et contexte d'utilisation de la technologie

Par ailleurs, la spectrométrie de masse étant une technique d'analyse universelle (au sens où toute molécule ionisable est potentiellement détectable), il est possible de mettre au point des méthodes d'analyse multiplexées permettant de détecter, de quantifier et d'identifier plusieurs marqueurs ou molécules d'intérêts dans le même temps sur un même échantillon.

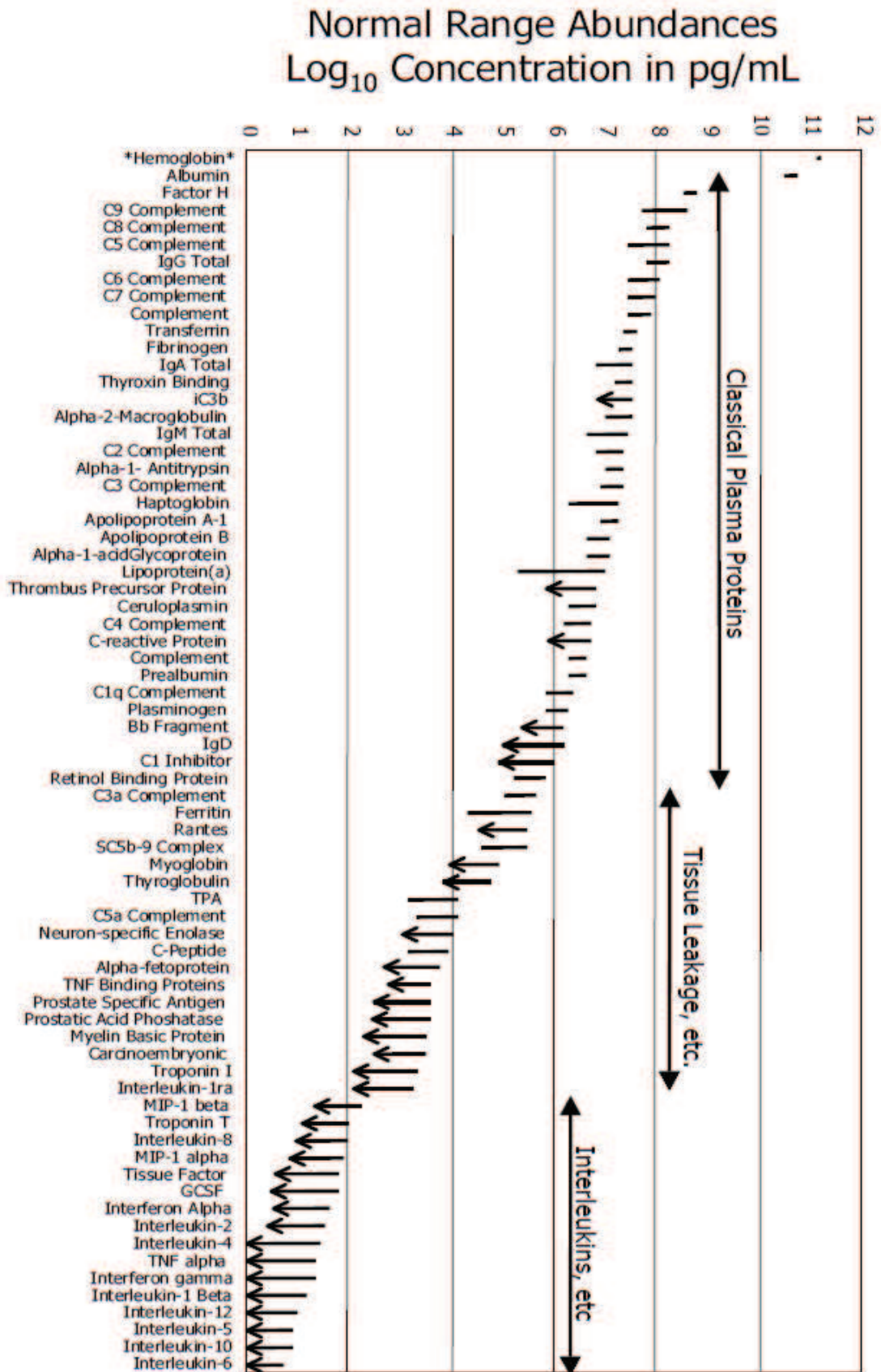


Figure I-1 : Gamme de concentration (en échelle logarithmique) de quelques marqueurs protéiques du plasma. Les protéines présentes dans un plasma normal y sont représentées, mais aussi les protéines provenant de tissus malades ainsi que les marqueurs inflammatoires (d'après [6])

I.1.1.2 Limites de la technologie

Utiliser la spectrométrie de masse pour l'analyse de mélanges complexes requiert encore, à l'heure actuelle, l'utilisation d'un couplage entre une technique de séparation chromatographique (en particulier chromatographie liquide) et le spectromètre de masse. Ce couplage nécessite une cadence d'analyse en masse élevée afin d'augmenter les capacités de multiplexage tout en conservant la sensibilité de la méthode (cf. section I.6.1 page 47). Or cette augmentation de la fréquence se fait souvent au détriment de la spécificité (cf. [8], [9]). Celle-ci peut être augmentée en ajoutant aux étapes d'analyses en masse des étapes de fragmentation, ces dernières permettant de faire le distinguo entre des ions isobariques de natures différentes ce qui assure la spécificité de la méthode (cf. section I.6.2 page 48). Cependant l'ajout d'étapes de fragmentations contribue encore à rallonger le temps de cycle.

Une solution envisageable pour contourner ce problème dans le cas de l'analyse de mélanges de molécules protéiques ou peptidiques, et qui fait l'objet du présent mémoire, consiste à modifier le mode de fonctionnement de l'appareil de spectrométrie de masse afin de détecter simultanément tous les ions fragments protéotypiques sans effectuer de balayage en masse (cf. Chapitre IV). Ce mode de fonctionnement permettrait d'augmenter sensiblement la cadence de chaque cycle de détection par le spectromètre de masse (cf. section I.6.2.1.2 page 50) tout en facilitant le post-traitement des données (cf. section I.7.2 page 56). Ceci se traduirait par une augmentation significative à la fois de la sensibilité et de la spécificité de la méthode.

I.1.2 Rappels historiques

Les prémices de la spectrométrie de masse remontent aux travaux de sir Joseph Thomson sur les « raies positives » dans les années 1900 (il reçut le prix Nobel de physique en 1906 pour des travaux dérivés de ces recherches et son élève Francis Aston celui de chimie en 1922 pour l'utilisation d'un des premiers spectromètres de masse). Cependant les instruments d'analyse en masse de l'époque, et jusqu'en 1948, étaient des analyseurs à secteurs magnétiques sur lesquels nous ne nous attarderons pas. Notons simplement que c'est un appareil (le calutron, cf. Figure I-2) dérivé d'un instrument de spectrométrie de masse inventé par Dempster qui permit aux Alliés d'enrichir l'uranium destiné au projet Manhattan pendant la seconde guerre mondiale. Le premier spectromètre de masse à temps de vol (ToF) a été décrit en 1948, année de la commercialisation du tout premier spectromètre de masse, par Cameron *et al.* (cf. [10]) et le premier instrument commercial basé sur ce principe a été fabriqué en 1964.

Il faudra attendre 1953 pour que le premier piège quadripolaire radiofréquence soit théoriquement décrit par Wolfgang Paul (cf. [11]). Il reçut pour ce travail le prix Nobel de physique en 1989.

La première application de la spectrométrie de masse aux molécules d'origine biologique date de 1966 : Biemann *et al.* déterminent la séquence d'un peptide par spectrométrie de masse (cf. [12]) et fournissent le premier système informatique de traitement des spectres de masse.

En 1983 le premier système LC/MS basé sur un analyseur quadripolaire est opérationnel et appliqué à un mélange de molécules biologiques (cf. [13]). Il faudra cependant attendre 1984 et l'invention des sources électrospray par Fenn et al. (cf. [14]) pour que la spectrométrie de masse puisse être couramment utilisée sur des molécules biologiques fragiles et de grandes masses. John Fenn reçut le prix Nobel de chimie en 2002 pour ces travaux, conjointement à Koichi Tanaka (pour ses travaux sur le MALDI¹-ToF, technologie inventée en 1985 par Franz Hillenkamp, cf. [15]).

Ces découvertes et ces inventions ouvrent la voie à l'application de la spectrométrie de masse à la biologie dans les années 1990, en particulier via les travaux pionniers des équipes de Brian Chait, William Henzel et Fred McLafferty entre autres.

Finalement, ce ne sont pas moins de cinq prix Nobel (trois en sciences physiques et deux en chimie) qui ont été décernés pour des travaux développant la spectrométrie de masse, preuve de l'importance considérable de cette technique en physique fondamentale, en chimie analytique et en biologie.



Figure I-2 : Calutron du site de Oak Ridge – Tennessee, USA – utilisé lors du projet Manhattan pour enrichir l'uranium destiné à la bombe A (d'après le United States Department of Energy)

¹ Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation

1.2 Principe de l'ionisation en phase gazeuse

Le spectromètre de masse permet de détecter des ions de ratio masse/charge donné. Le principe de fonctionnement de cet instrument nécessite que ces ions soient en phase gazeuse. Cette condition implique donc une source d'ions en entrée du spectromètre. Il existe une grande variété de sources (29 sources ambiantes différentes ont été étudiées entre les années 2004 et 2009 d'après [16]), qui se caractérisent, entre autre, par les énergies mises en jeu lors de la mise en phase gazeuse et de l'ionisation. Certaines sources très énergétiques occasionnent une importante fragmentation de la molécule ionisée, d'autres plus douces produisent essentiellement des ions moléculaires ou pseudomoléculaires sans fragmentation.

L'autre caractéristique distinctive des différentes sources repose dans le procédé choisi pour porter l'analyte en phase gazeuse s'il a été introduit dans l'appareil en phase condensée. Le choix de la source dépendra alors de la tension de vapeur saturante du solvant utilisé ainsi que de la stabilité thermique de l'analyte.

L'application de la spectrométrie de masse aux biomolécules nécessite des sources adaptées à des solvants tels que l'eau, le méthanol ou l'acétonitrile et suffisamment douces pour ne pas fragmenter ces molécules relativement fragiles. Deux sources répondant à ces critères seront décrites ci-après : les sources ESI¹ et les sources APCI².

1.2.1 Sources ESI

Les sources ESI ont été développées par Fenn en 1984 (cf. [14]). Elles utilisent une méthode d'ionisation et de désolvatation douce bien adaptée aux molécules biologiques. Elles permettent par ailleurs d'atteindre des sensibilités élevées et peuvent se coupler facilement à des dispositifs chromatographiques comme la chromatographie liquide.

L'électrospray est produit à pression atmosphérique par application d'une différence de potentiel de quelques kV entre le capillaire d'entrée de l'analyte et la contre électrode de la source. Cette différence de potentiel va créer un cône, dit cône de Taylor (cf. [17]), en sortie du capillaire. Au sommet du cône, le champ électrique est exalté par effet de pointe, les ions de l'analyte s'y accumulent et exercent une pression qui, lorsqu'elle est supérieure à la tension superficielle, rompt le cône en un spray de gouttelettes chargées (cf. [18] et Figure I-3).

¹ ElectroSpray Ionization

² Atmospheric Pressure Chemical Ionization

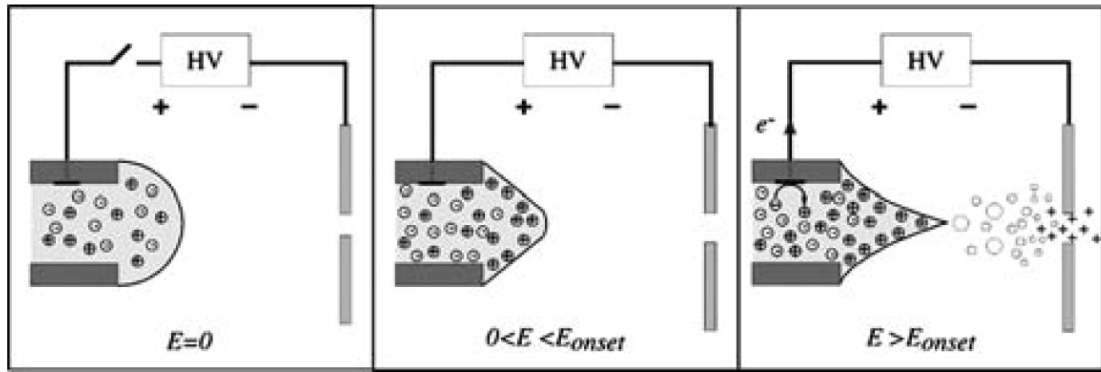


Figure I-3 : Schéma de principe de la formation d'un électrospray. Lorsque la tension entre le capillaire et la contre électrode est suffisante, le cône de Taylor se rompt et expulse un spray de gouttelettes chargées (d'après [14])

L'évaporation du solvant dans les gouttelettes (accélérée par l'application d'un « Drying Gaz » ou gaz de séchage, généralement du diazote) augmente la charge volumique de celles-ci jusqu'à ce que les forces de répulsion coulombiennes excèdent les forces de cohésion (limite de Rayleigh) : les gouttelettes se disloquent et deviennent de plus en plus petites jusqu'à ce que la densité de charge devienne suffisante pour provoquer la désorption des ions (cf. [19], [20]). Les ions ainsi formés sont alors introduits dans le spectromètre de masse à travers un « skimmer » (ou écumoire).

1.2.2 Source APCI

L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) est une technique permettant de désolvater et d'ioniser des analytes non polaires et volatils (cf. [21], [22]) de faibles masse moléculaire. Cette source produit des ions monochargés sans fragmentation sous réserve que les analytes soient thermostables (cf. [22]).

La solution à analyser, pouvant provenir d'un dispositif de chromatographie liquide, est introduite dans un nébuliseur pneumatique. Le gaz nébulisateur chauffé (généralement du diazote) permet de générer des gouttelettes de solvant contenant l'analyte. Ces gouttelettes passent dans une chambre de désolvatation chauffée qui permet leur évaporation. Le gaz chaud contenant l'analyte et le solvant évaporé traverse alors une décharge corona, celle-ci transfère des électrons aux molécules de l'atmosphère, formant des ions radicalaires qui transfèrent à leur tour leurs charges aux molécules à analyser (cf. [23] et Figure I-4). Les ions ainsi formés sont ensuite introduits via un skimmer dans le spectromètre de masse.

I.2 Principe de l'ionisation en phase gazeuse

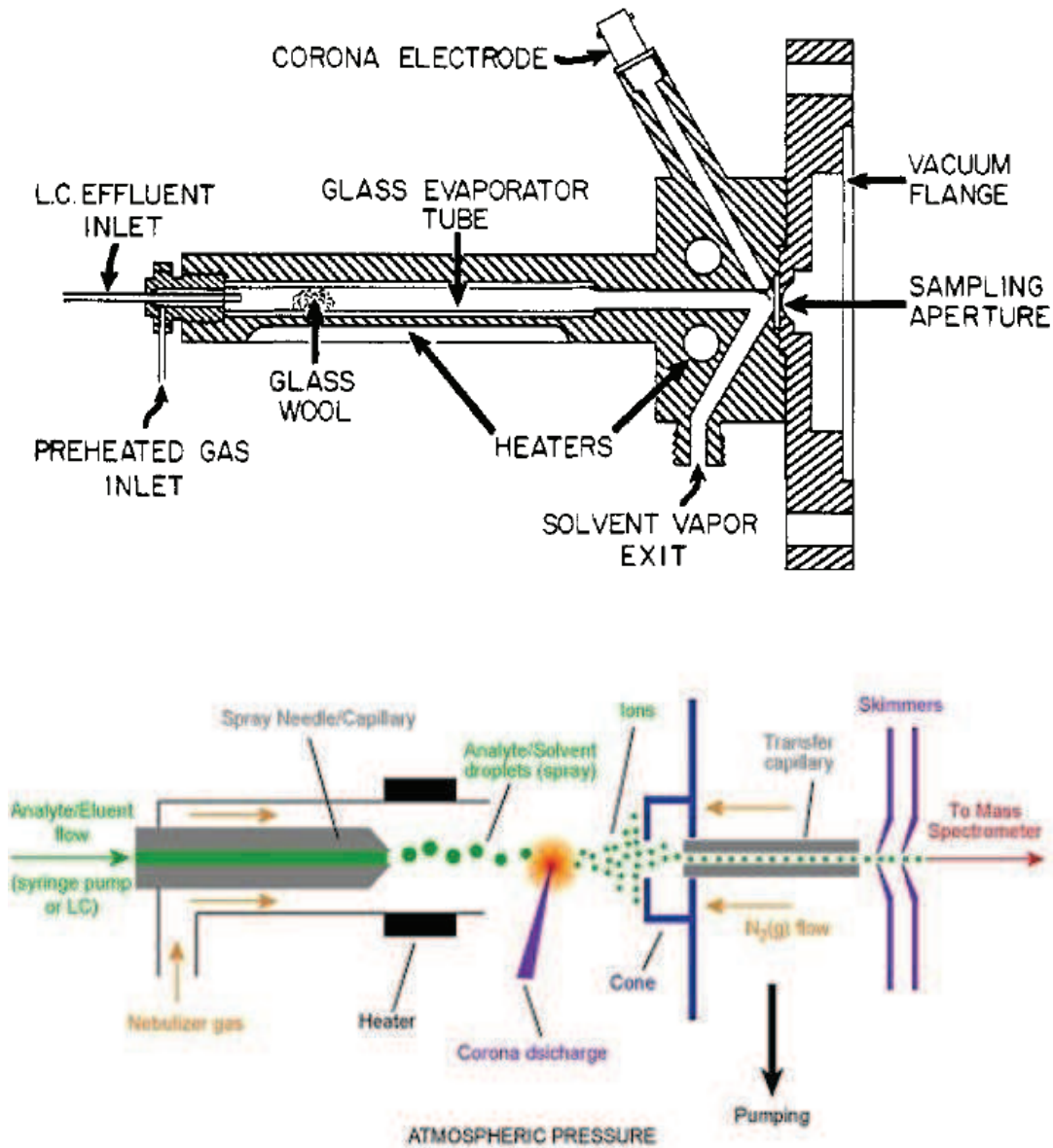


Figure I-4 : Schémas d'une source APCI. L'analyte solvatoé (ici issu d'une LC) est nébulisé par un gaz chauffé, le spray est désolvatoé dans une chambre de désolvatoé, les molécules sont ionisées par une décharge corona puis introduites dans le spectrométre de masse via un capillaire de transfert et un skimmer (d'après [23] et le département de Chimie de l'université de Pittsburgh)

1.3 Principe du piégeage d'ions dans des pièges radiofréquences

Un spectromètre de masse doit être capable de réaliser une séparation en masse des ions qui y sont introduits (cf. section I.4 page 40) mais aussi, pour certaines applications, de les piéger et de les conserver afin de réaliser certaines opérations sur eux (accumulation d'ions afin d'augmenter le SNR¹ et donc la sensibilité ou fragmentation afin d'augmenter la spécificité, cf. section I.6 page 47).

1.3.1 Théorème d'Earnshaw

Le point fondamental du piégeage d'ions est de parvenir à confiner leur mouvement dans l'espace des phases. Cet objectif ne peut être atteint qu'en parvenant à confiner les ions dans un puits de potentiel, c'est-à-dire au voisinage d'un minimum local d'énergie potentielle.

Cette condition ne saurait être satisfaite par aucun champ électrostatique en vertu du théorème d'Earnshaw [24]–[26] :

Un ensemble de charges ponctuelles ne peut être maintenu en équilibre stable par des interactions électrostatiques.

La preuve de ce théorème fondamental peut être obtenue simplement en considérant l'équation de Laplace qui décrit l'évolution spatiale d'un potentiel électrostatique dans le vide :

$$\Delta U = 0 \quad \text{I-1}$$

L'équation I-1 implique que le potentiel électrostatique U n'admet pas d'extremum dans le vide ce qui exclut la possibilité d'avoir une position d'équilibre stable dans un champ électrique indépendant du temps.

Cette limitation intrinsèque explique la nécessité d'utiliser des champs électriques dépendants du temps pour confiner les ions dans l'espace des phases. Cette approche permet, dans un piège quadrupolaire, de générer un champ radiofréquence qui se comporte en première approximation comme un puits de potentiel quadratique. Cette approche sera développée plus avant à la section II.1.1.3 (page 74).

¹ Signal to Noise Ratio – Rapport Signal sur Bruit

I.3.2 Géométries utilisées

Comme il a déjà été noté au I.1.2 les géométries des pièges radiofréquence peuvent être diverses. On notera en particulier les pièges bidimensionnels et les pièges tridimensionnels, dont les particularités sont décrites dans les deux sections ci-après.

I.3.2.1 Pièges bidimensionnels

Les pièges bidimensionnels (désignés par l'acronyme LIT¹), bien qu'historiquement postérieurs aux pièges tridimensionnels, sont aujourd'hui couramment utilisés dans les spectromètres de masse commerciaux. Ils ont en particulier l'avantage d'avoir un volume utile plus important que les pièges tridimensionnels, ce qui permet de stocker un nombre plus important d'ions sans que les effets de charge d'espace n'interfèrent avec le fonctionnement du piège (cf. section II.2.2 page 91).

Dans la famille des pièges bidimensionnels, deux sous-types de géométrie sont fréquemment employés :

- Les pièges à électrodes hyperboliques ;
- Les pièges à électrodes cylindriques.

Ces deux géométries fonctionnent sur le même principe de base et ont, au premier ordre, un comportement similaire vis-à-vis des ions piégés. Elles ne diffèrent que sur la section des électrodes utilisées (hyperbolique pour l'une, circulaire pour l'autre) et cette différence se répercute sur la difficulté d'usinage des électrodes. C'est pourquoi la plupart des instruments commerciaux utilisant la technologie LIT sont pourvus d'électrodes cylindriques, plus faciles à usiner et par conséquent moins chères (cf. [27]-[29]).

Si le confinement des ions dans le plan transverse est réalisé grâce aux radiofréquences imposées sur les barres du piège, leur confinement dans l'axe du LIT se fait quant à lui à l'aide d'optiques ioniques situées à l'entrée et à la sortie du piège.

I.3.2.1.1 Pièges à électrodes hyperboliques

Les pièges à électrodes hyperboliques sont constitués de quatre électrodes de section hyperbolique équilatère (cf. Figure I-5 et Figure I-6).

¹ Linear Ion Trap

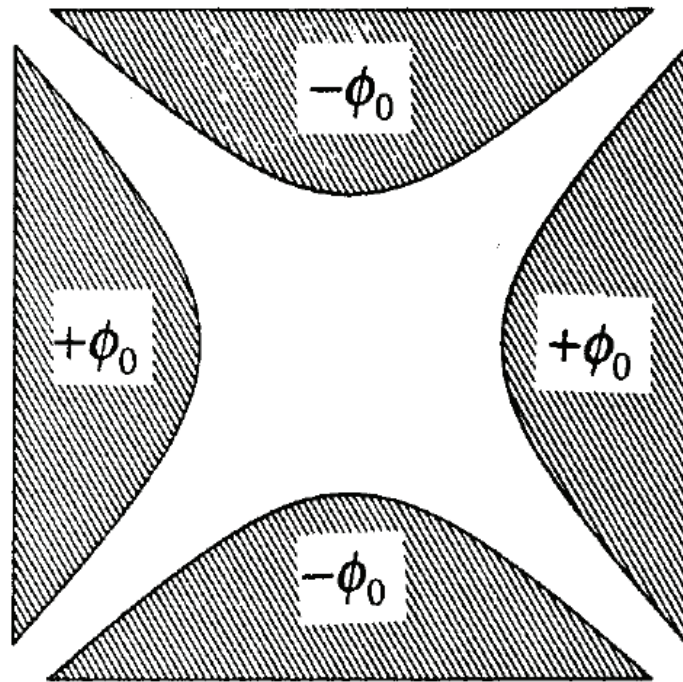


Figure I-5 : Section transverse d'un LIT à géométrie hyperbolique (d'après [30])

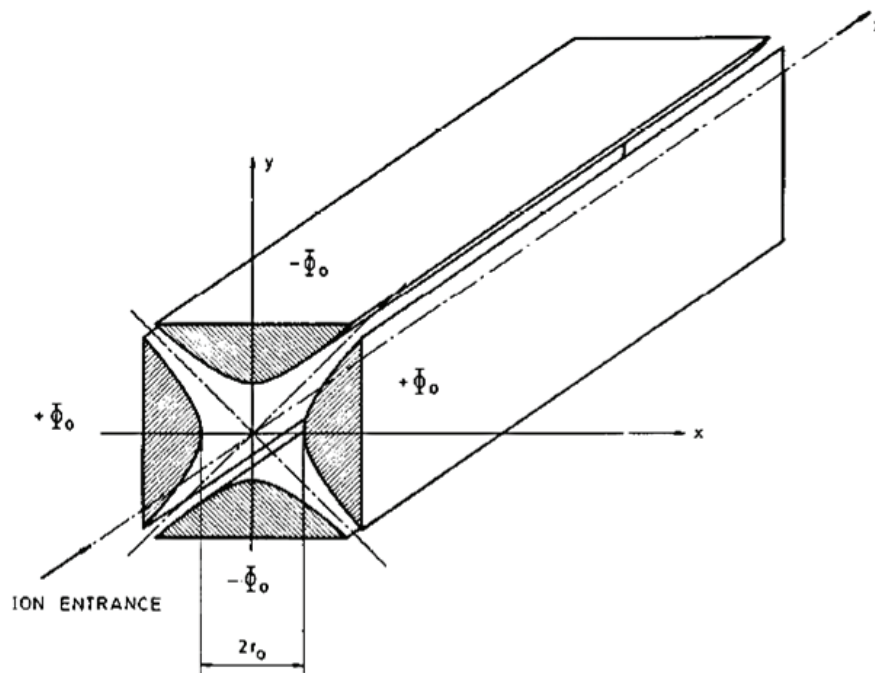


Figure I-6 : LIT à géométrie hyperbolique, vue isométrique (d'après [31])

Dans cette configuration, une paire d'électrodes se faisant face est portée au potentiel ϕ_0 tandis que l'autre est portée au potentiel $-\phi_0$. Ainsi le potentiel total généré dans le plan transverse Oxy prend la forme (cf. [30]–[32]) :

I.3 Principe du piégeage d'ions dans des pièges radiofréquences

$$\phi(x, y) = \phi_0 \frac{x^2 - y^2}{r_0^2} \quad \text{I-2}$$

Où les variables x et y représentent respectivement la distance au centre selon l'axe x et selon l'axe y et où la constante géométrique r_0 représente la distance des électrodes à ce même centre (cf. Figure I-6).

Il est à noter que l'équation I-2 peut s'écrire sous la forme polaire suivante :

$$\phi(r, \theta) = \phi_0 \frac{r^2}{r_0^2} \cos 2\theta \quad \text{I-3}$$

La forme de l'équation I-3 permet de mettre en évidence le terme quadrupolaire pur $r^2 \cos 2\theta$ (cf. [31], [33]). Le comportement d'ions dans un tel potentiel pouvant être analytiquement prévu (cf. section II.1.1 page 67), l'utilisation d'électrodes hyperboliques en simplifie grandement l'étude.

I.3.2.1.2 Pièges à électrodes cylindriques

Les pièges linéaires à électrodes cylindriques sont une simplification de la géométrie des pièges à électrodes hyperboliques vus plus haut. Ils sont constitués de quatre électrodes de section circulaire de rayon r_e ; deux électrodes disposées en diagonale étant portées au potentiel ϕ_0 tandis que les deux autres sont portées au potentiel $-\phi_0$ (cf. Figure I-7).

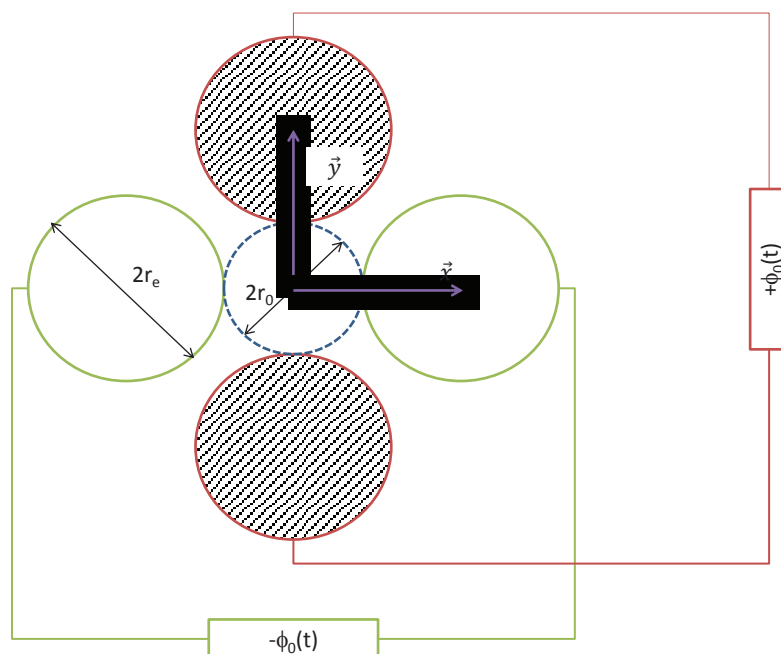


Figure I-7 : Coupe transversale d'un LIT à électrodes cylindriques

Lorsque les électrodes sont parallèles et symétriquement placées, ce système génère en son centre un potentiel de la forme (cf. [34]) :

$$\phi(r, \theta) = \phi_0 \sum_{n=0}^{\infty} C_{4n+2} \left(\frac{r}{r_0}\right)^{4n+2} \cos(4n+2)\theta \quad \text{I-4}$$

Les coefficients C_{4n+2} de l'équation I-4 représentent les contributions des termes multipolaires (C_2 et C_6 , représentent les poids des termes respectivement quadrupolaire et dodécapolaire, par exemple).

En particulier, afin de s'approcher du cas idéal purement quadrupolaire, on peut chercher à annuler le terme C_6 . Reuben *et al.* ont montrés de façon analytique (cf. [34]) que cela se produisait lorsque $\frac{r_e}{r_0} \cong 1,14511$.

Bien que le cas où les contributions dodécapolaires et au-delà peuvent être considérées comme négligeables soit a priori préférable (les termes non quadrupolaires diminuant la résolution en masse du LIT en mode analyseur, cf. [35] et section II.2.1 page 87), certains systèmes possédant des termes non quadrupolaires peuvent exhiber des propriétés intéressantes, en particulier en améliorant le rendement de la CID¹ (cf. [36] et section I.6.2.2 page 53). De surcroît, optimiser $\frac{r_e}{r_0}$ afin d'annuler le terme C_6 conduit à une situation où le terme C_{10} apporte une contribution non négligeable au champ électrique, diminuant d'autant la linéarité, et donc la résolution en masse du LIT.(cf.[28], [32], [37]). Un ratio $\frac{r_e}{r_0} \cong 1,128$ permet une compensation partielle des effets du terme C_6 par le terme C_{10} et donc améliore les performances du LIT (cf. [28]).

1.3.2.2 Pièges tridimensionnels

Les pièges tridimensionnels (ou pièges 3D ou encore QIT² ou QUISTOR³) ont historiquement été inventés en même temps que les analyseurs linéaires à électrodes hyperboliques (ou QMF⁴, cf. [38], [39]). Ils sont constitués d'une électrode annulaire en forme d'hyperboloïde de révolution à une nappe, coiffée de deux électrodes « chapeaux » en forme d'hyperboloïde de révolution à deux nappes (cf. Figure I-8 et Figure I-9).

¹ Collision Induced Dissociation

² Quadrupole Ion Trap

³ QUadrupole Ion STORE

⁴ QUadrupole Mass Filter

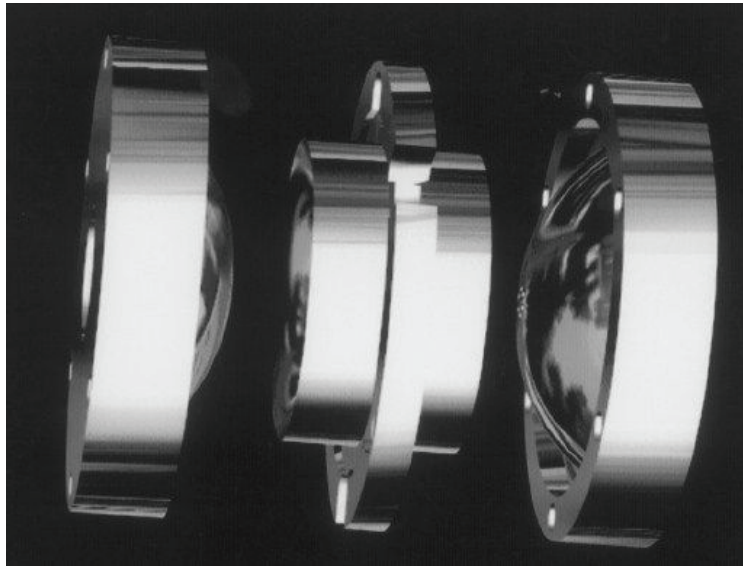


Figure I-8 : Piège tridimensionnel (d'après [40])

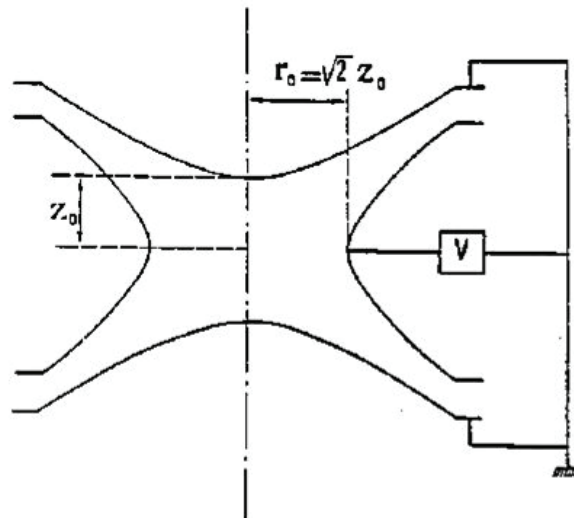


Figure I-9 : Schéma de principe d'un piège tridimensionnel (d'après [41])

Les deux électrodes chapeaux sont portées au même potentiel ϕ_0 tandis que l'électrode annulaire est portée au potentiel $-\phi_0$ (cf. Figure I-9 en considérant une masse flottante ; d'après [42]). Ce mode de fonctionnement correspond au fonctionnement du LIT tel que décrit à la section I.3.2.1 (page 34) lorsque l'on considère que le piège 3D est topologiquement équivalent à un LIT à électrodes hyperboliques replié sur lui-même dont la barre intérieure serait réduite à un point fictif (cf. [29]).

Afin de produire un potentiel rigoureusement quadrupolaire la surface des électrodes doit satisfaire les conditions suivantes (cf. [29], [43]) :

$$\begin{aligned} r^2 - 2z^2 &= r_0^2 \text{ (électrode annulaire)} & \text{I-5} \\ r^2 - 2z^2 &= -2z_0^2 \text{ (électrodes chapeau)} \end{aligned}$$

Il est à noter que, dans l'équation I-5, il n'y a pas de contraintes sur le ratio $\frac{r_0}{z_0}$. Cependant Knight a montré (cf. [43]) que le ratio $\frac{r_0}{z_0} = \sqrt{2}$ conduit à une géométrie plus symétrique dans laquelle les asymptotes du système bissectent l'espace entre l'électrode annulaire et les électrodes chapeaux. Cette configuration permet de simplifier quelque peu les équations du mouvement des ions dans le piège mais son utilisation n'est en rien obligatoire.

I.4 *Principe de l'analyse en masse dans les pièges radiofréquences*

Les pièges radiofréquences, qu'ils soient linéaires ou tridimensionnels permettent de stocker un nuage d'ions de rapport masse/charge compris dans une plage imposée par le choix des paramètres des radiofréquences (formes et amplitudes des tensions, fréquences...). Les ions stockés peuvent être à tout moment déstabilisés par un changement de ces paramètres et expulsés du piège. Ils peuvent alors être soit perdus (c'est-à-dire s'échapper du piège ou encore entrer en collision avec les électrodes) soit envoyés via des optiques ioniques vers un détecteur (cf. [44]). C'est sur ce principe de déstabilisation spécifique des ions en fonction de leur ratio masse/charge que fonctionne l'analyse en masse dans les pièges radiofréquences qui ont été utilisés pour ce travail.

I.4.1 *Géométries d'éjection, effets de bords*

Lorsque des ions stockés dans un piège sont déstabilisés, ils sortent de la zone où ils étaient confinés, cette zone étant située au voisinage du centre géométrique (qui est un point dans le cas d'un piège 3D ou un axe dans le cas d'un piège 2D) du piège. Leur trajectoire les amène alors à proximité des électrodes, là où les défauts de celles-ci ont un effet non négligeable sur la nature du potentiel électrique. Ces effets sont appelés effets de bords et sont d'une importance capitale pour canaliser les ions déstabilisés vers le détecteur. Ces effets existent aussi bien dans les pièges tridimensionnels que dans les pièges linéaires (en particulier à cause des ouvertures pratiquées dans les électrodes pour pouvoir faire entrer et sortir les ions) mais ils ne seront pas étudiés dans ce mémoire, aussi l'étude sera limitée aux effets de bords dans les LIT.

I.4.1.1 *Effets de bords dans les LIT*

Les effets de bord dans les LIT sont dus, d'une part, à la finitude spatiale du système (les électrodes sont tronquées dans le sens de leur longueur) mais aussi, d'autre part, aux optiques ioniques situées à leurs extrémités dont le rôle est justement de faciliter l'extraction des ions de ratio masse/charge désiré vers le détecteur (ou plus généralement vers d'autres parties du système). Il est à noter aussi que les effets de bords sont mis à profit à l'entrée des LIT pour faciliter l'admission des ions dans le piège (cf. [45]).

Dans un piège quadrupolaire linéaire idéal (cf. section II.1 page 67) les équations du mouvement dans le plan transversal Oxy et selon l'axe longitudinal Oz sont découplées, c'est-à-dire que la position et la vitesse d'un ion dans le plan transversal n'influence pas sa position et sa vitesse sur l'axe longitudinal (cf.[28]). Si cette dernière approximation est vraie au centre du piège, elle ne l'est plus près de ses extrémités (cf. [28], [46]).

Deux solutions techniques sont alors possibles pour éjecter du piège les ions à détecter :

- L'éjection axiale (utilisée en particulier dans l'instrument 2000 QTrap¹) ;
- L'éjection radiale.

Il est à noter que l'éjection axiale ne nécessite pas que les ions soient piégés dans le quadripôle, le système fonctionne alors comme un filtre en masse (un QMF) tandis que la méthode d'éjection radiale ne fonctionne qu'en mode LIT (cf. [28]).

1.4.1.2 Éjection axiale

Dans le cas d'une éjection dans l'axe du LIT, le détecteur ou les optiques de sortie sont montés dans le prolongement du piège selon l'axe Oz.

Les effets de bord assurent qu'à proximité des extrémités du piège, le couplage entre le mouvement dans le plan transversal et le mouvement selon l'axe longitudinal permet de transformer une partie de l'énergie cinétique radiale en énergie cinétique axiale (cf. [47]–[49]). Ainsi un ion ayant une grande énergie dans le plan Oxy au centre du piège acquerra par transfert une grande énergie selon l'axe Oz près des extrémités du piège.

Un ion ayant suffisamment d'énergie axiale peut alors pénétrer le « cône de réflexion » décrit par Londry et Hager dans [48] où il subira une force selon l'axe Oz qui l'obligera à sortir du piège (cf. Figure I-10).

Le mouvement selon l'axe z étant, en première approximation, ergodique ; tous les ions stockés dans le piège subiront à un moment donné l'influence des effets de bord, l'échange d'énergie cinétique entre mouvement radial et mouvement axial assure alors que les ions ayant suffisamment d'énergie cinétique dans le plan Oxy puissent franchir le cône de réflexion et être éjectés du piège selon son axe z et ainsi atteindre le détecteur.

Le point d'achoppement de cette méthode est le contrôle de l'énergie radiale des ions. Ce contrôle se fait naturellement, et ce de façon discriminante vis-à-vis du ratio masse/charge, par le choix des caractéristiques des radiofréquences appliquées au piège (cf. section II.3.1.2 page 101).

Il est à noter par ailleurs que la conception d'un système à éjection axiale permet d'envisager de coupler l'analyseur avec d'autres instruments (par exemple un second analyseur afin de réaliser une analyse en masse en tandem spatial, cf. section I.6.3.1 page 53), ce qui n'est pas réalisable avec un système à éjection radiale (cf. section I.4.1.3).

¹ Applied Biosystems/MDS Sciex

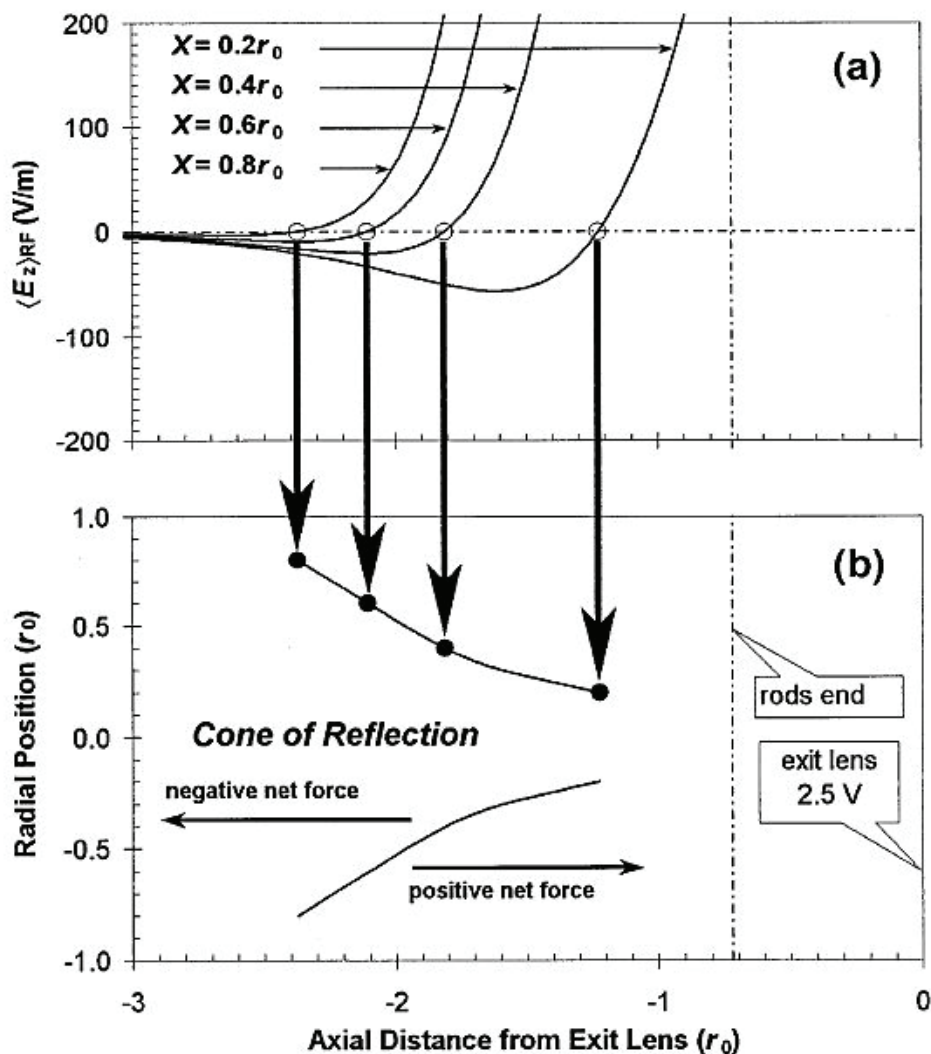


Figure I-10 : Représentation en fonction de la distance à la sortie du détecteur de : a) E_z , le champ électrique axial, une valeur négative de E_z ramenant les ions vers le centre du détecteur, une valeur positive les en éloignant; b) La position du cône de réflexion selon la distance à l'axe (d'après [48])

1.4.1.3 Éjection radiale

L'autre solution technique possible consiste à placer l'entrée du détecteur perpendiculairement à l'axe du quadripôle, il s'agit alors d'un système à éjection radiale. Afin de permettre aux ions déstabilisés de sortir du LIT, une ou plusieurs fentes sont creusées dans les électrodes (cf. [28], [50], [51] et Figure I-11).

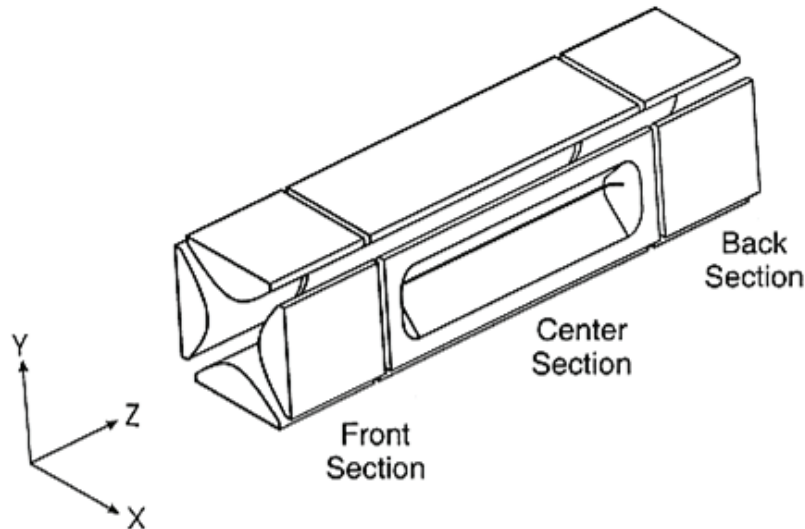


Figure I-11 : LIT à éjection radiale. La segmentation des électrodes (Front section et Back section) permet d'améliorer l'admittance du système en ajustant les valeurs des champs RF dans l'espace (d'après [51])

La sélectivité en masse de l'éjection s'obtient de la même façon que dans le cas de l'éjection axiale (cf. section I.4.1.2 page 41) et l'étude fine des potentiels dus aux effets de bord n'est plus indispensable. Il faut cependant s'assurer d'une bonne uniformité du champ radiofréquence sur toute la longueur du LIT afin de conserver une bonne résolution en masse, ce qui implique de très faibles tolérances sur la géométrie du système (cf. [48], [51]).

I.4.2 Analyse en masse, considérations physiques

À présent que le principe de l'éjection des ions déstabilisés vers le détecteur ou vers les optiques ioniques de sortie a été décrit il faut étudier les moyens disponibles pour déstabiliser sélectivement les ions d'un ratio masse/charge donné.

Les propriétés du mouvement des ions dans un système quadrupolaire à radiofréquences permettent d'envisager au moins deux méthodes (cf. [52], [53]) lorsque le potentiel appliqué aux électrodes est de la forme :

$$\phi_0(t) = U - V \cos \Omega t \quad \text{I-6}$$

- La première consiste, en mode QMF, à choisir les tensions U et V de l'équation I-6 (à pulsation Ω fixée) de façon à ce que seuls les ions dans une gamme de m/z^1 donnée puissent rester stable dans le QMF et le traverser jusqu'au détecteur : c'est l'analyse à l'apex (cf. section I.4.2.1 page 44) ;

¹ Ratio masse/charge

I.4 Principe de l'analyse en masse dans les pièges radiofréquences

- La seconde consiste, en mode QUISTOR ou LIT, à ajouter au potentiel $\phi_0(t)$ de l'équation I-6 une composante fréquentielle supplémentaire dont la valeur sera choisie de manière à déstabiliser uniquement les ions d'un ratio masse/charge donné dans le piège : c'est l'analyse par ajout de composantes radiofréquences (cf. section I.4.2.2 page 45).

I.4.2.1 Analyse à l'apex

Les propriétés du mouvement des ions en présence d'un champ quadrupolaire variant dans le temps comme décrit dans l'équation I-6 seront étudiées plus avant à la section II.1.1 (page 67). Cependant on peut d'ores et déjà noter qu'à pulsation Ω fixée, la stabilité ou l'instabilité des ions ne dépend que de la valeur de U , de V et de m/z (cf. Figure I-12 et [54]).

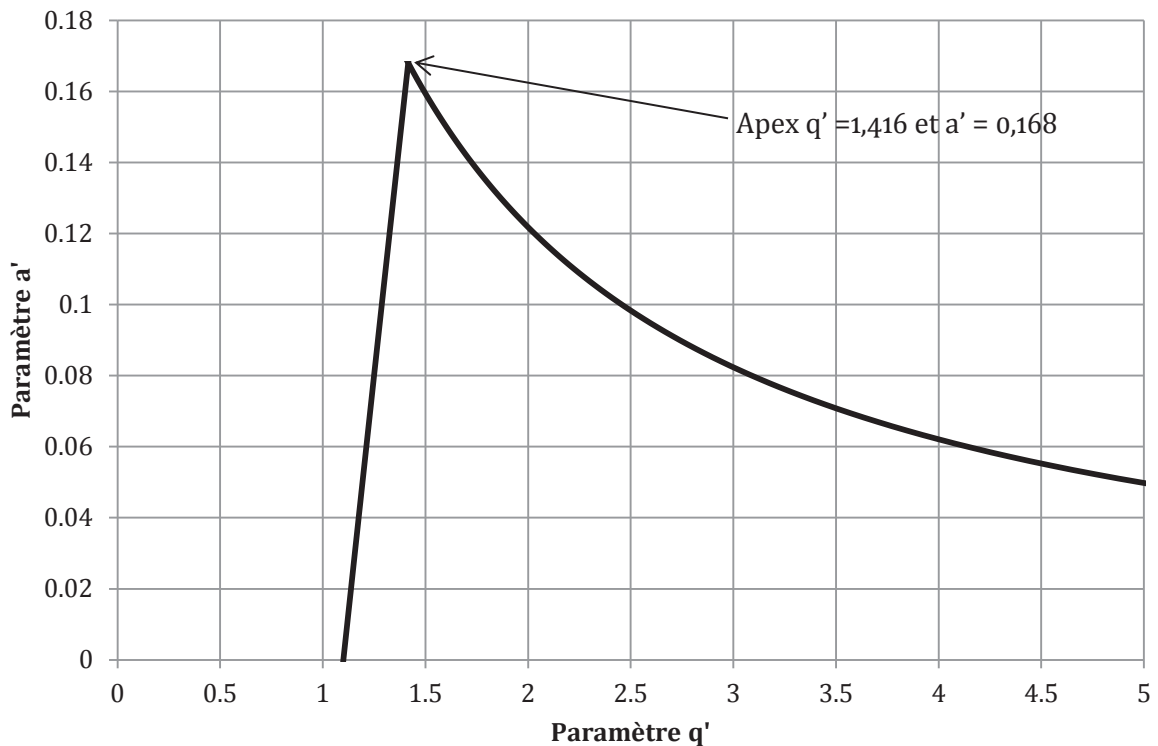


Figure I-12 : Diagramme de stabilité lorsque $\phi_0(t) = U - V \cos \Omega t$. En abscisse le paramètre q' est proportionnel à m/z et inversement proportionnel à V , en ordonnée le paramètre a' est égal à U/V . Les ions compris dans la zone sous la courbe sont stables, ceux qui sont à l'extérieur sont instables

La Figure I-12 est une représentation d'un diagramme de stabilité des ions dans un QMF. Cette représentation diffère des représentations couramment utilisées (diagrammes de Mathieu) et qui seront étudiées plus loin (cf. section II.1.1.2 page 69). Elle permet cependant de comprendre le fonctionnement de l'analyse à l'apex : en fixant le paramètre $a' = U/V$ à la valeur 0,168 seuls les ions tels que le paramètre $q' \propto \frac{(m/z)}{V}$ vaille 1,41 pourront traverser le QMF et atteindre les optiques de sortie (cf. [47], [48], [55], [56]).

Donc, en faisant varier conjointement les valeurs de U et de V et en maintenant leur rapport constant, le QMF sera en mesure de laisser passer sélectivement les ions de ratio masse/charge désirés et ainsi réaliser un balayage en masse.

1.4.2.2 Analyse par ajout de composantes radiofréquences

En mode QUISTOR ou LIT, le piège contient a priori des ions de ratios masse/charge différents. Comment alors éjecter sélectivement les ions d'un ratio donné tout en conservant les autres dans le piège ? Cette question peut être résolue en superposant au potentiel de base décrit dans l'équation I-6 un potentiel d'excitation :

$$\phi_{\text{excitation}}(t) = V_{\text{excitation}} \cos \Omega_{\text{excitation}} t \quad \text{I-7}$$

En effet, les ions dans le piège oscillent à une pulsation Ω_{ion} qui dépend des paramètres de l'équation I-6 et de leur ratio masse/charge (cf. section II.1.1.4 page 76). En choisissant judicieusement la pulsation $\Omega_{\text{excitation}}$ de l'équation I-7 les ions oscillant à la bonne fréquence seront sélectivement excités. Leur énergie cinétique augmentant par résonance (cf. [57]–[59]), ils pourront sortir du piège grâce aux effets de bords (cf. [60]). La tension d'excitation $V_{\text{excitation}}$ est généralement choisie faible devant les tensions U et V de l'équation I-6 afin de ne pas perturber le mouvement des ions qui ne sont pas en résonance avec le potentiel d'excitation.

Cette méthode permet de conserver les ions non excités dans le piège et donc offre une grande souplesse dans l'utilisation des analyseurs en masse. Cependant elle requiert une analyse fine du comportement physique des ions dans un piège quadrupolaire et nécessite une électronique de commande supplémentaire afin de générer le potentiel d'excitation et de l'ajouter au potentiel de confinement.

Il est à noter que cette technique est historiquement antérieure à l'analyse à l'apex : elle est décrite dans le brevet de Paul et Steinwedel de 1953 (cf. [44]).

I.5 Principes de la détection d'ions

Une fois les ions d'intérêts sélectionnés par l'analyseur et éjectés, ceux-ci doivent pouvoir être détectés afin d'obtenir un signal utilisable. Un détecteur idéal ne doit pas émettre un signal dépendant de la masse de l'ion qui l'atteint. Les détecteurs actuels détectent soit un courant d'ions (cylindre de Faraday) soit un courant électronique suite à la collision de l'ion avec une surface (EM¹ – multiplicateurs d'électrons ou multiplicateur de photons). Seuls les EM à dynodes discrètes seront brièvement décrits ici car il s'agit de la technologie utilisée par le dispositif expérimental utilisé durant ce travail (cf. section III.2 page 122).

Le principe de base de fonctionnement d'un EM à dynodes discrètes est le suivant : lorsqu'un ion ou un électron frappe une dynode (composant en verre dopé au plomb ou en semi-conducteur) portée à un haut potentiel (positif ou négatif selon que les ions à détecter sont des cations ou des anions) des électrons secondaires sont émis. Ceux-ci peuvent alors rebondir sur la dynode suivante qui émettra alors à son tour plusieurs électrons secondaires pour chaque électron qui l'atteindra (cf. Figure I-13). Un gain total de 10^4 à 10^8 peut être atteint pour un tel système composé de 12 à 24 dynodes.

L'intensité du signal électronique émis ne dépend donc au final que du nombre d'ions atteignant le détecteur. Cette propriété permet de compter le nombre d'ions traversant le dispositif d'analyse en masse, non seulement quand seuls les ions d'une masse donnée sont sélectionnés (fonctionnement habituel) mais aussi, dans le cas d'une éjection simultanée d'ions de masses différentes (cf. Chapitre IV), lorsque plusieurs ions de différents types atteignent simultanément le détecteur.

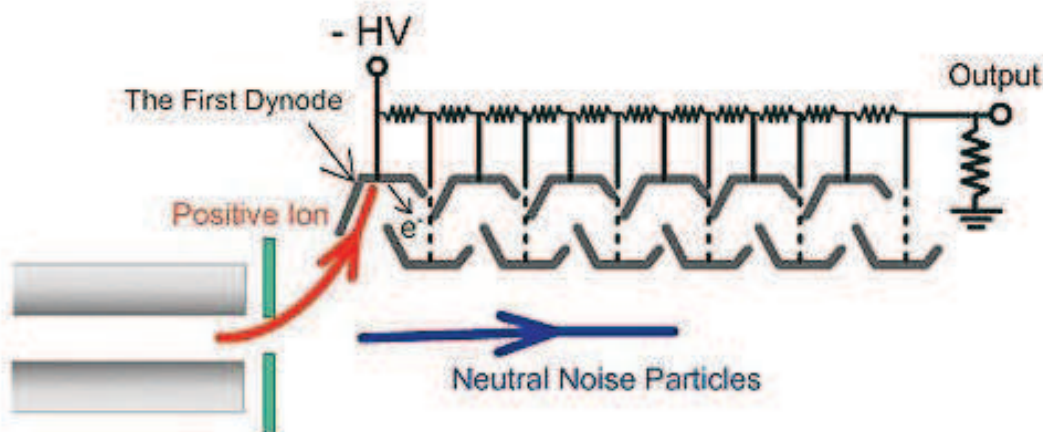


Figure I-13 : Schéma de principe d'un multiplicateur d'électron à dynodes discrètes (d'après Shimadzu Corp., Kyoto, Japon)

¹ Electron Multiplier

1.6 *Couplages de la spectrométrie de masse*

La capacité à détecter et à quantifier la présence d'ions d'un certain ratio masse/charge dans un mélange fait du spectromètre de masse un détecteur performant et polyvalent qu'il est facile d'utiliser en complément de techniques séparatives comme les chromatographies d'élution (GC¹, LC², HPLC³ etc.). Ce couplage permet une double séparation (selon les propriétés physico-chimiques des molécules dans le système chromatographique et selon leur masse dans le spectromètre de masse) voire plusieurs séparations (selon les propriétés de fragmentation des ions moléculaires dans le cas de la MSⁿ, cf. section I.6.2). Cela permet de détecter et d'identifier des molécules dans des mélanges complexes en augmentant la spécificité de la détection, en particulier dans le domaine pharmaceutique et biomédical (cf. [1], [61]–[68] par exemple).

Nous allons ici rapidement étudier le couplage HPLC/MS (cf. section I.6.1 page 47) et MS en tandem (cf. section I.6.2 page 48).

1.6.1 *Couplage HPLC/MS ou LC/MS*

Ce couplage est extrêmement polyvalent et permet de traiter des mélanges de molécules polaires ou apolaires, thermostables ou thermolabiles. Cependant sa mise en œuvre peut être rendue difficile, d'une part en raison des quantités éventuellement importantes de solvant d'élution arrivant à la source, et d'autre part en raison de la nécessité de porter l'éluat en phase gazeuse avant l'ionisation et l'analyse en masse. Cependant des sources telles que l'ESI ou l'APCI peuvent faire face à des débits de l'ordre du mL/min (cf. [1], [64], [69], [70] par exemple). L'introduction de l'intégralité de l'éluat dans la source a pour conséquence directe, à rendement d'ionisation constant, d'augmenter la sensibilité de détection de ces méthodes.

Ce couplage, comme tous les couplages de techniques de chromatographie avec la spectrométrie de masse, génère un tableau de données tridimensionnel : à chaque cycle d'analyse en masse (indexé par le temps d'élution $t_{\text{élution}}$) un spectre de masse est généré, qui est en fait un tableau bidimensionnel donnant pour chaque masse analysée le nombre d'ions de cette masse. C'est ce tableau tridimensionnel ($t_{\text{élution}}$, m/z , nombre d'ions) qu'il faut ensuite traiter (cf. section I.7 page 55).

¹ Gaz Chromatography

² Liquid Chromatography

³ High Performance Liquid Chromatography

I.6.2 Couplages MS/MS, MSⁿ, MRM³

Il est aussi possible de réaliser plusieurs analyses en masse consécutives au sein du même instrument, on parlera alors de MS en tandem. Entre deux étapes d'analyse un processus de dissociation (réaction chimique, CID¹, photodissociation etc.) change la nature d'un ou plusieurs ions et donc leur ratio masse/charge (cf. [22], [71] et Figure I-14). Le cycle « Analyse en masse – Fragmentation – Analyse en masse » peut être exécuté une fois (il s'agit de la MS/MS ou MS²), deux fois (MS/MS/MS ou MS³) et ainsi de suite (MSⁿ où n représente le nombre d'analyses en masse effectuées).

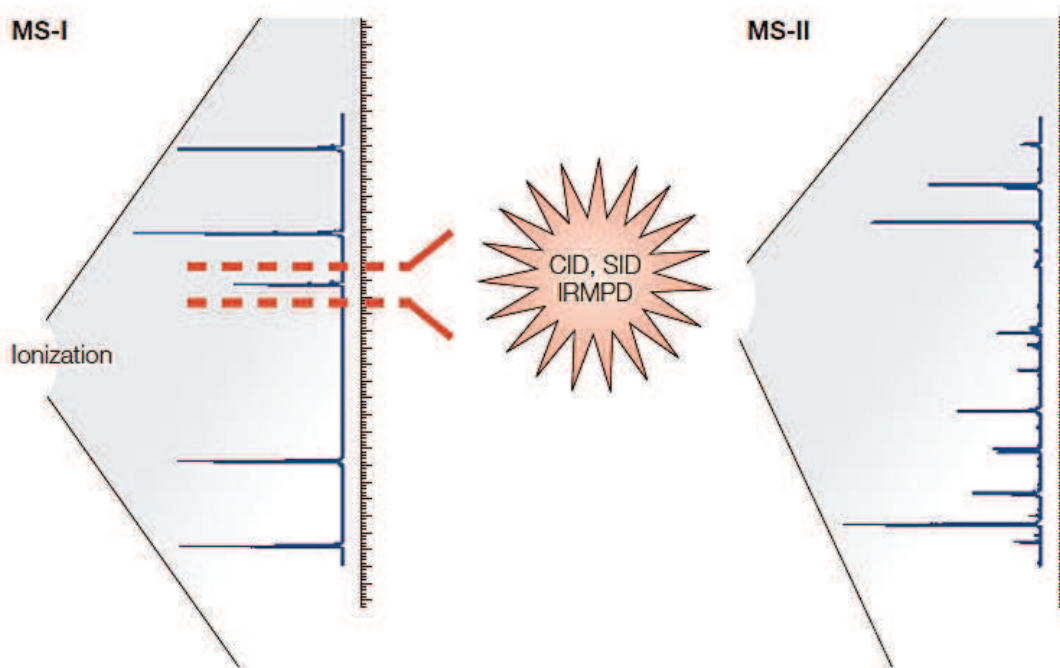


Figure I-14 : Schéma de principe de la MS/MS avec quelques méthodes de fragmentation possibles (CID, SID², IRMPD³) (d'après [22]) : la première étape permet de sélectionner une masse d'ion parent, la seconde permet d'effectuer l'analyse en masse des ions fragments

L'intérêt de cette technique est d'une part de faciliter l'élucidation de la structure chimique des ions analysés et d'autre part de faciliter la détection d'ions minoritaires dans un mélange complexe (cf. [22], [72]).

¹ Fragmentation induite par collision

² Surface Induced Dissociation

³ InfraRed Multi-photon PhotoDissociation

L'analyse MSⁿ peut s'effectuer sur plusieurs dispositifs séparés, chacun de ces dispositifs réalisant une analyse en masse ou une fragmentation : il s'agit d'une spectrométrie de masse en tandem à séparation spatiale. Les instruments couramment utilisés pour réaliser ces analyses utilisent plusieurs LIT ou QMF montés les uns à la suite des autres. C'est en particulier le cas du 2000 QTrap qui sera décrit plus précisément à la section III.2 (page 122). Une autre configuration possible permet de réaliser tous les cycles Analyse – Fragmentation dans le même dispositif de stockage d'ions : il s'agit alors d'une spectrométrie de masse en tandem à séparation temporelle. Les instruments pourvus d'une telle technologie utilisent généralement un QUISTOR en guise de dispositif d'analyse et de stockage d'ions.

Quelle que soit la séparation choisie (spatiale ou temporelle) et la technique de fragmentation utilisée (CID ou autre) il existe quatre modes principaux d'utilisation de la MS/MS (cf. [71]) :

- Le Product Ion Scan (la masse de l'ion parent est fixée, la masse de tous ses fragments est obtenue par un balayage en masse) ;
- Le Precursor Ion Scan (cette méthode ne fonctionne que dans un instrument à séparation spatiale. Le second analyseur fonctionne en mode QMF et ne laisse passer que les ions d'une masse donnée, le premier analyseur réalise un balayage en masse des ions parents) ;
- Le Neutral Ion Scan (cette méthode ne fonctionne que dans un instrument à séparation spatiale. Les deux analyseurs balayent en parallèle mais avec un décalage en masse correspondant à la perte d'un neutre entre l'ion parent et l'ion fragment) ;
- Le Multiple Reactions Monitoring (MRM aussi appelé Selected reaction Monitoring ou SRM).

Le travail présenté dans ce mémoire étant dévolu à l'amélioration de la rapidité du mode MRM c'est celui-ci qui sera décrit plus en détail dans la section suivante.

1.6.2.1.1 Mode MRM

Le mode d'analyse MRM consiste à sélectionner un ion (dit parent ou précurseur) à l'entrée du spectromètre de masse, à le fragmenter puis à détecter la présence d'un ion (dit fragment ou fils) après fragmentation. Le couple ion parent/ion fils forme une « transition » (cf. Figure I-15). Ce mode d'analyse ne nécessite pas de balayage en masse, il est donc plus rapide que les autres modes de MS/MS. Par ailleurs, dans les instruments à séparation spatiale, il est possible d'accumuler les ions parents et les ions fils sur de plus longues périodes de temps et donc d'augmenter la sensibilité de la méthode. Enfin, l'absence de balayage en masse permet de fixer dans le temps les paramètres des potentiels appliqués aux QMF, ce qui améliore la spécificité de la méthode.

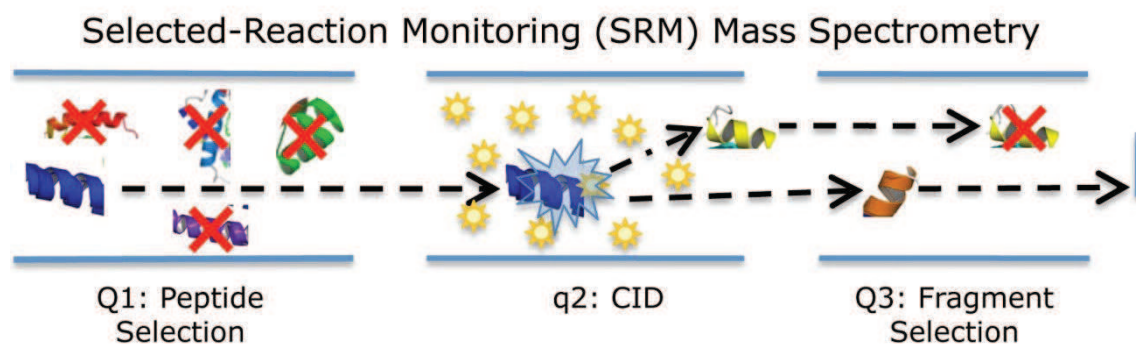


Figure I-15 : Schéma de principe du fonctionnement du mode SRM (identique au mode MRM) (d'après Christopher Petzold - Lawrence Berkeley National Laboratory, USA)

Le mode MRM nécessite, si l'on désire détecter et quantifier une molécule (par exemple un peptide) dans un mélange, de connaître a priori la ou les transitions caractéristiques de cette molécule (cf. [65], [66]). Pour ce faire il faut donc appliquer au préalable d'autres modes d'analyse (Product Ion Scan ou Precursor Ion Scan) et déterminer les transitions caractéristiques ou bien, si l'on travaille sur des molécules connues, utiliser des bases de données expérimentales (cf. [64], [70], [73]). Afin d'augmenter encore la sensibilité et la sélectivité de la méthode, plusieurs transitions issues d'un même ion parent peuvent être successivement suivies dans la même expérience, chaque transition étant généralement suivie pendant 5 à 10 ms (cf. [74]).

Malgré la grande spécificité de cette méthode (en comparaison de celle de la MS simple), il n'y a pas forcément équipotence entre l'ensemble des peptides et l'ensemble des transitions (cf. [75]). Autrement dit, deux peptides différents peuvent être détectés via la même transition, leurs fragments étant isobariques. Il est alors nécessaire de raffiner la méthode, par exemple en utilisant la MRM³.

I.6.2.1.2 Mode MRM³

Le mode MRM³ est un mode d'analyse en MS³ (trois analyses en masse et deux fragmentations) basé sur le mode MRM. Il permet d'améliorer le SNR et donc d'atteindre une plus haute sensibilité que le mode SRM simple (basé sur la MS²) tout en améliorant la spécificité (une amélioration du LOQ¹ et du LOD² de la PSA³ d'un facteur 3 à 5 a été montré par Fortin *et al.* dans [1]).

¹ Limit of Quantitation

² Limit of Detection

³ Prostate-Specific Antigen

Le principe de fonctionnement de ce mode est le suivant : un ion parent est sélectionné, fragmenté, puis un des ions fils est isolé parmi les fragments et fragmenté à nouveau. Le spectre de masse des ions fragments de seconde génération constitue alors la signature de la transition père/fils sélectionnée (cf. Figure I-16). Ce spectre de masse est susceptible de présenter des ions petits-fils caractéristiques de l'ion parent (appelés fragments prototypiques si la molécule à analyser est de nature protéique). Dans le cas où l'analyse se ferait par LC/MRM³, une simple sommation des intensités des ions caractéristiques, en fonction du temps, permet alors de reconstituer un chromatogramme temporel (cf. Figure I-17).

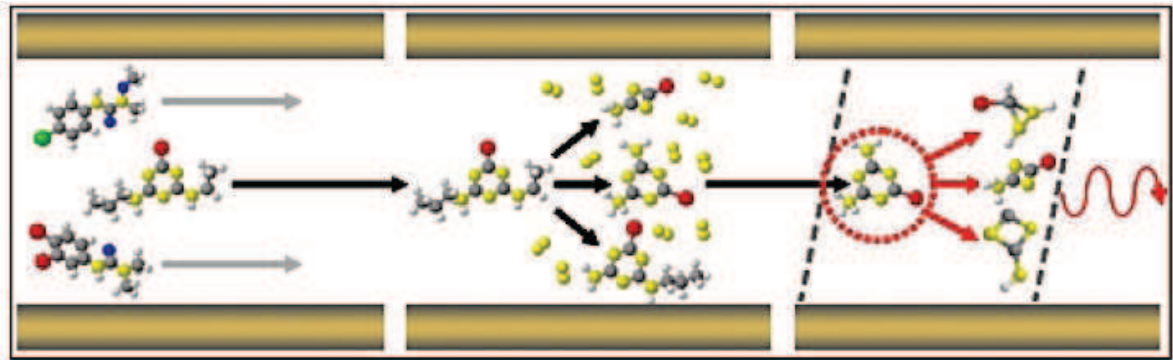


Figure I-16 : Schéma de principe du fonctionnement de la MRM³. À l'issue de la phase SRM, l'ion fils est à nouveau fragmenté, le spectre de masse des fragments est alors obtenu. (d'après ABSciex)

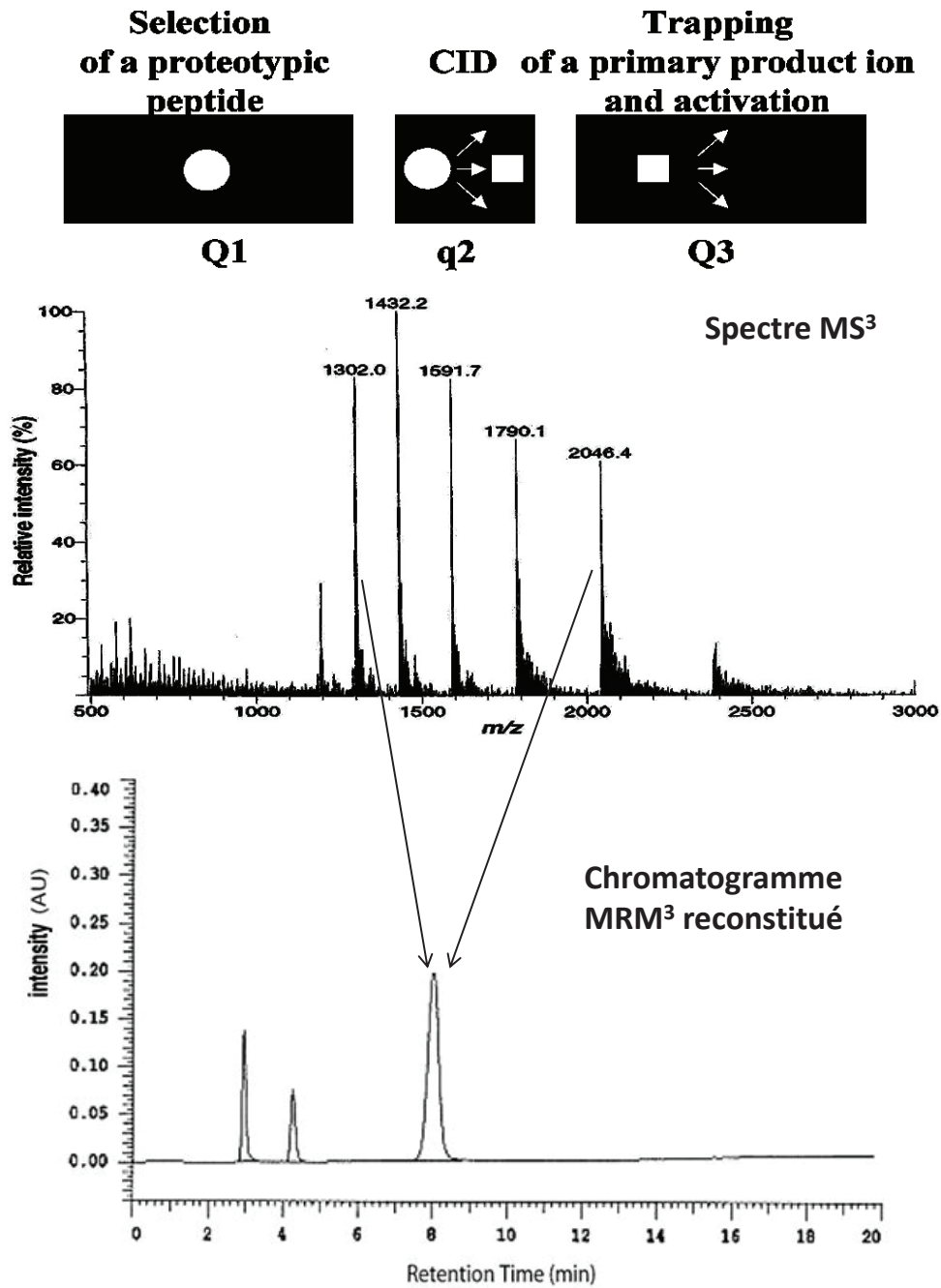


Figure I-17 : Schéma de principe d'une analyse en mode LC/MRM³. À l'issue de la phase SRM, l'ion fils est à nouveau fragmenté, le spectre de masse des fragments permet de détecter des ions « petits-fils » (ou de seconde génération) caractéristiques de la transition sélectionnée. La sommation de leurs intensités au cours du temps permet de reconstituer un chromatogramme

1.6.2.2 Principe de la CID

La technique de fragmentation utilisée par Fortin et al. (cf. [1], [8], [9], [64], [70]), dont les travaux sont à la base de cette étude, est la CID. C'est aussi la technologie de fragmentation la plus classique. C'est donc cette technologie qui sera plus particulièrement développée ici.

La technique de fragmentation induite par collision (Collision Induced Dissociation) utilise la possibilité d'exciter sélectivement les ions d'une masse donnée dans un QUISTOR en imposant aux électrodes du piège un potentiel radiofréquence de fréquence égale à celle du mouvement des ions dans le piège.

En présence d'un gaz, les ions excités par les radiofréquences peuvent entrer en collision avec les molécules du gaz (souvent de l'hélium ou du diazote, mais d'autres gaz plus lourds peuvent être utilisés cf. [76]) avec une grande énergie (de quelques eV à quelques keV selon l'instrument d'après [77]) et se fragmenter (cf. [78], [79]). Ce processus se déroule en deux étapes(cf. [79]) :

- La première : l'ion excité (c'est-à-dire : avec une grande énergie cinétique) entre en collision avec une molécule de gaz, une partie de l'énergie translationnelle de cet ion est convertie en énergie interne ;
- La seconde : l'ion excité (c'est-à-dire avec une grande énergie interne) se fragmente.

Pour un ion donné, la nature et les proportions relatives des fragments dépendent de la nature et de la pression du gaz mais aussi du temps et de l'énergie d'excitation (cf. [80]–[82]). Ces paramètres influent aussi sur le nombre de collisions qu'un ion peut subir (et donc sur l'énergie interne qu'il peut acquérir) avant de se fragmenter (cf. [83]).

1.6.3 Mise en œuvre

Suivant le type d'instrument utilisé, la fragmentation par CID peut être effectuée directement dans l'analyseur de masse (il s'agit d'une conception temporelle) ou bien dans une cellule de collision dédiée (conception spatiale).

1.6.3.1 Dans un spectromètre de masse en tandem spatial

Les instruments à séparation spatiale sont en général constitués de deux analyseurs successifs (permettant de sélectionner les ions parents et d'analyser les fragments) séparés par une cellule de collision. Ce type d'instrument est souvent composé de LIT et de QMF suivant un montage QqQ (trois quadripôles dont le second est porté à plus haute pression (environ 10^{-4} Torr cf. [84]) et sert de cellule de collision). Il s'agit par exemple du mode de fonctionnement de l'appareil 2000 QTrap d'ABSciex (cf. Figure I-18).

I.6 Couplages de la spectrométrie de masse

Les ions à fragmenter sont sélectionnés et sélectivement expulsés du premier quadripôle Q1 avec une grande énergie translationnelle. Lorsque ces ions entrent dans la cellule de collision q2 ils subissent quelques collisions très énergétiques qui conduisent à leur fragmentation.

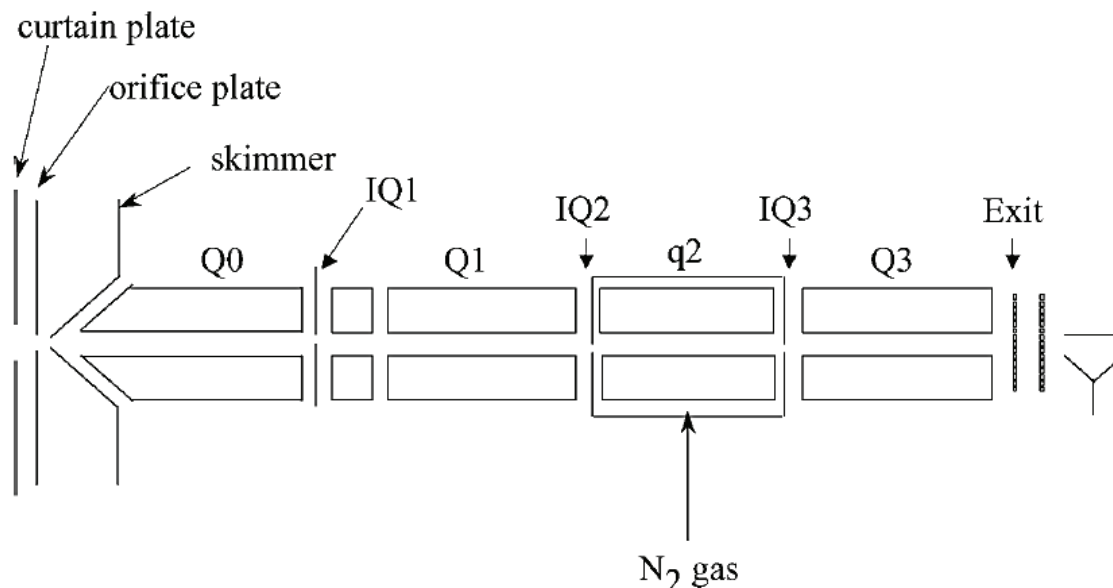


Figure I-18 : Schéma d'un appareil de type QqQ (à l'instar du 2000QTrap d'ABSciex), q2 représente la cellule de collision sous diazote, Q1 et Q3 sont des QMF (dans le cas du 2000QTrap, Q3 peut aussi fonctionner en mode LIT et servir de cellule de collision annexe). Les IQ représentent les optiques d'entrée/sortie et Q0 est un quadripôle servant de guide d'ions, d'après [84]

I.6.3.2 Dans un spectromètre de masse en tandem temporel

En l'absence de LIT, les spectromètres de masses linéaires nécessitent autant de QMF que d'étapes d'analyse ou de fragmentation pour permettre la spectrométrie de masse en tandem (trois quadripôles pour faire de la MS², cinq pour faire de la MS³, etc.). Cette conception augmente la complexité et donc le coût du spectromètre. Dans le cas de la séparation temporelle un seul quadripôle monté en LIT ou en QUISTOR est requis. Celui-ci sert alors tout à la fois d'analyseur et de cellule de collision. Le gaz neutre de collision (qui sert aussi de gaz de refroidissement, cf. section II.2.3 page 93) est présent à tout instant dans le piège, c'est l'application d'un potentiel d'excitation qui permet d'accélérer les ions et de passer d'un régime de thermalisation à un régime de fragmentation par CID (cf. section II.2.3 page 93).

Dans ce mode de fragmentation, les ions à fragmenter sont sélectivement excités par l'application d'un potentiel RF à une fréquence judicieusement choisie pour permettre leur mise en résonance. Les ions ainsi excités subissent alors un grand nombre de collisions avec les molécules du gaz neutre durant un temps d'activation défini au préalable par l'utilisateur. Ces collisions permettent la conversion de l'énergie translationnelle acquise par résonance en énergie interne, ce qui conduit à la fragmentation des ions excités.

1.7 *Traitement informatique des données et postprocessing*

Une fois les spectres de masse obtenus, un post-traitement informatique est le plus souvent nécessaire pour parvenir à l'identification des molécules de l'échantillon.

1.7.1 *Cas de la spectrométrie de masse seule*

Dans le cas où l'échantillon est constitué d'un mélange simple de molécules connues dont les spectres de masse sont déjà catalogués et que ce dernier est directement infusé dans le spectromètre de masse, il est alors possible de procéder à l'identification des molécules du mélange par comparaison de son spectre avec les spectres des collections standardisées. Dans le cas contraire un post-traitement plus poussé, éventuellement automatisé, devra être effectué.

1.7.1.1 *Détermination de l'état de charge d'un ion et de sa masse*

La détermination de la charge d'un ion dans un spectre de masse peut se faire de deux façons (cf. [85]) :

- Soit par l'identification de plusieurs pics correspondant au même ion mais à des états de charges différents (éventuellement avec des adduits) ce qui permet de remonter à la masse de l'ion et donc à la position de ses états de charges dans le spectre ;
- Soit, sur les instruments suffisamment résolus, par l'analyse des écarts entre deux pics successifs du massif isotopique correspondant à l'ion analysé.

Une fois déterminée la charge des ions dans le spectre de masse, il est aisé de remonter à la masse de l'ion moléculaire qui les a engendré. Le spectromètre de masse trie les données en fonction du ratio masse/charge ; donc connaissant la charge de l'ion, il suffit de la multiplier avec son ratio masse/charge pour remonter à sa masse.

1.7.1.2 *Détermination de la formule brute d'un ion et de sa structure*

La détermination de la formule brute d'un ion peut s'effectuer :

- Sur les instruments à très haute résolution, et sur les faibles masses, par la détermination de la masse exacte de la molécule (chaque atome ayant un défaut de masse caractéristique) ;
- Par l'analyse des distributions d'intensité dans un massif isotopique (cf. [86]–[89]).

I.7 Traitement informatique des données et postprocessing

La détermination de sa structure moléculaire demande généralement une connaissance a priori du type de molécule (peptide, polymère, oloside etc.) et une analyse MS^n permet d'identifier les fragments de la molécule et donc de remonter à sa structure. Il est ainsi possible de déterminer de novo la structure d'un peptide (cf. [90]) ou de séquencer un oligomère d'ADN (cf. [91]) par exemple.

I.7.2 Cas de la HPLC/ MS^n ou de la LC/ MS^n

Dans le cas d'un couplage LC/MS ou HPLC/MS les spectres de masse sont indexés par le temps de rétention de l'éluat dans la colonne de chromatographie. Ceci permet de tracer un chromatogramme en intégrant sur chaque spectre de masse l'intensité des pics caractéristiques de la substance à étudier et en reportant la valeur obtenue sur un graphe dépendant du temps (cf. Figure I-19).

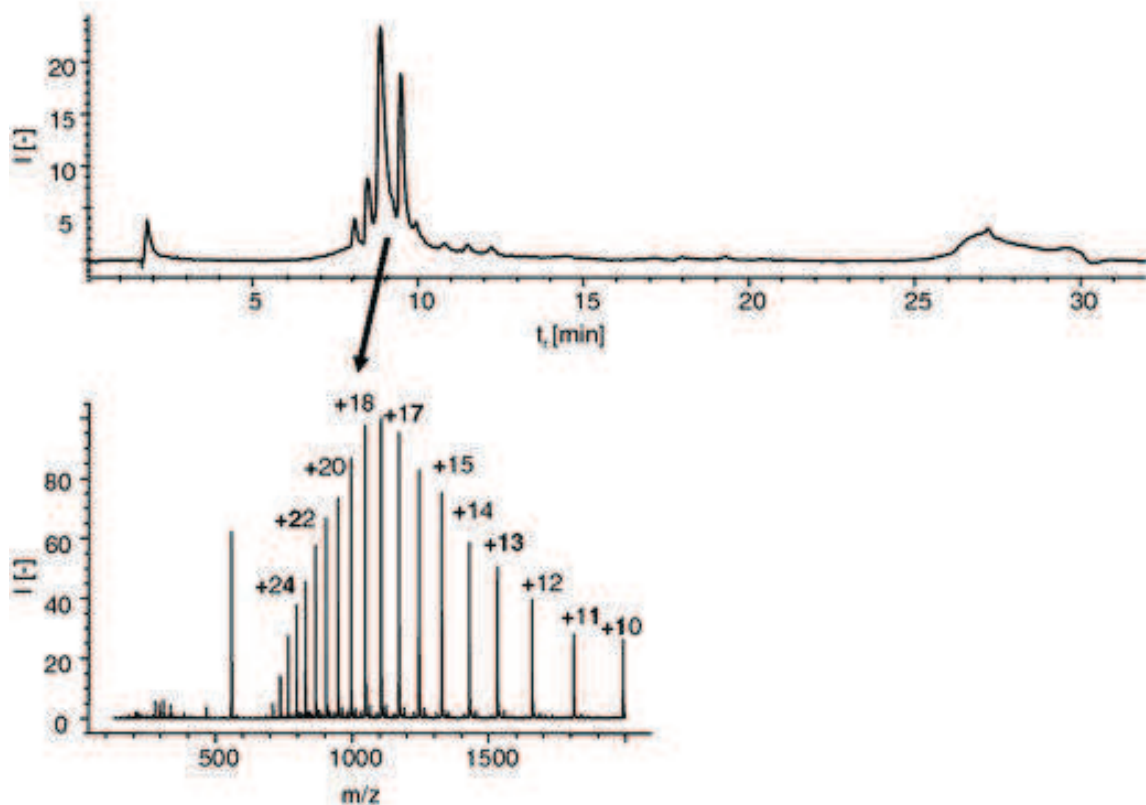


Figure I-19 : Exemple de chromatogramme obtenu par LC/MS. Le point à l'instant t du chromatogramme est calculé par intégration des pics caractéristiques de la molécule à étudier (ici ses différents états de charge) sur le spectre de masse obtenu à l'instant t (d'après [92])

Cette méthode d'analyse est tributaire de la rapidité de l'analyse en masse utilisée. Ainsi une analyse en LC/MS simple requiert que le nombre de balayages en masse par seconde soit suffisant pour que chaque pic du chromatogramme soit bien résolu temporellement. Une augmentation de la fréquence de balayage augmente la résolution temporelle du chromatogramme au détriment de la sensibilité de l'analyse en masse (le spectromètre collecte moins d'ions). Certains modes de fonctionnement permettent cependant de contourner ce problème, en particulier le mode MRM qui ne nécessite pas de balayage en masse. Ces modes d'analyse permettent d'importants gains en sélectivité et en sensibilité. Le mode MRM³ est un mode de fonctionnement hybride qui associe un mode MRM à un balayage en masse en dernière étape d'analyse (cf. section I.6.2.1.2 page 50). Sur un appareil 5500QTrap¹ avec une vitesse de balayage fixée à 10000 Th/s en Q3, le temps de cycle total d'une analyse MRM³ est de 300 ms dont 50 ms (soit 17 % du temps de cycle) pour le seul balayage en masse en Q3 (cf. [1] et Figure I-17).

Par ailleurs, le balayage en masse et l'intégration numérique des pics caractéristiques conduit inévitablement à générer un bruit de fond et à diminuer la sensibilité de la méthode. En effet le balayage (par opposition à la sélection en masse simple comme en mode MRM) peut introduire artificiellement un décalage dans les masses car les tensions appliquées au Q3 varient dans le temps. De même la pertinence de l'intégration numérique des pics est tributaire de l'algorithme et des bornes d'intégration utilisées. Le travail présenté dans ce mémoire se propose de résoudre simultanément ces deux problèmes en parvenant à éjecter simultanément de Q3 tous les ions d'intérêt vers le détecteur. Ceci permet de raccourcir le temps de cycle de 17 % (ce qui améliore la résolution du chromatogramme) tout en augmentant la sensibilité de la méthode (cf. Chapitre IV).

¹ Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies, Foster City, CA

Références bibliographiques

- [1] T. Fortin, A. Salvador, J. P. Charrier, C. Lenz, F. Bettsworth, X. Lacoux, G. Choquet-Kastylevsky, and J. Lemoine, "Multiple Reaction Monitoring Cubed for Protein Quantification at the Low Nanogram/Milliliter Level in Nondepleted Human Serum," *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 22, pp. 9343–9352, Nov. 2009.
- [2] a M. Haag, S. N. Taylor, K. H. Johnston, and R. B. Cole, "Rapid identification and speciation of Haemophilus bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.," *J. Mass Spectrom.*, vol. 33, no. 8, pp. 750–6, Aug. 1998.
- [3] J. O. Lay, "MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria.," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 20, no. 4, pp. 172–94, 2002.
- [4] P. Seng, M. Drancourt, F. Gouriet, B. La Scola, P.-E. Fournier, J. M. Rolain, and D. Raoult, "Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry.," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 49, no. 4, pp. 543–51, Aug. 2009.
- [5] J. P. Anhalt and C. Fenselau, "Identification of bacteria using mass spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 47, no. 2, pp. 219–225, Feb. 1975.
- [6] N. Anderson and N. Anderson, "The human plasma proteome history, character, and diagnostic prospects," *Mol. Cell. Proteomics*, no. 202, 2002.
- [7] N. L. Anderson, N. G. Anderson, and T. W. Pearson, "Plasma Proteome Institute," 2006. [Online]. Available: <http://www.plasmaproteome.org>. [Accessed: 22-Jul-2013].
- [8] J. Lemoine, A. Salvador, J.-P. Charrier, and T. Fortin, "Nouveau procédé de quantification de protéines par spectrométrie de masse," 09 535762010.
- [9] J. Lemoine, A. Salvador, J.-P. Charrier, T. Fortin, and P. Dugourd, "Procédé de détection de molécules par spectrométrie de masse," 09 566622011.
- [10] a. E. Cameron and D. F. Eggers, "An Ion "Velocitron'," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 19, no. 9, p. 605, 1948.
- [11] W. Paul and H. Steinwedel, "Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld," *Zeitschrift Naturforsch. Tl. A*, vol. 8, p. 448, 1953.
- [12] K. Biemann, C. Cone, and B. R. Webster, "Determination of the Amino Acid Sequence in Oligopeptides by Computer Interpretation," vol. 2149, no. 4, pp. 5598–5606, 1966.
- [13] C. R. Blakley and M. L. Vestal, "Thermospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 55, no. 4, pp. 750–754, Apr. 1983.

- [14] M. Yamashita and J. B. Fenn, "Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme," *J. Phys. Chem.*, vol. 88, no. 20, pp. 4451–4459, Sep. 1984.
- [15] M. Karas, D. Bachmann, and F. Hillenkamp, "Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules," *Anal. Chem.*, vol. 57, no. 14, pp. 2935–2939, Dec. 1985.
- [16] D. J. Weston, "Ambient ionization mass spectrometry: current understanding of mechanistic theory; analytical performance and application areas.," *Analyst*, vol. 135, no. 4, pp. 661–8, Apr. 2010.
- [17] G. Taylor, "Disintegration of Water Drops in an Electric Field," *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 280, no. 1382, pp. 383–397, Jul. 1964.
- [18] J. Mora, Van Berkel GJ, C. Enke, R. Cole, M. Martinez-Sanchez, and J. Fenn, "Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry," *J. Mass Spectrom.*, vol. 35, no. 8, pp. 939–52, Aug. 2000.
- [19] P. Kebarle and L. Tang, "From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 65, no. 22, p. 972A–986A, Nov. 1993.
- [20] R. B. Cole, "Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry.," *J. Mass Spectrom.*, vol. 35, no. 7, pp. 763–72, Jul. 2000.
- [21] M.-Z. Huang, C.-H. Yuan, S.-C. Cheng, Y.-T. Cho, and J. Shiea, "Ambient ionization mass spectrometry.," *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto, Calif.)*, vol. 3, pp. 43–65, Jan. 2010.
- [22] G. L. Glish and R. W. Vachet, "The basics of mass spectrometry in the twenty-first century.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 2, no. 2, pp. 140–50, Feb. 2003.
- [23] D. I. Carroll, I. Dzidic, R. N. Stillwell, K. D. Haegele, and E. C. Horning, "Atmospheric pressure ionization mass spectrometry. Corona discharge ion source for use in a liquid chromatograph-mass spectrometer-computer analytical system," *Anal. Chem.*, vol. 47, no. 14, pp. 2369–2373, Dec. 1975.
- [24] P. Lorrain and D. Corson, *Electromagnetic fields and Waves*, 3rd ed. New York, 1988.
- [25] W. T. Scott, "Who Was Earnshaw?," *Am. J. Phys.*, vol. 27, no. 6, p. 418, 1959.
- [26] B. E. King, "Quantum State Engineering and Information Processing with Trapped Ions," University of Colorado, 1999.
- [27] D. J. Douglas, A. J. Frank, and D. M. Mao, "Linear ion traps in mass spectrometry," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 24, no. 1, pp. 1–29, 2005.
- [28] D. J. Douglas, "Linear quadrupoles in mass spectrometry," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 28, no. 6, pp. 937–960, 2009.

Références bibliographiques

- [29] R. E. March and J. F. Todd, *Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry, 2nd Edition*, Second. Wiley, 2005.
- [30] Z. Du, D. J. Douglas, N. Konenkov, and C. Vt, "Elemental analysis with quadrupole mass filters operated in higher stability regions Potential and fields," vol. 1111, no. 4, pp. 1111–1119, 1999.
- [31] I. Szabo, "New ion-optical devices utilizing oscillatory electric fields. I. Principle of operation and analytical theory of multiple devices with two-dimensional electric fields," *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, vol. 73, no. 3, pp. 197–235, 1986.
- [32] D. J. Douglas and N. V Konenkov, "Influence of the 6th and 10th spatial harmonics on the peak shape of a quadrupole mass filter with round rods," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 16, no. 15, pp. 1425–1431, 2002.
- [33] D. J. Douglas, T. A. Glebova, N. V Konenkov, and M. Y. Sudakov, "Spatial harmonics of the field in a quadrupole mass filter with circular electrodes," *Tech. Phys.*, vol. 44, no. 10, pp. 1215–1219, Oct. 1999.
- [34] A. J. Reuben, G. B. Smith, P. Moses, A. V Vagov, M. D. Woods, D. B. Gordon, and R. W. Munn, "Ion trajectories in exactly determined quadrupole fields," *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, vol. 154, no. 1–2, pp. 43–59, 1996.
- [35] N. Konenkov, X. Zhao, Z. Xiao, and D. J. Douglas, "Mass Analysis in Islands of Stability with Linear Quadrupoles with Added Octopole Fields," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 18, no. 5, pp. 826–834, 2007.
- [36] N. Konenkov, F. Londry, C. Ding, and D. J. Douglas, "Linear Quadrupoles with Added Hexapole Fields," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 17, no. 8, pp. 1063–1073, 2006.
- [37] J. Schulte, P. V Shevchenko, and A. V Radchik, "Nonlinear field effects in quadrupole mass filters," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 70, no. 9, pp. 3566–3571, Sep. 1999.
- [38] W. Paul and M. Raether, "Das elektrische Massenfilter," *Zeitschrift für Phys. A Hadron. Nucl.*, vol. 140, no. 3, pp. 262–273, 1955.
- [39] W. Paul, H. P. Reinhard, and U. von Zahn, "Das elektrische Massenfilter als Massenspektrometer und Isotopentrenner," *Zeitschrift für Phys. A Hadron. Nucl.*, vol. 152, no. 2, pp. 143–182, 1958.
- [40] K. R. Jonscher and J. R. Yates, "The Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer : A Small Solution to a Big Challenge," *Anal. Biochem.*, vol. 244, no. 1, pp. 1–15, 1997.
- [41] F. Vedel, "On the dynamics and energy of ion clouds stored in an R.F. quadrupole trap," *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, vol. 106, no. 0, pp. 33–61, 1991.
- [42] W. Paul, "Electromagnetic Traps for Charged and Neutral Particles(Nobel Lecture)," *Angew. Chemie Int. Ed. English*, vol. 29, no. 7, pp. 739–748, Jul. 1990.

- [43] R. D. Knight, "The general form of the quadrupole ion trap potential," *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, vol. 51, no. 1, pp. 127–131, Jun. 1983.
- [44] W. Paul and H. Steinwedel, "Verfahren zur Trennung bzw. zum getrennten Nachweis von Ionen verschiedener spezifischer Ladung," DE1953P011054D 195312241956.
- [45] P. H. Dawson, "Fringing fields in the quadrupole mass filter," *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, vol. 6, no. 1–2, pp. 33–44, 1971.
- [46] P. H. Dawson, "Ion optical properties of quadrupole mass filters," *Adv. Electron. Electron Phys.*, vol. 53, pp. 153–208, 1980.
- [47] G. Jiang, C. Luo, N. V. Konenkov, and C.-F. Ding, "Tandem RF-only quadrupole mass filter with quadrupolar excitation," *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 286, no. 2–3, pp. 89–94, 2009.
- [48] F. A. Londry and J. W. Hager, "Mass selective axial ion ejection from a linear quadrupole ion trap," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 14, no. 10, pp. 1130–1147, Oct. 2003.
- [49] M. Guna and T. A. Biesenthal, "Performance Enhancements of Mass Selective Axial Ejection from a Linear Ion Trap," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 20, no. 6, pp. 1132–1140, 2009.
- [50] M. Bier and J. Syka, "Ion trap mass spectrometer system and method," 5,420,4251995.
- [51] J. C. Schwartz, M. W. Senko, and J. E. P. Syka, "A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 13, no. 6, pp. 659–669, 2002.
- [52] G. C. Stafford, P. E. Kelley, J. E. P. Syka, W. E. Reynolds, and J. F. J. Todd, "Recent improvements in and analytical applications of advanced ion trap technology," *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, vol. 60, no. 1, pp. 85–98, 1984.
- [53] S. A. McLuckey, D. E. Goeringer, and G. L. Glish, "Selective isolation rejection over a broad mass range in the quadrupole ion trap," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 2, no. 1, pp. 11–21, 1991.
- [54] S. D. Tanner, V. I. Baranov, and D. R. Bandura, "Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review," *Spectrochimica Acta - Part B - At. Spectrosc.*, vol. 57, no. 9, pp. 1361–1452, Sep. 2002.
- [55] F. Muntean, "Transmission study for r.f.-only quadrupoles by computer simulation," *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, vol. 151, no. 2–3, pp. 197–206, 1995.
- [56] J. W. Hager, "Performance optimization and fringing field modifications of a 24-mm long RF-only quadrupole mass spectrometer," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 13, no. 8, pp. 740–748, 1999.
- [57] N. V. Konenkov, L. M. Cousins, V. I. Baranov, and M. Y. Sudakov, "Quadrupole mass filter operation with auxiliary quadrupolar excitation: theory and experiment," *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 208, no. 1–3, pp. 17–27, 2001.

Références bibliographiques

- [58] D. E. Goeringer, W. B. Whitten, J. M. Ramsey, S. A. McLuckey, and G. L. Glush, "Theory of high-resolution mass-spectrometry achieved via resonance ejection in the quadrupole ion trap," *Anal. Chem.*, vol. 64, no. 13, pp. 1434–1439, 1992.
- [59] R. E. March, A. W. McMahon, F. A. Londry, R. L. Alfred, J. F. J. Todd, and F. Vedel, "Resonance excitation of ions stored in a quadrupole ion trap. Part 1. A simulation study," *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, vol. 95, no. 2, pp. 119–156, 1989.
- [60] M. Splendore, F. A. Londry, R. E. March, R. J. S. Morrison, P. Perrier, and J. Andre, "A simulation study of ion kinetic energies during resonant excitation in a stretched ion trap," *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, vol. 156, no. 1–2, pp. 11–29, Nov. 1996.
- [61] R. E. March, "Quadrupole ion trap mass spectrometry: a view at the turn of the century," *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 200, no. 1–3, pp. 285–312, 2000.
- [62] C. Hao and R. E. March, "A survey of recent research activity in quadrupole ion trap mass spectrometry," *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 212, no. 1–3, pp. 337–357, 2001.
- [63] M. J. Egan, E. a. Porter, G. C. Kite, M. S. J. Simmonds, J. Barker, and S. Howells, "High performance liquid chromatography quadrupole ion trap and gas chromatography/mass spectrometry studies of polyhydroxyalkaloids in bluebells," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 13, no. 4, pp. 195–200, Feb. 1999.
- [64] T. Fortin, A. Salvador, J. P. Charrier, C. Lenz, X. Lacoux, A. Morla, G. Choquet-Kastylevsky, and J. Lemoine, "Clinical Quantitation of Prostate-specific Antigen Biomarker in the Low Nanogram/Milliliter Range by Conventional Bore Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (Multiple Reaction Monitoring) Coupling and Correlation with ELISA Tests," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 8, no. 5, pp. 1006–1015, 2009.
- [65] N. Rifai, M. A. Gillette, and S. A. Carr, "Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility," *Nat. Biotechnol.*, vol. 24, no. 8, pp. 971–983, 2006.
- [66] V. A. Fusaro, D. R. Mani, J. P. Mesirov, and S. A. Carr, "Prediction of high-responding peptides for targeted protein assays by mass spectrometry," *Nat. Biotechnol.*, vol. 27, no. 2, pp. 190–198, 2009.
- [67] R. Korner, M. Wilm, K. Morand, M. Schubert, and M. Mann, "Nano electrospray combined with a quadrupole ion trap for the analysis of peptides and protein digests," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 7, no. 2, pp. 150–156, 1996.
- [68] I. D. Wilson, R. Plumb, J. Granger, H. Major, R. Williams, and E. M. Lenz, "HPLC-MS-based methods for the study of metabonomics," *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 817, no. 1, pp. 67–76, Mar. 2005.

- [69] E. M. Thurman, I. Ferrer, and D. Barceló, "Choosing between atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization interfaces for the HPLC/MS analysis of pesticides.," *Anal. Chem.*, vol. 73, no. 22, pp. 5441–9, Nov. 2001.
- [70] T. Fortin, A. Salvador, J. P. Charrier, C. Lenz, G. Lacoux, G. Choquet-Kastylevsky, and J. Lemoine, "Robust and absolute quantitation of PSA in clinical human sera using Protein Reaction Monitoring (PRM)," *EJC Suppl.*, vol. 6, no. 9, p. 105, 2008.
- [71] E. de Hoffmann, "Tandem mass spectrometry: A primer," *J. Mass Spectrom.*, vol. 31, no. 2, pp. 129–137, Feb. 1996.
- [72] R. Aebersold and M. Mann, "Mass spectrometry-based proteomics.," *Nature*, vol. 422, no. 6928, pp. 198–207, Mar. 2003.
- [73] F. Forner, L. Foster, and S. Toppo, "Mass Spectrometry Data Analysis in the Proteomics Era," *Curr. Bioinform.*, vol. 2, no. 1, pp. 63–93, Jan. 2007.
- [74] Z. Meng and T. D. Veenstra, "Targeted mass spectrometry approaches for protein biomarker verification.," *J. Proteomics*, vol. 74, no. 12, pp. 2650–9, Nov. 2011.
- [75] J. Sherman, M. J. McKay, K. Ashman, and M. P. Molloy, "How specific is my SRM?: The issue of precursor and product ion redundancy.," *Proteomics*, vol. 9, no. 5, pp. 1120–3, Mar. 2009.
- [76] R. W. Vachet and G. L. Glish, "Effects of heavy gases on the tandem mass spectra of peptide ions in the quadrupole ion trap," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 7, no. 12, pp. 1194–1202, Dec. 1996.
- [77] L. Sleno and D. a Volmer, "Ion activation methods for tandem mass spectrometry.," *J. Mass Spectrom.*, vol. 39, no. 10, pp. 1091–112, Oct. 2004.
- [78] J. N. Louri, R. G. Cooks, J. E. P. Syka, P. E. Kelley, G. C. Stafford, and J. F. J. Todd, "Instrumentation, applications, and energy deposition in quadrupole ion-trap tandem mass spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 59, no. 13, pp. 1677–1685, Jul. 1987.
- [79] R. E. March, "An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry," *J. Mass Spectrom.*, vol. 32, no. 4, pp. 351–369, 1997.
- [80] C. Cunningham, Jr, G. L. Glish, and D. J. Burinsky, "High Amplitude Short Time Excitation: A Method to Form and Detect Low Mass Product Ions in a Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 17, no. 1, pp. 81–84, 2006.
- [81] H. I. Kenttämäa and R. G. Cooks, "Internal energy distributions acquired through collisional activation at low and high energies," *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, vol. 64, no. 1, pp. 79–83, Mar. 1985.

Références bibliographiques

- [82] R. G. Cooks, "Special feature: Historical. Collision-induced dissociation: Readings and commentary," *J. Mass Spectrom.*, vol. 30, no. 9, pp. 1215–1221, Sep. 1995.
- [83] A. Shukla and J. Futrell, "Tandem mass spectrometry: dissociation of ions by collisional activation," *J. Mass Spectrom.*, vol. 35, no. 9, pp. 1069–90, Sep. 2000.
- [84] J. W. Hager, "A new linear ion trap mass spectrometer," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 16, no. 6, pp. 512–526, 2002.
- [85] G. Duguay, *Spectrométrie de masse*. Paris: Ellipses, 2007, p. 290.
- [86] J. Cottrell and U. London, "Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data," *Electrophoresis*, vol. 20, pp. 3551–3567, 1999.
- [87] C. S. Hsu, "Diophantine approach to isotopic abundance calculations," *Anal. Chem.*, vol. 56, no. 8, pp. 1356–1361, Jul. 1984.
- [88] R. Craig and R. C. Beavis, "TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra.," *Bioinformatics*, vol. 20, no. 9, pp. 1466–7, Jun. 2004.
- [89] L. Y. Geer, S. P. Markey, J. a Kowalak, L. Wagner, M. Xu, D. M. Maynard, X. Yang, W. Shi, and S. H. Bryant, "Open mass spectrometry search algorithm.," *J. Proteome Res.*, vol. 3, no. 5, pp. 958–64, 2004.
- [90] V. Dancík, T. a Addona, K. R. Clauser, J. E. Vath, and P. a Pevzner, "De novo peptide sequencing via tandem mass spectrometry.," *J. Comput. Biol.*, vol. 6, no. 3–4, pp. 327–42, 1999.
- [91] K. K. Murray, "DNA sequencing by mass spectrometry.," *J. Mass Spectrom.*, vol. 31, no. 11, pp. 1203–15, Nov. 1996.
- [92] B. Seiwert and U. Karst, "Analysis of cysteine-containing proteins using precolumn derivatization with N-(2-ferroceneethyl)maleimide and liquid chromatography/electrochemistry/mass spectrometry.," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 388, no. 8, pp. 1633–42, Aug. 2007.

Chapitre II Théorie physique et mathématique du piégeage quadrupolaire

II.1	PIÈGE QUADRUPOLAIRE IDÉAL.....	67
II.1.1	MODE RADIOFRÉQUENCE À UNE SEULE COMPOSANTE FRÉQUENTIELLE.....	67
II.1.1.1	Équations du mouvement et équations de Mathieu	67
II.1.1.2	Diagramme de Mathieu.....	69
II.1.1.2.1	Points particuliers du diagramme de Mathieu	72
II.1.1.2.2	Fonctionnement traditionnel du balayage en masse.....	73
II.1.1.3	Notion de pseudo-puits de potentiel.....	74
II.1.1.4	Fréquence de giration.....	76
II.1.1.4.1	Dans l'approximation du pseudo-puits de potentiel.....	76
II.1.1.4.2	Dans le cas exact.....	76
II.1.1.5	Critère de résonance d'ions soumis à une excitation	78
II.1.2	EN MODE RADIOFRÉQUENCE À PLUSIEURS COMPOSANTES FRÉQUENTIELLES	80
II.1.2.1	Équations du mouvement et équation de Hill	80
II.1.2.2	Théorie de Floquet.....	81
II.1.2.2.1	Notion de matrice de monodromie	81
II.1.2.2.2	Multiplicateur de Floquet et critère de stabilité	82
II.1.2.2.3	Lien entre la matrice de monodromie et le paramètre β	83
II.1.2.3	Transformations du diagramme de stabilité	84
II.1.2.3.1	Ajout d'une excitation radiofréquence : continuité du flot de Cauchy	84
II.1.2.3.2	Cas particulier : l'équation de Meissner et le Digital Ion Trap.....	85
II.2	PIÈGE QUADRUPOLAIRE RÉEL.....	87
II.2.1	COMPOSANTES NON QUADRUPOLAIRES	87
II.2.2	CHARGE D'ESPACE	91
II.2.3	INFLUENCE DU GAZ DE REFROIDISSEMENT	93
II.2.4	INFLUENCE DE LA FINITUDE DES QUADRIPÔLES LINÉAIRES RÉELS	94
II.3	SIMULATION INFORMATIQUE DU COMPORTEMENT DES IONS	95
II.3.1	DANS LE DOMAINE TEMPOREL	95
II.3.1.1	Critères de stabilité réelle et transmittance du système	96
II.3.1.2	Influence de l'excitation sur l'énergie cinétique moyenne des ions.....	101
II.3.1.3	Influence de l'excitation sur la position moyenne des ions	104
II.3.2	DANS LE PLAN DE MATHIEU	105
II.3.2.1	Critère de stabilité numérique.....	105
II.3.2.2	Introduction du plan $(q ; q')$ en mode RF-only.....	106
II.3.2.3	Influence de la phase de l'excitation.....	108
II.3.2.4	Largeurs des vallées d'instabilité	110
II.3.2.5	Superposition de plusieurs fréquences d'excitation.....	112
II.3.2.5.1	Effets à faibles excitations.....	113

II.3.2.5.2 Effets à fortes excitations.....	114
II.3.2.6 Conclusion des simulations	114
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	115

II.1 *Piège quadrupolaire idéal*

Dans cette partie le piège considéré sera un LIT supposé idéal, c'est-à-dire de longueur infinie (donc sans effets de bord), d'entrefer infini (l'excursion des ions dans le plan Oxy – plan perpendiculaire à l'axe du système, cf. Figure I-6 page 35 – n'est pas limitée), sous vide et générant dans l'espace un potentiel purement quadrupolaire selon l'équation II-1 :

$$\phi(x, y, z, t) = \phi_0(t) \frac{x^2 - y^2}{r_0^2} \quad \text{II-1}$$

Par ailleurs les ions dans le piège sont supposés isolés et n'interagissent donc pas entre eux. Ces hypothèses permettent de découpler les équations du mouvement des ions selon x et selon y ce qui facilite leur traitement mathématique (cf. section II.1.1.1 ci-dessous).

ϕ_0 est une tension variant au cours du temps appliquée aux électrodes du quadripôle (cf. section I.3.2.1 page 34). Celle-ci peut être composée d'une seule composante fréquentielle (cf. section II.1.1 ci-dessous) ou de plusieurs (cf. section II.1.2 page 80).

Il est à noter que les équations du mouvement des ions dans un QUISTOR sont analogues à celles qui décrivent ce mouvement dans un LIT ou un QMF (cf. [1]), leur traitement mathématique (en particulier sur la stabilité des ions) serait donc similaire et ne sera pas développé ici.

II.1.1 *Mode radiofréquence à une seule composante fréquentielle*

Dans cette partie, le potentiel ϕ_0 n'aura qu'une seule composante fréquentielle dans sa décomposition de Fourier. Il s'écrira donc de façon canonique :

$$\phi_0(t) = U - V \cos \Omega t \quad \text{II-2}$$

Où U est une tension continue et V l'amplitude de la composante alternative appliquée. Le signe « moins » dans l'équation II-2 est fixé par convention et commodité pour la suite (cf.[1]).

II.1.1.1 *Équations du mouvement et équations de Mathieu*

Dans un LIT (ici supposé infini donc se comportant comme un QMF car sans effets de bords) la vitesse des ions reste constante selon l'axe Oz. En revanche ils restent soumis aux forces dues aux champs électriques selon les axes Ox et Oy :

$$\vec{F} = -ze\nabla\phi(x, y, z, t) \quad \text{II-3}$$

En appliquant la seconde loi de Newton pour un ion de masse m et de charge ze (où e est la charge élémentaire) à l'équation II-3 et en remplaçant $\phi_0(x, y, z, t)$ par son expression il vient :

II.1 Piège quadrupolaire idéal

$$\frac{d^2}{dt^2} \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix} + \frac{2ze}{mr_0^2} \phi_0(t) \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix} = 0 \quad \text{II-4}$$

L'équation II-4 peut se réécrire de façon canonique en introduisant les paramètres adimensionnels suivants (appelés paramètres de Mathieu) :

$$\begin{cases} \xi = \frac{\Omega t}{2} \\ a = \frac{8zeU}{mr_0^2 \Omega^2} \\ q = \frac{4zeV}{mr_0^2 \Omega^2} \end{cases} \quad \text{II-5}$$

En introduisant les paramètres définis ci-dessus dans l'équation II-4 on obtient la forme canonique des équations dites de Mathieu :

$$\begin{cases} \frac{d^2 x}{d\xi^2} + (a - 2q \cos 2\xi)x = 0 \\ \frac{d^2 y}{d\xi^2} - (a - 2q \cos 2\xi)y = 0 \end{cases} \quad \text{II-6}$$

Les propriétés du mouvement des ions dans le plan Oxy, en particulier la stabilité de ces mouvements, sont entièrement caractérisées par les valeurs de ces paramètres a et q définis à l'équation II-5. Il est à noter que les deux équations du système II-6 sont découplées. Ainsi le mouvement d'un ion selon l'axe Ox n'influence en rien son mouvement selon l'axe Oy. De plus l'équation du mouvement selon l'axe Oy est identique à celle régissant le mouvement selon l'axe Ox en remplaçant les paramètres a et q par leurs opposés.

La stabilité d'un ion dans un LIT idéal peut être définie comme suit :

Un ion est stable si, et seulement si, son mouvement dans l'espace des phases est borné pour toutes conditions initiales sauf, éventuellement, pour des conditions initiales prises sur un ensemble de mesure nulle¹.

Cette condition mathématique traduit le fait qu'un ion dont la trajectoire serait stable reste confiné à une distance finie de l'origine du système (cf. Figure II-1). Elle est valable et justifiée dans le cas d'un LIT idéal, elle n'est cependant pas appropriée pour un système réel. Ce cas sera développé plus avant à la section II.3.1.1 (page 96).

¹ Par exemple tout ion situé à l'origine et de vitesse nulle à l'instant initial persisterait dans son état de repos et serait donc théoriquement stable quelque soient les potentiels électriques appliqués par ailleurs

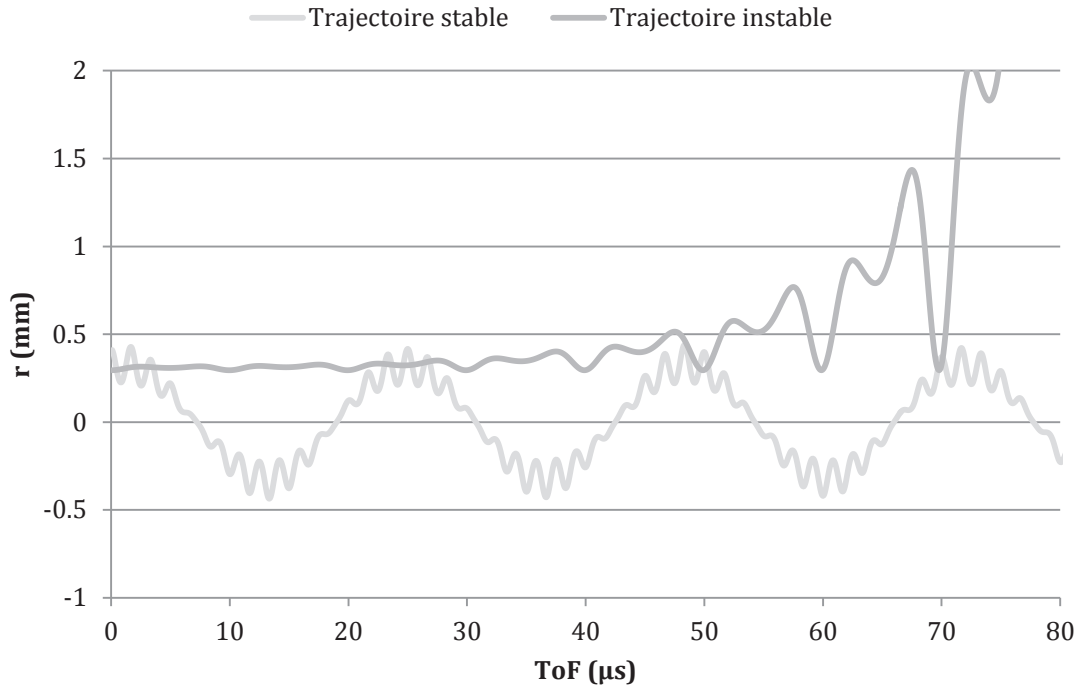


Figure II-1 : Exemple de trajectoires stables et instables d'un ion dans un QMF

II.1.1.2 Diagramme de Mathieu

La définition mathématique de la stabilité des équations étant posée, il est possible de déterminer a priori par le calcul si, pour deux coefficients de Mathieu a et q donnés, les équations II-6 définiront un mouvement stable ou, au contraire, instable.

L'ensemble des coefficients a et q pour lesquels l'équation du mouvement des ions sur l'axe Ox est stable forme un ensemble dense dans le plan $(a ; q)$. Il est alors possible de tracer dans le plan $(a ; q)$ la surface correspondant à cet ensemble (cf. Figure II-2).

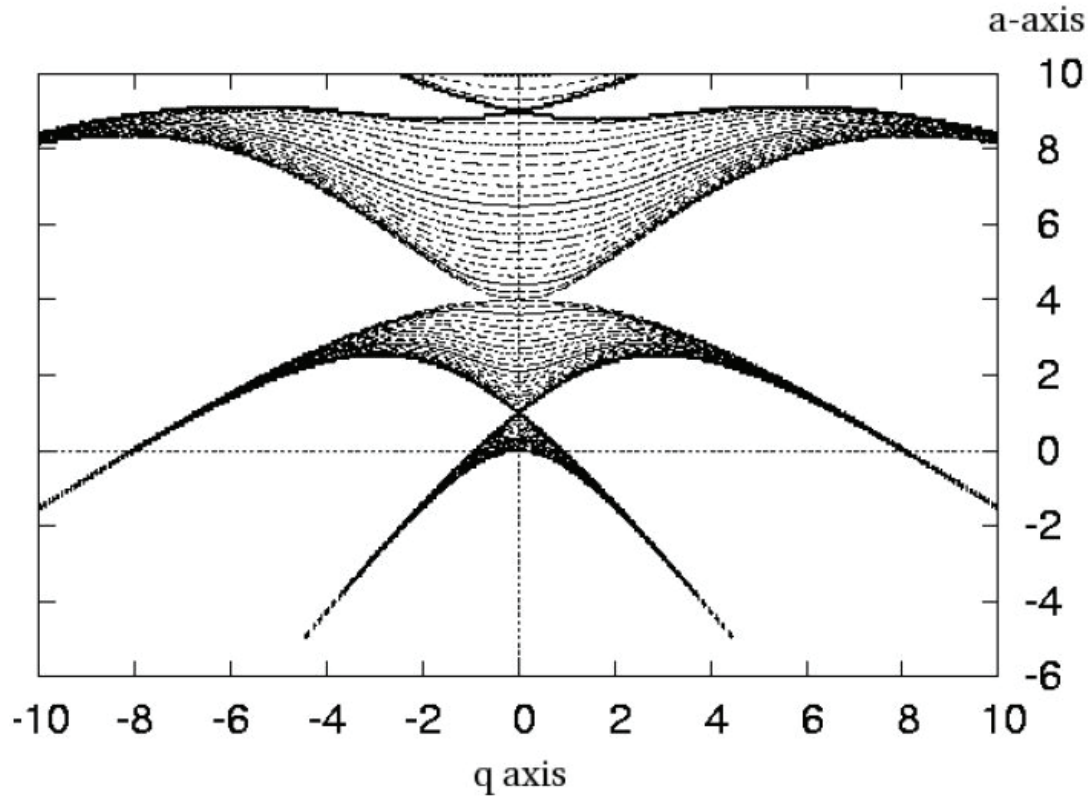


Figure II-2 : Diagramme de stabilité d'un ion dans un QMF idéal selon l'axe Ox, les zones grisées représentent l'ensemble des couples $(a ; q)$ tels que l'équation du mouvement des ions selon l'axe Ox soit stable (d'après [2])

Ce diagramme (dit de stabilité, de Mathieu ou encore de Ince-Strutt cf. [3]) est symétrique par rapport à la variable q , ce qui est cohérent avec le fait que le paramètre q représente l'amplitude d'une fonction périodique (ici la fonction cosinus) et que la notion de stabilité soit une notion asymptotique dans le temps.

Les équations du mouvement des ions selon Ox et Oy étant découplées, pour qu'un ion soit stable dans le plan Oxy il faut et il suffit que les paramètres a et q définissent un mouvement stable selon l'axe Ox et que les mêmes paramètres (ou, ce qui revient au même, les paramètres $-a$ et $-q$) définissent un mouvement stable selon l'axe Oy.

Ainsi, pour obtenir le diagramme de stabilité des ions dans le plan Oxy, et donc dans le piège, il suffit de faire l'intersection du diagramme de la Figure II-2 avec sa réflexion selon l'axe des abscisses (cf. Figure II-3).

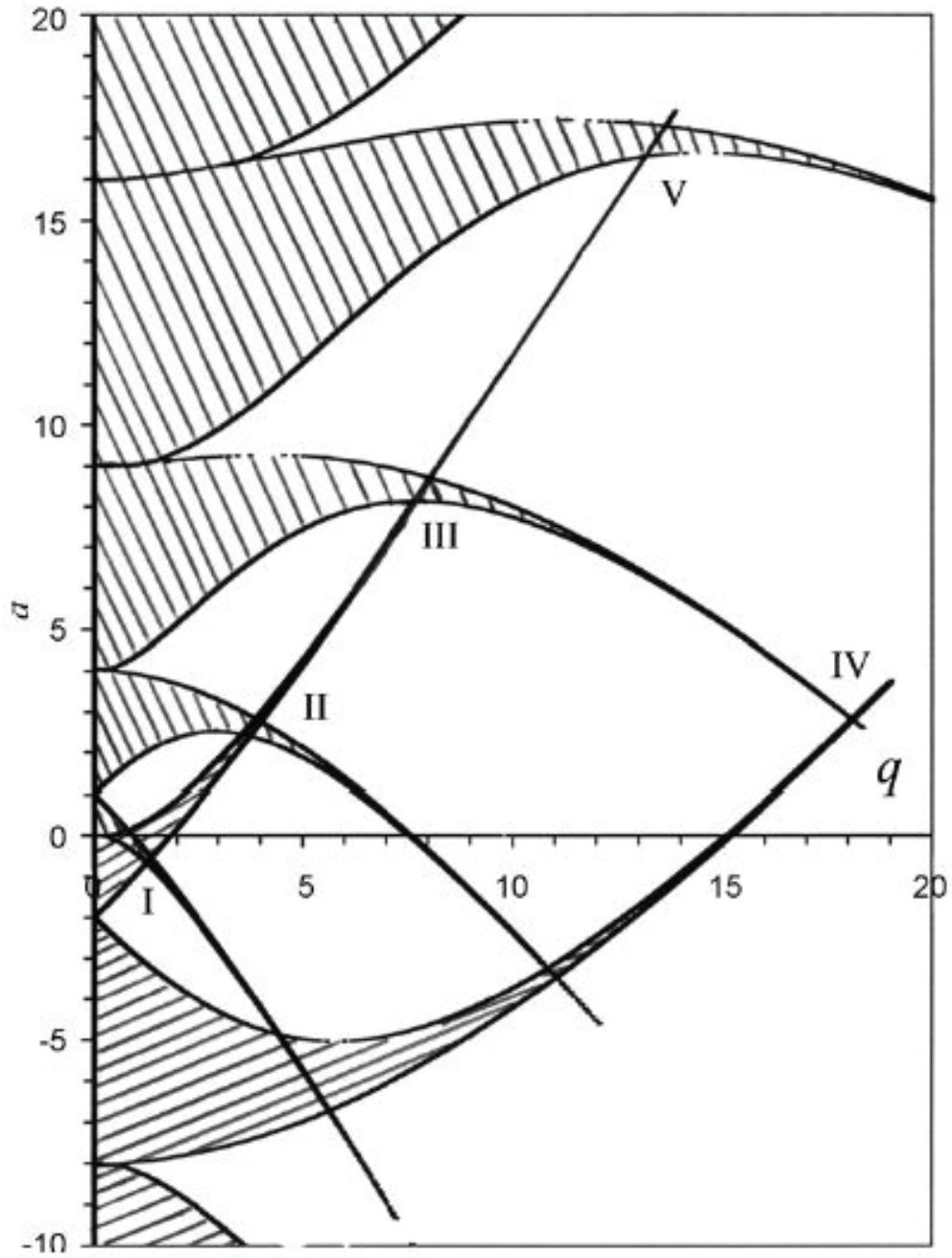


Figure II-3 : Intersection des diagrammes de stabilité des ions dans un QMF idéal selon les axes Ox et Oy , l'illustration montre cinq zones de stabilités conventionnellement numérotées (d'après [4])

II.1 Piège quadrupolaire idéal

La Figure II-3 montre l'existence de cinq zones de stabilités numérotées de I à V dans le premier quadrant (il en existe en réalité une infinité, cf. [5]). La théorie générale des équations de Mathieu permet de traiter de la même façon le comportement des ions dans toutes les zones de stabilité. Cependant, pour des raisons autant historiques que pratiques, la plupart des instruments commerciaux fonctionnent dans la première zone de stabilité, c'est donc elle qui sera étudiée de façon plus approfondie (cf. Figure II-4)¹.

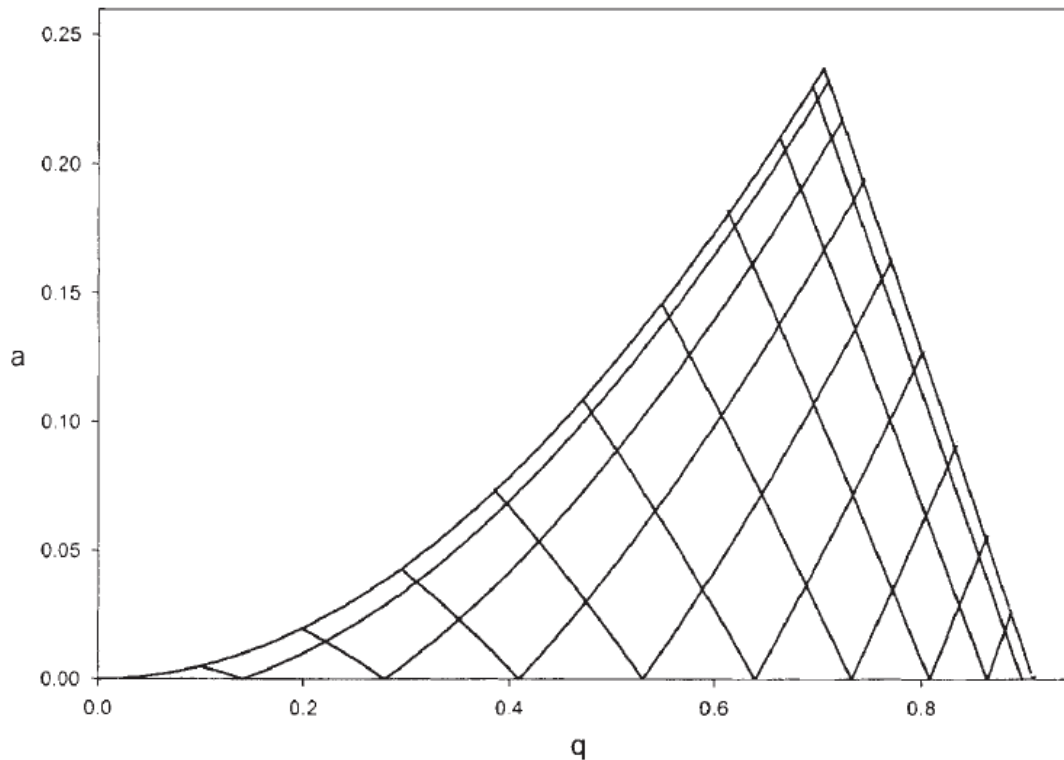


Figure II-4 : Première zone de stabilité des ions dans un QMF idéal (d'après [6])

II.1.1.2.1 Points particuliers du diagramme de Mathieu

Le diagramme de stabilité présente deux points particuliers sur la première zone de stabilité (cf. Figure II-4 et [7]) :

- Un LMCO² au point de coordonnées $\begin{pmatrix} a \\ q \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0,908 \end{pmatrix}$;
- Un apex au point de coordonnées $\begin{pmatrix} a \\ q \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0,237 \\ 0,706 \end{pmatrix}$.

¹ Le diagramme de stabilité de la figure correspond au dessin de la première zone de stabilité tracé dans le plan (q' ; a') avec $q' = 1/q$ et $a' = a/2q$ (cf. Figure I-12 page 34)

² Low Mass Cutoff

Lorsque les paramètres de fonctionnement du QMF ou du LIT sont fixés (c'est-à-dire les valeurs de U , V , Ω et r_0), le LMCO impose le ratio masse/charge le plus faible qu'il est possible de stabiliser. En mode RF-only (c'est-à-dire lorsque $a = 0$) l'intégralité des ions de ratio m/z supérieur à ce LMCO est transmise. Ce mode de fonctionnement est donc couramment utilisé pour réaliser des guides d'ions ou des cellules de collisions.

De même, lorsque les paramètres de fonctionnement sont fixés de manière à faire fonctionner le QMF ou le LIT au voisinage de l'apex, seuls les ions ayant un ratio masse/charge dans une gamme réduite peuvent avoir des trajectoires stables. C'est cette dernière propriété qui est traditionnellement utilisée pour réaliser un balayage en masse dans un QMF ou dans un LIT (cf. section II.1.1.2.2) ou pour utiliser un QMF comme simple filtre en masse.

Les courbes limites de la première zone de stabilité sont données par (cf. [1], [5], [8]) :

$$\begin{cases} l_0(q) = \frac{1}{2}q^2 - \frac{7}{128}q^4 + \frac{29}{2304}q^6 + O(q^8) \\ l_1(q) = 1 - q^1 - \frac{1}{8}q^2 + \frac{1}{64}q^3 + \frac{1}{1536}q^4 + O(q^5) \end{cases} \quad \text{II-7}$$

II.1.1.2.2 Fonctionnement traditionnel du balayage en masse

Les paramètres de Mathieu a et q sont tous deux inversement proportionnels au ratio masse/charge des ions et respectivement proportionnels à U et V . En faisant varier conjointement U et V tout en conservant leur rapport U/V constant et proche de la valeur $\frac{U}{V} = \frac{a_{\text{apex}}}{2q_{\text{apex}}} = 0,191$ le QMF est donc en mesure de laisser passer des ions de masse donnée avec une résolution d'autant plus grande que le rapport U/V est proche de la valeur 0,191 (cf. Figure II-5 et section I.4.2 page 43).

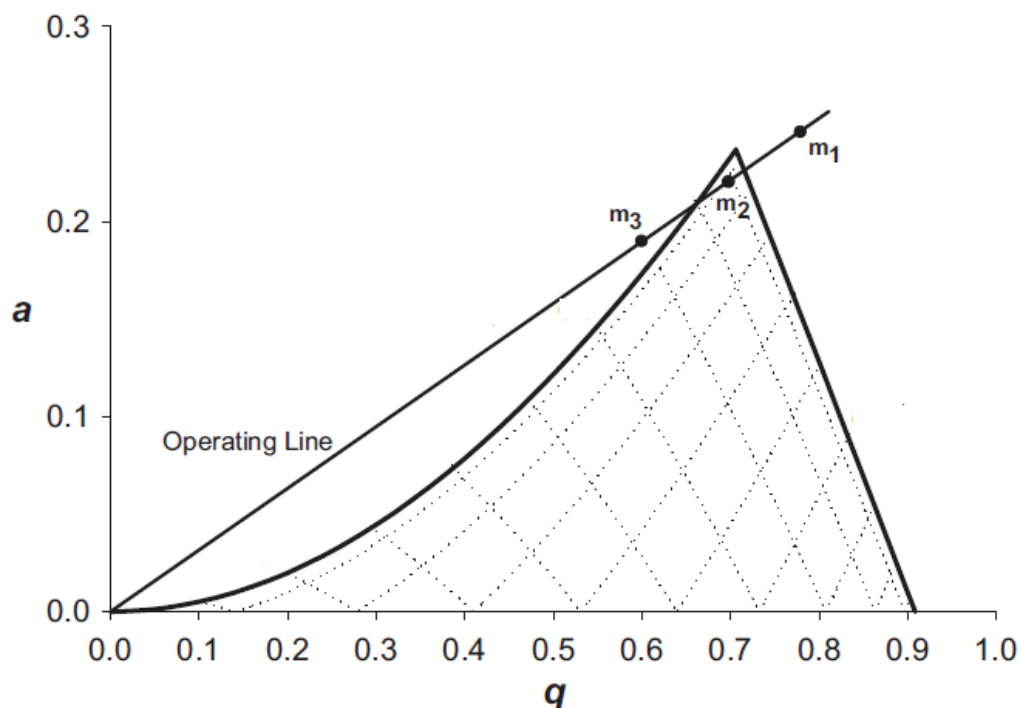


Figure II-5 : Diagramme de stabilité d'un QMF idéal. Une droite traversant la zone de stabilité au voisinage de l'apex figure un rapport U/V constant permettant de laisser passer les ions de masse m_2 mais pas ceux de masses m_1 ou m_3 (d'après [9])

La connaissance des équations approchées des limites du diagramme de stabilité (cf. équation II-7) permet de calculer la résolution en masse théorique lorsque des tensions U et V sont appliquées au QMF :

$$\frac{\Delta(m/z)}{(m/z)_{\text{apex}}} \cong \frac{V_{\text{apex}}}{V} \left(1,27 - 7,75 \frac{U}{V} + 3,08 \left(\frac{U}{V} \right)^2 \right) \quad \text{II-8}$$

Où la variable V_{apex} de l'équation II-8 serait la valeur de la tension V à appliquer pour se situer à l'apex, la valeur de U étant donnée. En particulier, lorsque $\frac{U}{V} = 0,168$ la résolution du QMF devient infinie, le terme $\frac{\Delta(m/z)}{(m/z)_{\text{apex}}}$ devenant alors nul.

Il est cependant à noter que la valeur de la résolution donnée par l'équation II-8 est théorique et conduit à une surestimation par rapport à la pratique. En effet, un système réel est de dimensions finies et montre des non linéarités près des bords du système, ce qui conduit à une dégradation de la résolution (cf. section II.2 page 87).

II.1.1.3 Notion de pseudo-puits de potentiel

Piéger un ion (ou de façon générale toute particule) revient à le confiner au voisinage d'un point d'équilibre stable à l'aide d'un puits de potentiel. Or ici le potentiel utilisé (cf. équation II-1) présente certes à tout instant un point d'équilibre à l'origine, mais celui-ci est instable (cf. Figure II-6).

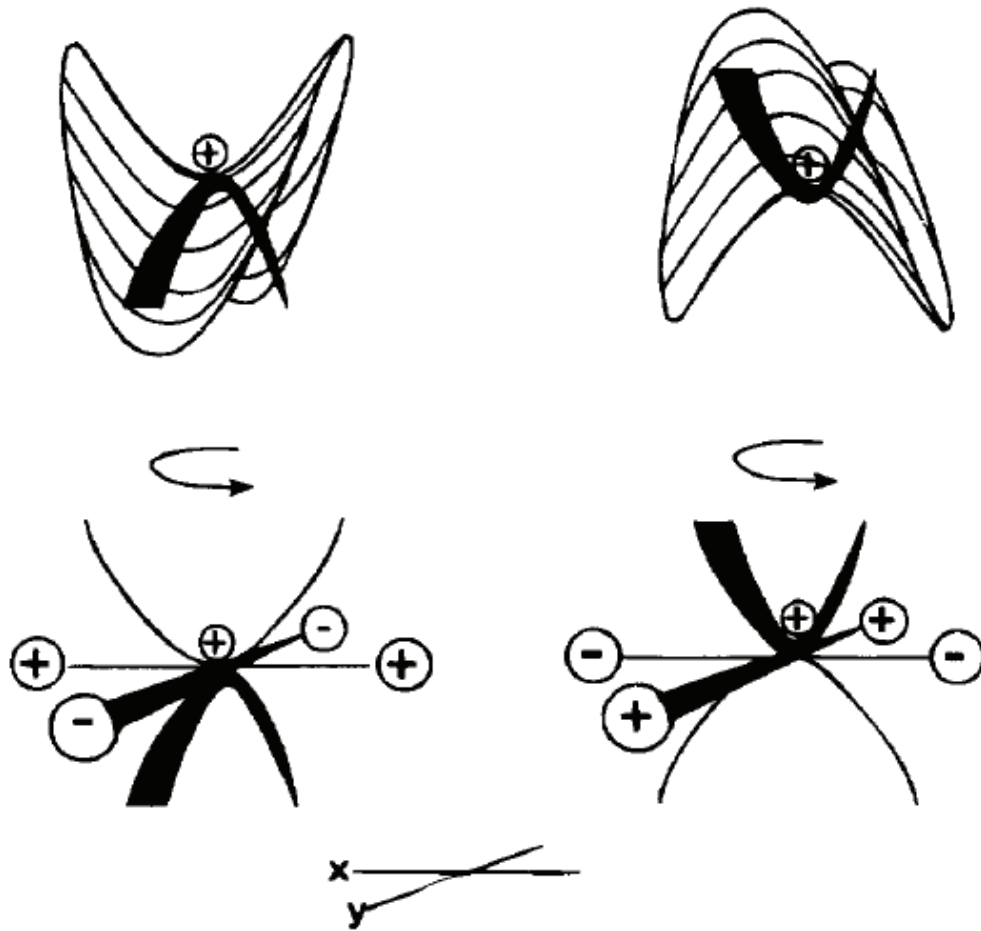


Figure II-6 : Analogie mécanique du système de piégeage radiofréquence. À tout instant l'ion est sous l'influence d'un potentiel en selle à cheval dont la courbure varie périodiquement avec le temps (d'après [10])

En réalité, c'est la variation périodique de la courbure du potentiel avec le temps qui permet de confiner l'ion au voisinage de l'origine : en moyenne temporelle l'ion y « voit » un point d'équilibre stable à condition que la fréquence de variation de la courbure soit suffisante.

Ce calcul du potentiel moyen vu par un ion a été traité dans la littérature dans le cas d'un potentiel quadripolaire (cf. [8], [11]) et peut se généraliser à n'importe quel potentiel (cf. Annexe A). Il est à noter que cette approximation (dite approximation de Dehmelt) n'est valable que lorsque $q \leq 0,4$ (cf. [8], [12]).

La forme de ce pseudo-puits de potentiel est donnée, dans le cas d'un QMF ou d'un LIT idéal, par :

$$\bar{D}(x, y) = \frac{1}{8} m \Omega^2 \left(a + \frac{q^2}{2} \right) (x^2 + y^2) \quad \text{II-9}$$

II.1 Piège quadrupolaire idéal

Cette approximation permet de calculer au premier ordre la profondeur de ce puits de potentiel, la fréquence de giration des ions dans le piège ou bien encore leur énergie cinétique moyenne.

II.1.1.4 Fréquence de giration

La détermination de la fréquence de giration des ions dans un piège radiofréquence est essentielle afin de pouvoir exciter sélectivement les ions d'un ratio masse/charge donné. Ce calcul peut être fait simplement dans le cas de l'approximation de Dehmelt (cf. section II.1.1.4.1 page 76) ou bien, de manière plus raffinée, en étudiant les propriétés de l'équation de Mathieu (cf. section II.1.1.4.2 page 76).

II.1.1.4.1 Dans l'approximation du pseudo-puits de potentiel

Dans l'approximation du pseudo-puits de potentiel, l'équation du mouvement des ions dans un QMF ou un LIT peut s'écrire :

$$m \frac{d^2}{dt^2} \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix} = -\nabla \cdot \bar{D}(x, y) \quad \text{II-10}$$

Cette équation se simplifie en remplaçant le champ \bar{D} dans l'équation II-10 par sa valeur donnée par l'équation II-9 :

$$\frac{d^2}{dt^2} \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix} + \left(\frac{\Omega}{2}\right)^2 \left(a + \frac{q^2}{2}\right) \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix} = 0 \quad \text{II-11}$$

Cette dernière expression permet de remonter à la pulsation de résonance des ions dans le piège dans l'approximation du pseudo-puits de potentiel (cf. [6]) :

$$\Omega_{\text{ion}} = \sqrt{a + \frac{q^2}{2}} \frac{\Omega}{2} \quad \text{II-12}$$

Cette expression simple n'est valide que lorsque le modèle de Dehmelt peut s'appliquer, c'est-à-dire lorsque $q \leq 0,4$. Au-delà de cette limite, une expression exacte doit être calculée.

II.1.1.4.2 Dans le cas exact

Il est toujours possible, dans le cas général, d'écrire la pulsation fondamentale d'un ion dans un piège radiofréquence idéal comme étant proportionnelle à la pulsation de la composante alternative appliquée au piège :

$$\Omega_{\text{ion}} = \frac{1}{2} \beta(a, q) \Omega \quad \text{II-13}$$

La variable sans dimension β est une fonction des paramètres de Mathieu a et q . Il est possible de démontrer (cf. [5], [12]) que le paramètre β est solution de l'équation transcendante suivante :

$$\beta^2 = a + \frac{q^2}{(\beta + 2)^2 - a - \frac{q^2}{(\beta + 4)^2 - a - \frac{q^2}{(\beta + 6)^2 - a - \dots}}} + \frac{q^2}{(\beta - 2)^2 - a - \frac{q^2}{(\beta - 4)^2 - a - \frac{q^2}{(\beta - 6)^2 - a - \dots}} \quad \text{II-14}$$

L'équation II-14 ne peut pas être résolue analytiquement, il est cependant possible de la résoudre numériquement. Un programme informatique écrit en C++ et donné en annexe (cf. Annexe B) permet de calculer β en fonction des paramètres de Mathieu a et q avec la précision numérique souhaitée.

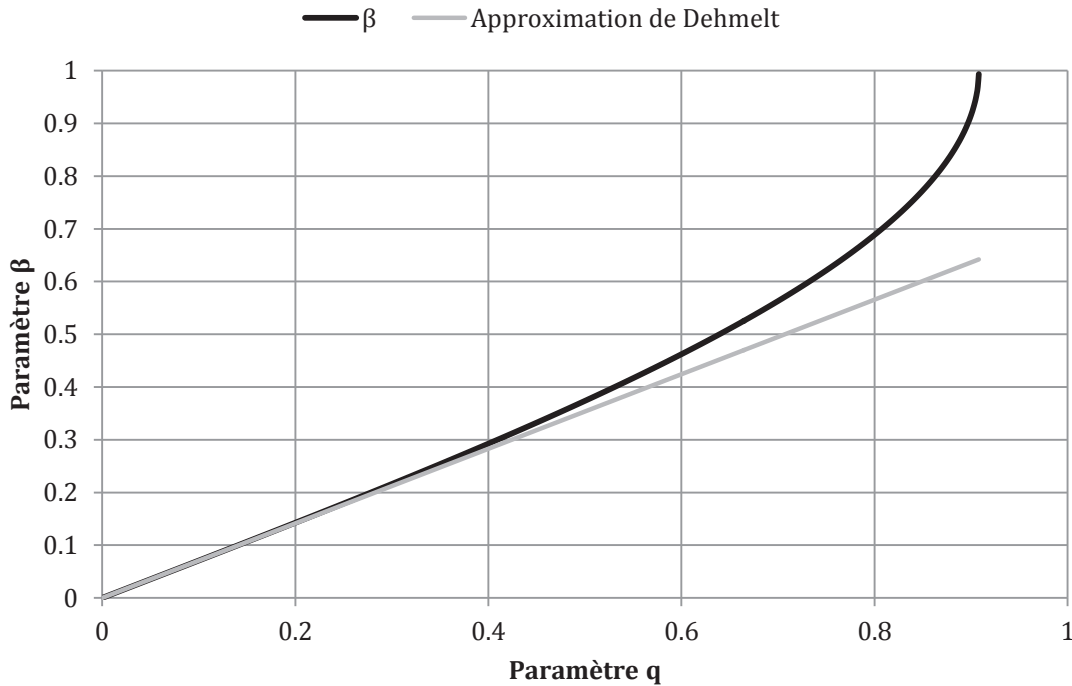


Figure II-7 : Graphe de β en fonction de q lorsque $a = 0$ (mode RF-only)

Le graphique de la Figure II-7 donne l'allure de la fonction $\beta(a, q)$ (calculée à l'aide du programme donné en annexe B) lorsque la valeur du paramètre a est fixée à 0. Le paramètre β n'est pas défini (ou à tout du moins, n'est pas réel pur) pour une valeur de q excédant 0,908, conformément à la valeur de q définissant le LMCO dans la première zone de stabilité du diagramme de Mathieu (cf. section II.1.1.2.1 page 72). Par ailleurs, la quasi linéarité de β lorsque q est petit permet de justifier a posteriori la validité de l'approximation de Dehmelt lorsque $a = 0$: la pente de la courbe $q \rightarrow \beta(0, q)$ à l'origine est égale à $\frac{1}{\sqrt{2}}$.

II.1 Piège quadrupolaire idéal

Ce calcul numérique permet de définir une approximation pseudo-empirique, plus générale que celle de Dehmelt (et comparable en qualité à celle présentée dans [13]), pour calculer β lorsque $a = 0$ (mode RF-only, c'est-à-dire sans composante continue appliquée aux électrodes du piège) :

$$\beta(0, q) \cong 0,885 \cdot \left(1 - \left(1 - \frac{q}{0,908}\right)^{0,69}\right) \quad \text{II-15}$$

Cette approximation permet de déterminer rapidement une valeur de β approchée à moins de 5 % pour q variant de 0 à 0,9 (c'est-à-dire avec la même précision que l'approximation de Dehmelt sur son domaine de validité).

La solution exacte de l'équation de Mathieu peut, lorsque la solution est stable, se mettre sous la forme (cf. [5], [12]) :

$$\begin{cases} x(\xi) = A_x \sum_{n \in \mathbb{Z}} C_{2n} \cos(2n + \beta)\xi + B_x \sum_{n \in \mathbb{Z}} C_{2n} \sin(2n + \beta)\xi \\ y(\xi) = A_y \sum_{n \in \mathbb{Z}} C_{2n} \cos(2n + \beta)\xi + B_y \sum_{n \in \mathbb{Z}} C_{2n} \sin(2n + \beta)\xi \end{cases} \quad \text{II-16}$$

Où les paramètres A_x , A_y , B_x , B_y dépendent des conditions initiales et les coefficients C_{2n} dépendent des paramètres de Mathieu a et q .

Les pulsations spatiales des ions à l'ordre n sont donc entièrement décrites par la formule :

$$\forall n \in \mathbb{Z}, \Omega_{\text{ion}}^{(n)} = \left|n + \frac{\beta}{2}\right| \Omega \quad \text{II-17}$$

Lorsque $n = 0$, l'équation II-17 se ramène à l'équation II-13.

II.1.1.5 Critère de résonance d'ions soumis à une excitation

Le calcul de la fréquence fondamentale de giration des ions dans un piège radiofréquence permet de mettre en évidence un critère de résonance de ces ions lorsqu'ils sont soumis à une excitation.

En reprenant le modèle du pseudo-puits de potentiel (équation II-11) sur l'axe Ox et en ajoutant un terme d'excitation il vient :

$$\ddot{x} + \left(\frac{\Omega}{2}\right)^2 \left(a + \frac{q^2}{2}\right) x = A \cos \Omega_{\text{excitation}} t \quad \text{II-18}$$

La théorie de la résonance permet de conclure qu'il y a résonance (sous cette approximation) lorsque (cf. [14]) :

$$\Omega_{\text{excitation}} = \frac{\Omega}{2} \sqrt{a + \frac{q^2}{2}} \cong \frac{\beta}{2} \Omega \quad \text{II-19}$$

Cette solution est cependant approximative et incomplète car elle repose sur le modèle du pseudo-puits de potentiel.

Il est possible de reprendre les équations exactes du mouvement (équation II-4) pour l'axe Ox et d'ajouter au potentiel radiofréquence de confinement un potentiel radiofréquence d'excitation :

$$\ddot{x} + \frac{2ze}{mr_0^2} (U - V \cos \Omega t - V_{\text{excitation}} \cos \Omega_{\text{excitation}} t) x = 0 \quad \text{II-20}$$

S'il existe une résonance pour ce système, celle-ci n'est plus une résonance simple provenant d'un terme source mais une résonance paramétrique (cf. [15]).

Il est possible d'adimensionner l'équation II-20 de la même façon que les équations du mouvement. En utilisant les paramètres suivants :

$$\left\{ \begin{array}{l} \xi = \frac{\Omega t}{2} \\ \nu = \frac{\Omega_{\text{excitation}}}{\Omega} \\ a = \frac{8zeU}{mr_0^2 \Omega^2} \\ q = \frac{4zeV}{mr_0^2 \Omega^2} \\ q_1 = \frac{4zeV_{\text{excitation}}}{mr_0^2 \Omega^2} \end{array} \right. \quad \text{II-21}$$

Les équations du mouvement selon l'axe Ox deviennent :

$$\frac{d^2 x}{d\xi^2} + (a - 2q \cos 2\xi - 2q_1 \cos 2\nu\xi) x = 0 \quad \text{II-22}$$

Sudakov et Konenkov. (cf. [16]) ont montré, en utilisant une approche perturbative, que l'ion dont la pulsation fondamentale de giration dans le piège est $\frac{\beta\Omega}{2}$ peut entrer en résonance avec une excitation à la pulsation $\Omega_{\text{excitation}}$ à la condition suivante :

$$\exists (n, K) \in \mathbb{Z} \times \mathbb{N}^*, \Omega_{\text{excitation}} = |n + \beta| \frac{\Omega}{K} \quad \text{II-23}$$

Le paramètre K dans l'équation II-23 est appelé l'ordre de la résonance (cf. [16]). Il est donc possible pour un même ion d'être excité par plusieurs fréquences distinctes et, réciproquement, une même fréquence d'excitation peut exciter des ions de masses différentes pourvu que leurs paramètres β satisfassent la condition donnée par l'équation II-23.

Par ailleurs, la perte du facteur $\frac{1}{2}$ entre les équations II-17 et II-23 s'explique par la notion de résonance subharmonique (cf. [17], [18]) : l'excitation d'un ion ne se fait pas à l'aide d'un potentiel oscillant à sa fréquence de giration mais à une fréquence double (au premier ordre).

II.1 Piège quadrupolaire idéal

Ce critère de résonance est cependant théorique et doit être utilisé avec précaution en pratique. En effet le calcul des fréquences d'excitation repose sur le calcul du paramètre β . Or celui-ci n'est rigoureusement défini que pour l'équation de Mathieu, c'est-à-dire lorsqu'il n'y a pas d'excitation. Le critère de résonance présenté à l'équation II-23 n'est donc rigoureusement valide que dans la limite où le paramètre q_1 de l'équation II-22 tend vers zéro (limite de faible excitation, cf. [19], [20]).

II.1.2 En mode radiofréquence à plusieurs composantes fréquentielles

L'étude des équations du mouvement des ions dans un QMF idéal a été jusqu'à présent menée dans le cas « simple » où une seule fréquence était utilisée pour confiner les ions. La possibilité d'utiliser une seconde fréquence afin d'exciter sélectivement ces ions a été abordée (cf. section II.1.1.5 page 78) mais n'est rigoureusement valide que dans la limite où le potentiel d'excitation est négligeable devant le potentiel de confinement.

Afin d'étudier plus finement le comportement des ions dans le cas où plusieurs composantes radiofréquences seraient utilisées il est nécessaire d'abandonner le paradigme des équations de Mathieu et d'utiliser la théorie plus générale des équations de Hill.

II.1.2.1 Équations du mouvement et équation de Hill

Dans le cas général, l'équation du mouvement des ions (équation II-4) peut toujours s'écrire comme :

$$\begin{cases} \frac{d^2x}{dt^2} + H(t)x = 0 \\ \frac{d^2y}{dt^2} - H(t)y = 0 \end{cases} \quad \text{II-24}$$

Où la fonction H est définie par :

$$H(t) = \frac{2ze}{mr_0^2} \phi_0(t) \quad \text{II-25}$$

Lorsque le potentiel ϕ_0 varie périodiquement dans le temps la fonction H est elle aussi périodique et les équations II-24 prennent le nom d'équation de Hill.

Lorsque $\phi_0(t) = U - V \cos \Omega t$ l'équation de Hill se ramène simplement à l'équation de Mathieu.

II.1.2.2 Théorie de Floquet

L'équation de Hill (équation II-24) selon l'axe Ox peut s'écrire comme une équation différentielle matricielle du premier ordre non autonome¹ (le même traitement pourrait être fait selon l'axe Oy en remplaçant H(t) par -H(t)) :

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} x \\ \dot{x} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} 0 & 1 \\ H(t) & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ \dot{x} \end{pmatrix} = 0 \quad \text{II-26}$$

Ici, Q est une fonction périodique définie sur l'ensemble \mathbb{R} des réels et prenant ses valeurs dans l'ensemble $\mathcal{M}_2(\mathbb{R})$ des matrices carrées réelles d'ordre deux.

II.1.2.2.1 Notion de matrice de monodromie

La théorie générale des équations différentielles, en particulier le théorème de Cauchy-Lipschitz, permet de montrer que l'espace des solutions de cette équation (noté Sol dans la suite) est de dimension deux dont une base serait $\{X_1(t); X_2(t)\}$ où X_1 , respectivement X_2 , serait la solution maximale au problème de Cauchy $X_1(0) = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix}$, respectivement $X_2(0) = \begin{pmatrix} 0 \\ 1 \end{pmatrix}$. Ces deux solutions sont les solutions normalisées de l'équation II-26.

En particulier il existe une matrice $R(t, t_0)$ (la résolvante du système) qui a les propriétés suivantes (cf. [14], [15], [21]) :

- $R(t_0, t_0) = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix}$;
- $\forall (t, t') \in \mathbb{R}^2$ et $\forall X \in \text{Sol}, X(t') = R(t', t)X(t)$;
- $\forall (t, t') \in \mathbb{R}^2, R(t, t') = R(t, 0)R(t', 0)^{-1}$;
- $\forall t \in \mathbb{R}, R(t, 0) = (X_1(t), X_2(t))$.

Ces propriétés permettent en particulier d'écrire le théorème de Floquet (cf. [22]) :

Lorsque Q est une fonction T-périodique toute solution X de l'équation II-26 satisfait :

$$\forall n \in \mathbb{Z}, \forall s \in [0; T[, X(nT + s) = R(T, 0)^n R(s, 0)X(0)$$

Et cette matrice $R(T, 0)$, notée M dans la suite, est appelée le matrice de monodromie (cf. [14], [15]). Les déterminants des résolvantes étant constantes et égales à un^2 (il s'agit du wronskien du système), on en déduit la propriété suivante :

Le déterminant de la matrice de monodromie est égal à un

¹ Une équation différentielle est dite non autonome lorsque ses coefficients dépendent du temps

² En effet $\forall t \in \mathbb{R}, \frac{d}{dt}|R(t, 0)| = \frac{d}{dt}(x_1\dot{x}_2 - x_2\dot{x}_1) = x_1\ddot{x}_2 - x_2\ddot{x}_1 = x_1(-H(t)x_2) - x_2(-H(t)x_1) = 0$ et $|R(0, 0)| = \begin{vmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{vmatrix} = 1$ par définition de $R(t, 0)$

II.1 Piège quadrupolaire idéal

II.1.2.2.2 Multiplicateur de Floquet et critère de stabilité

Le théorème de Floquet permet donc d'écrire toute solution X de l'équation II-26 comme le produit d'une fonction matricielle f T-périodique modulée par un facteur exponentiel¹ :

$$\forall t \in \mathbb{R}, X(t) = e^{\Lambda t} f(t) X(0) \quad \text{II-27}$$

Le terme matriciel $e^{\Lambda} = R(T, 0)^{1/T}$ dans l'équation II-27 est appelé multiplicateur de Floquet du système. Son étude permet de caractériser la stabilité de l'équation de Hill associée² :

Les solutions de l'équation de Hill sont stables si, et seulement si, les valeurs propres du multiplicateur de Floquet associé sont de module inférieur ou égal à un³

En particulier, puisque la fonction H de l'équation II-24 peut se ramener par homothétie à une fonction de période 1, le critère de stabilité de l'équation de Hill se réduit à l'étude des valeurs propres de la matrice de monodromie M associée :

Les solutions de l'équation de Hill sont stables si, et seulement si, les valeurs propres de la matrice de monodromie associée sont de module inférieur ou égal à un

Puisque le déterminant de la matrice de monodromie est égal à un (cf. section II.1.2.2.1 page 81) et que celle-ci est une matrice d'ordre deux, ses valeurs propres λ sont les solutions de l'équation :

$$\lambda^2 - (\text{Tr } M)\lambda + 1 = 0 \quad \text{II-28}$$

Les valeurs propres de la matrice de monodromie, solutions de l'équation II-28, peuvent donc s'exprimer en fonction de la trace de cette matrice sous la forme :

$$\lambda = \frac{(\text{Tr } M) \pm \sqrt{(\text{Tr } M)^2 - 4}}{2} \quad \text{II-29}$$

La Figure II-8 ci-dessous montre les valeurs prises par les valeurs propres de la matrice de monodromie en fonction de la valeur de sa trace. Seules les valeurs de la trace comprises entre -2 et 2 permettent aux deux valeurs propres de voir leurs modules simultanément inférieurs ou égaux à un.

¹ Il suffit de poser $\Lambda = \frac{1}{T} \ln M$ (l'existence du logarithme est assurée par $|M| \neq 0$) et f est la fonction T-périodique telle que $\forall s \in [0; T[, f(s) = R(s, 0)e^{-\Lambda s}$

² La partie réelle des valeurs propres de la matrice Λ sont en fait les exposants de Lyapunov du système (cf. [42], [43])

³ En effet, la fonction f est périodique et bornée sur une période, donc bornée sur \mathbb{R}

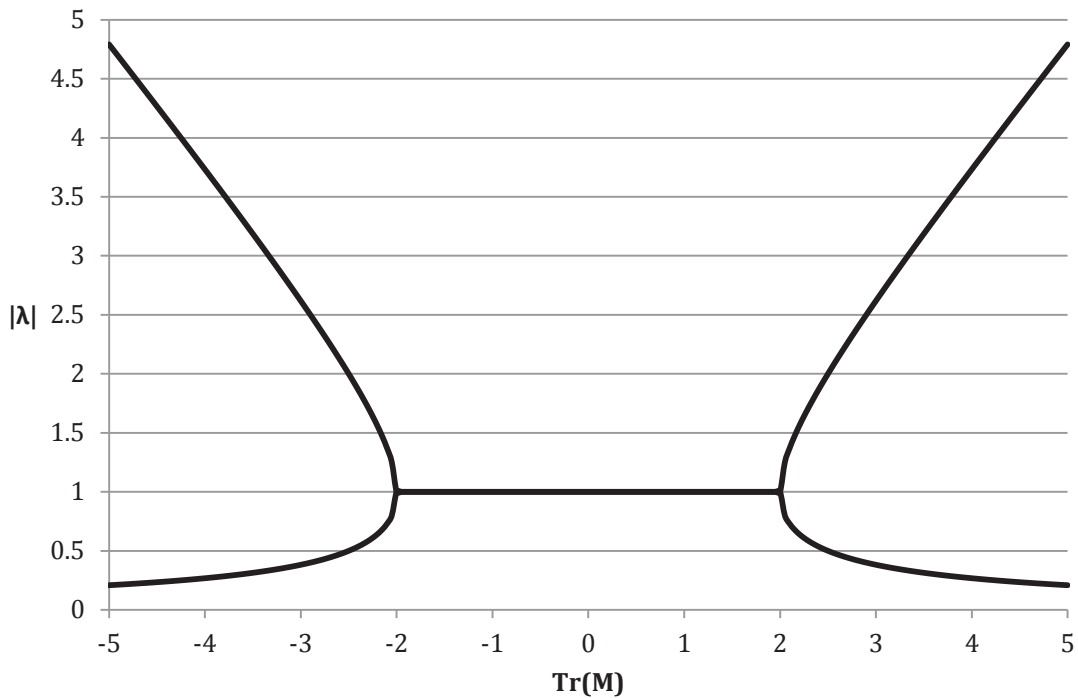


Figure II-8 : Graphe des valeurs propres de la matrice de monodromie en fonction de sa trace

La condition de stabilité de l'équation de Hill peut donc finalement se ramener à une condition simple sur la trace de sa matrice de monodromie :

Les solutions de l'équation de Hill sont stables si, et seulement si, la trace de la matrice de monodromie associée est inférieure ou égale à 2 en valeur absolue

C'est cette condition qui sera utilisée par la suite afin de tracer numériquement les diagrammes théoriques de stabilité (cf. section II.3.2 page 105).

II.1.2.2.3 Lien entre la matrice de monodromie et le paramètre β

La théorie de Floquet permet en outre de préciser un paramètre important des solutions de l'équation de Hill : leur période ou encore, ce qui revient au même, leur fréquence. En effet, il est possible de démontrer que lorsque la solution de l'équation de Hill est stable (cf. [23]) :

$$Tr M = 2 \cos \pi\beta \tag{II-30}$$

Où le paramètre β revêt la même signification que précédemment, c'est-à-dire que la solution est périodique de période βT .

II.1.2.3 Transformations du diagramme de stabilité

L'étude générale de la théorie de Floquet appliquée aux équations de Hill permet d'étudier la stabilité des solutions des équations de la forme :

$$\frac{d^2x}{dt^2} + H(t)x = 0 \quad \text{II-31}$$

Où la fonction H est une fonction périodique.

Appliquée à l'étude du fonctionnement des QMF et des LIT, la théorie de Floquet permet en particulier d'étudier la stabilité des ions soumis :

- À un potentiel de la forme $a - q \cos 2t$ (ce sont les équations de Mathieu, qui ont été précédemment étudiées à la section II.1.1 page 67) ;
- À un potentiel de la forme $a - q \cos 2t - q_1 \cos 2vt$ lorsque v est un nombre rationnel (ce sont les équations de Mathieu avec une excitation, qui seront étudiées en détail à la section II.3.2 page 105) ;
- À un potentiel de la forme $a - q \cos 2t - \sum_n q_n \cos 2v_n t$ lorsque les v_n sont une suite de nombres rationnels (ce sont les équations de Mathieu avec plusieurs excitations, qui seront étudiées en détail à la section II.3.2.5 page 112) ;
- À un potentiel de la forme $a - qK_\tau(t)$ où K_τ est la fonction carré d'amplitude 1, de période 1 et de rapport cyclique τ (c'est l'équation de Meissner, qui présente d'excellentes propriétés pour le piégeage et l'analyse d'ions dans un système quadrupolaire et qui sera rapidement étudiée à la section II.1.2.3.2 page 85).

Malgré tout, l'étude numérique de la stabilité des équations de Hill étant gourmande en temps de calcul, il serait souhaitable, une fois déterminé le diagramme de stabilité associé à une fonction H, de pouvoir qualitativement prédire les modifications apportées à ce diagramme lorsqu'on ajoute une composante εH_1 (ε petit devant 1) à H. C'est l'objet de la section II.1.2.3.1 ci-après.

II.1.2.3.1 Ajout d'une excitation radiofréquence : continuité du flot de Cauchy

Les outils mathématiques de la théorie des équations différentielles (en particulier le théorème de Floquet) permettent de suivre la stabilité des solutions des équations de Hill (équation II-31) lorsque la fonction H est paramétrée par une ou plusieurs variables (a et q dans le cas de l'équation de Mathieu ; a , q et τ dans le cas de l'équation de Meissner etc.).

Quelle est l'évolution qualitative de la stabilité des solutions lorsqu'un paramètre varie très faiblement devant les autres ?

La réponse à cette question est apportée par le théorème de Cauchy-Lipschitz : les solutions varient continûment avec le dit paramètre. Il est même possible d'apporter une précision quantitative à ce résultat. Considérons une équation de Hill de la forme :

$$\frac{d^2x}{dt^2} + [H(t) + \varepsilon H_1(t)]x = 0 \quad \text{II-32}$$

La résolvante de cette équation dépend continûment du paramètre ε (d'après le théorème de Cauchy-Lipschitz) et il est possible d'utiliser l'inégalité de Taylor-Lagrange sur le développement limité à l'ordre zéro de la résultante autour de $\varepsilon = 0$:

$$\forall m \in \mathbb{R}, \forall (t, t_0) \in \mathbb{R}^2, \forall \varepsilon \in [0; m[, \quad \text{II-33}$$

$$|R_\varepsilon(t, t_0) - R_0(t, t_0)| \leq \varepsilon \cdot \max_{\varepsilon \in [0; m[} \left| \frac{\partial}{\partial \varepsilon} R_\varepsilon(t, t_0) \right|$$

Ce résultat est vrai pour la résultante et donc en particulier pour la matrice de monodromie et pour toutes ses matrices semblables. L'inégalité tient donc encore pour la trace de la matrice de monodromie (la trace étant une application linéaire) et pour sa valeur absolue (par application de l'inégalité triangulaire) :

$$\forall m \in \mathbb{R}, \exists A_m > 0: \forall \varepsilon \in [0; m[, \quad ||Tr M_\varepsilon| - |Tr M_0|| \leq A_m \varepsilon \quad \text{II-34}$$

Hormis donc pour le cas particulier où $|Tr M_0| = 2$, l'ajout d'une petite composante supplémentaire au potentiel ne change pas la stabilité de la solution. Cette dernière remarque justifie a posteriori l'approche utilisée à la section II.1.1.5 (page 78) pour donner un critère de résonance des ions dans un piège quadripolaire. Bien qu'en toute rigueur il faille utiliser la théorie de Floquet, lorsque l'excitation est suffisamment petite la théorie des équations de Mathieu suffit à décrire le comportement du système.

II.1.2.3.2 Cas particulier : l'équation de Meissner et le Digital Ion Trap

Dans cette partie la fonction périodique H considérée sera de la forme :

$$H(t) = a - qK_\tau(t) \quad \text{II-35}$$

Où K_τ est la fonction carré d'amplitude 1, de période 1 et de rapport cyclique τ . Un LIT ou un QUISTOR dont le potentiel appliqué serait de cette forme est appelé un DIT¹.

L'intérêt d'un tel dispositif vient de la simplicité de l'électronique mise en œuvre pour générer un tel signal. Les dispositifs d'électronique de puissance disponibles à l'heure actuelle permettent de générer des signaux de haute fréquence et de grande puissance pour un encombrement et un coût minime tout en conservant une grande qualité métrologique (cf. [24], [25], [26]).

Lorsque le paramètre a de l'équation II-35 est nul, le diagramme de stabilité de l'équation de Hill associée dans le plan $(q; \tau)$ ressemble au diagramme de Mathieu classique (cf. Figure II-4 page 72). En particulier il présente un apex au point de coordonnées $\binom{q}{\tau} = \binom{11,58}{0,612}$ (cf. Figure II-9), ce qui permet d'envisager d'utiliser la technologie des DIT pour réaliser des analyses en masse (cf. [25]).

¹ Digital Ion Trap

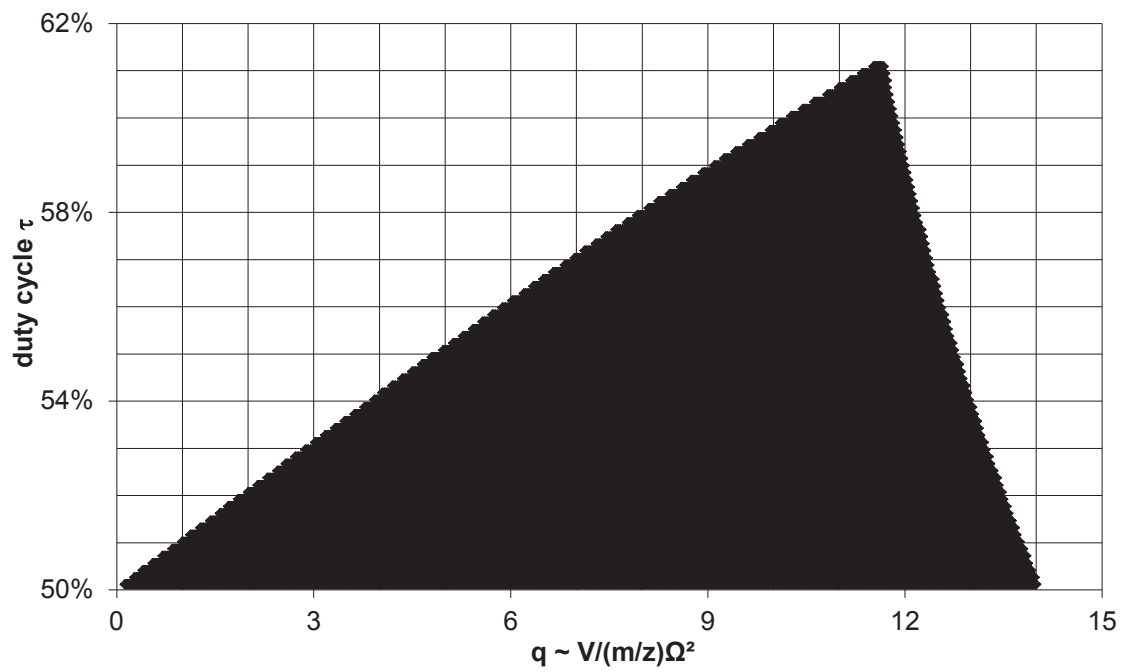


Figure II-9 : Diagramme de stabilité de l'équation de Meissner sans offset. Ce diagramme est symétrique par rapport à l'axe $\tau = 50\%$

II.2 Piège quadrupolaire réel

Un LIT ou un QMF réel génère des champs électriques de confinement qui peuvent s'écarter sensiblement du cas idéal purement quadripolaire décrit par l'équation II-1 (page 67). Par ailleurs les ions confinés dans le dispositif ne sont ni isolés les uns des autres (leurs mouvements sont donc corrélés par interaction électromagnétique) ni tout à fait isolés du milieu extérieur (le vide n'étant pas parfait, les ions sont susceptibles d'entrer en collision avec des molécules de gaz neutre). Enfin, les dispositifs réels ont des extensions spatiales finies, que ce soit dans le plan Oxy (l'excursion des ions dans ce plan ne peut pas être infinie) ou selon l'axe Oz (dans un QMF les ions ne subissent pas une infinité de cycles de potentiel avant de sortir).

Toutes ces contraintes modifient légèrement les équations qui gouvernent le comportement des ions dans un système quadripolaire linéaire réel.

II.2.1 Composantes non quadrupolaires

L'introduction de composantes non quadrupolaires (qu'elle soit volontaire ou non) modifie le comportement des ions dans le système. En particulier, à la différence du cas idéal, la fréquence de résonance des ions n'est plus indépendante de leur position dans le piège (comme c'était le cas dans l'équation II-13 page 76) : le paramètre β devient dépendant des paramètres de Mathieu a et q mais aussi des positions x et y (cf. [27]).

Cette dépendance peut conduire à des éjections d'ions de masses différentes de celles qui auraient été prévues dans le cas idéal, mais aussi a contrario à stabiliser des ions qui auraient été perdus en l'absence de composantes hexapolaires ou supérieures (cf. [27]).

Schulte *et al.* ont montrés (cf. [28]) que l'introduction de composantes non quadrupolaires conduit à diviser l'entrefer du QMF en deux zones. Dans la première zone, au voisinage du centre du système, le comportement des ions est sensiblement équivalent à celui qu'ils auraient dans un champ quadripolaire pur. Dans la seconde zone en revanche les ions sont accélérés par les effets non linéaires et perdus (cf. Figure II-10).

L'existence de cette zone conduit à une diminution de la sensibilité du QMF, cependant l'optimisation des dimensions des électrodes permet d'atténuer ces effets (cf. [28] et section I.3.2.1.2 page 36).

II.2 Piège quadrupolaire réel

L'ajout de composantes hexapolaires ou octopolaires modifie aussi l'allure des limites du diagramme de stabilité. Par exemple Sevugarajan *et al.* ont montrés (cf. [29], [30]) d'une part que le LMC0 du diagramme de stabilité était modifié par cet ajout (cf. Figure II-11) mais aussi que l'expression du paramètre β en fonction de a et de q s'écartait sensiblement des valeurs calculées par l'équation II-14 (cf. Figure II-12). Zhou *et al.* ont montrés le même phénomène de modification des limites du diagramme de stabilité lorsqu'une contribution octopolaire était ajoutée (cf. [31] et Figure II-13).

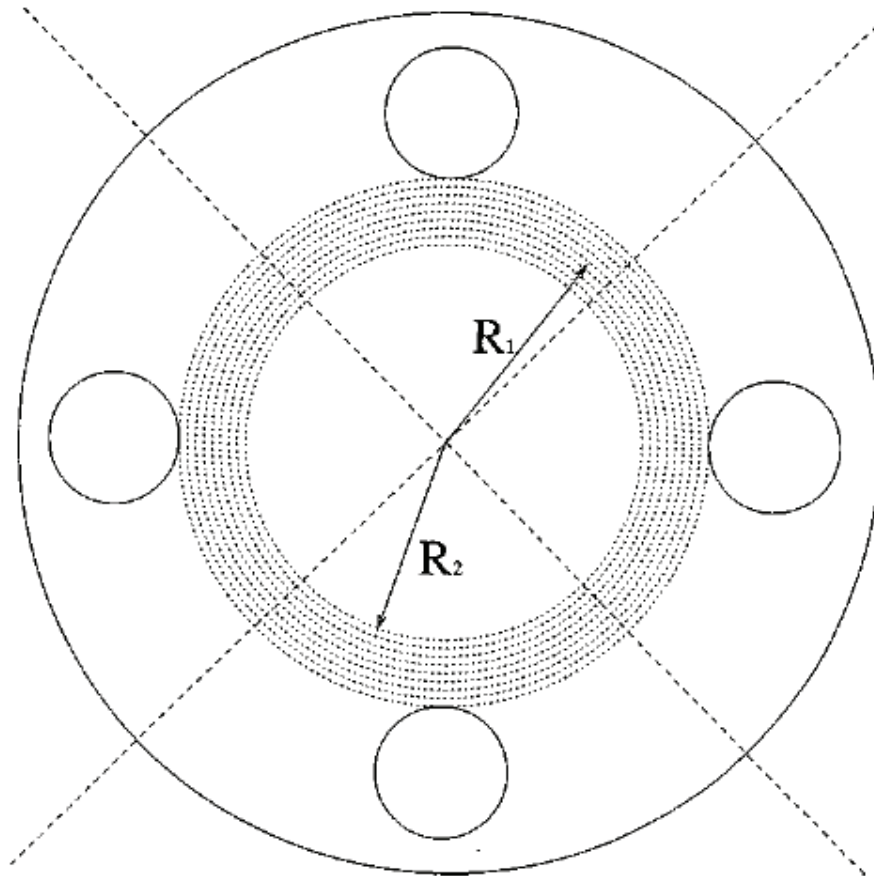


Figure II-10 : Schéma de l'entrefer d'un QMF à électrodes circulaires. La couronne circulaire grisée représente la zone où les ions sont accélérés par les non linéarités du champ et sont perdus (d'après [28])

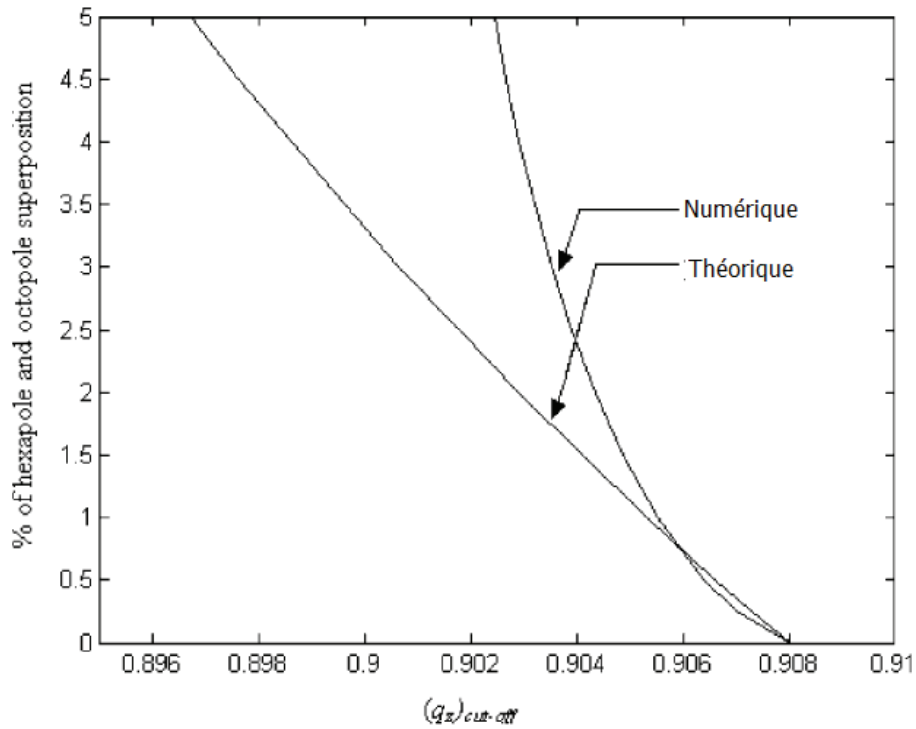


Figure II-11 : Décalage de la valeur du LMC0 (déterminée par calcul théorique ou par simulation numérique) en fonction du pourcentage de composante hexapolaire ou octopolaire ajoutée. Lorsque celui-ci est à 0, le LMC0 vaut 0,908 comme le prévoit la théorie des équations de Mathieu (d'après [30])

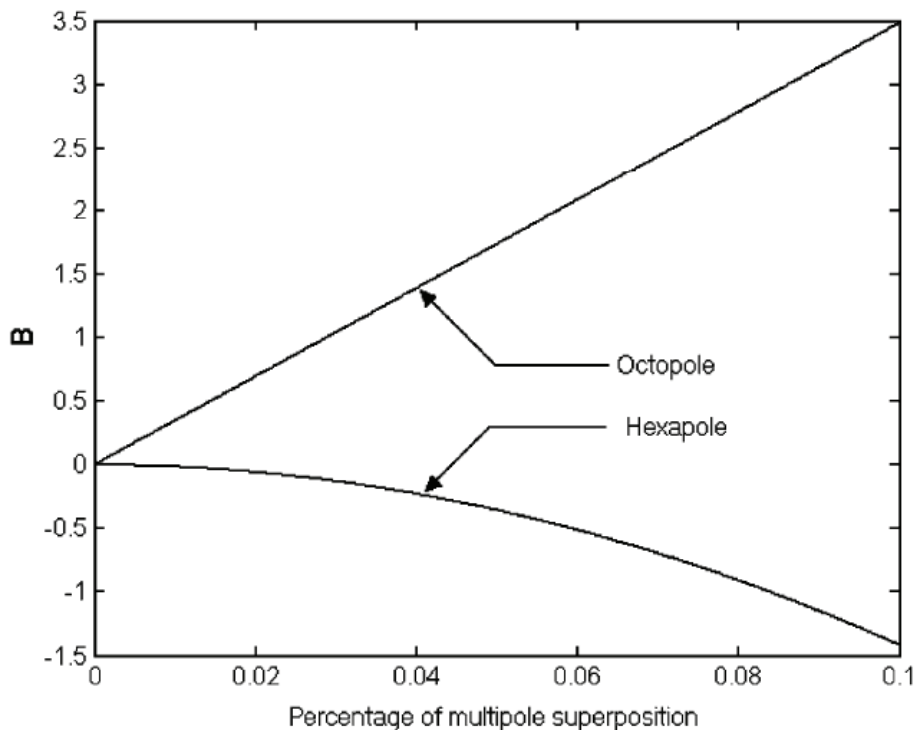


Figure II-12 : Décalage de la valeur de β en fonction du pourcentage de composante hexapolaire ou octopolaire ajoutée. Le paramètre B représente l'écart (en %) entre la valeur de β calculée dans le cadre de la théorie des équations de Mathieu et celle déterminée par simulation numérique (d'après [30])

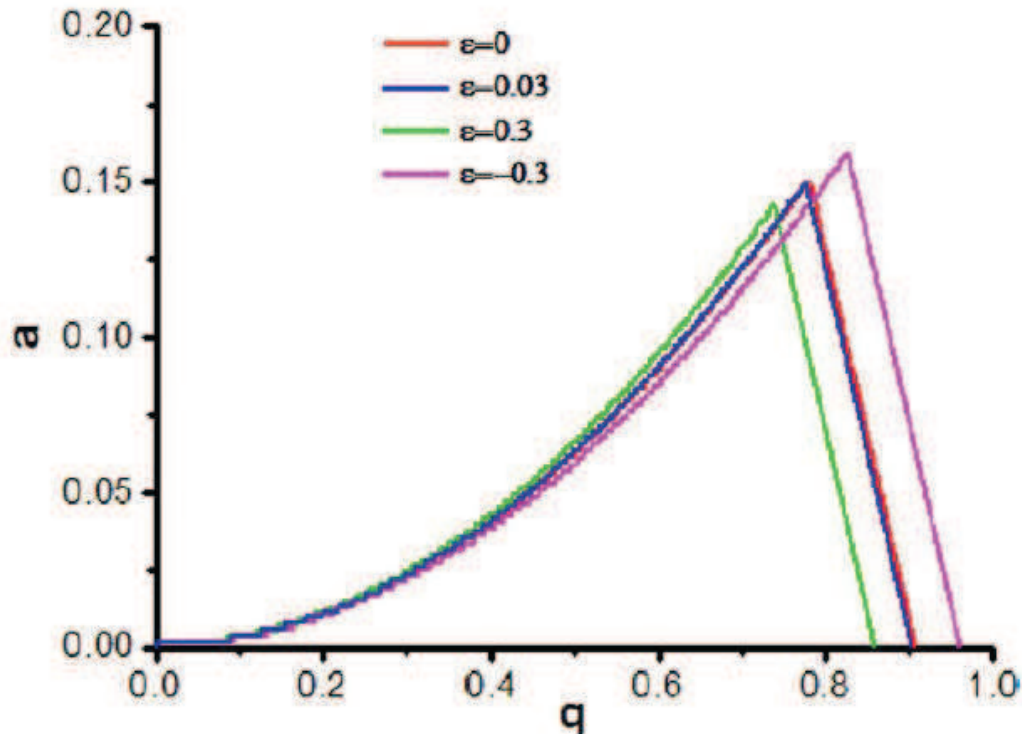


Figure II-13 : Décalage des limites du diagramme de stabilité lorsque une contribution ε d'un champ octopolaire est ajouté au champ quadripolaire (d'après [31])

Enfin, les champs non quadripolaires conduisent à un couplage des équations du mouvement des ions selon les axes Ox et Oy . Ce couplage provoque l'apparition de lignes d'instabilités dans le diagramme de Mathieu. Ces lignes ont pour équation dans le plan de Mathieu :

$$\begin{cases} n_x \beta_x(a, q) + n_y \beta_y(a, q) = 2 \\ |n_x| + |n_y| = N \end{cases} \quad \text{II-36}$$

Où n_x et n_y sont des entiers, β_x et β_y sont les paramètres β attachés au mouvement des ions respectivement selon les axes Ox et Oy et enfin N est l'ordre du champ considéré ($N = 3$ pour un champ hexapolaire, $N = 4$ pour un champ octopolaire etc.) (cf. [27], [32]). Les ions ayant des paramètres a et q respectant les conditions de l'équation II-36 sont en théorie instables. Cependant la présence du gaz de refroidissement (cf. section II.2.3 page 93) permet de limiter cet effet d'éjection non linéaire.

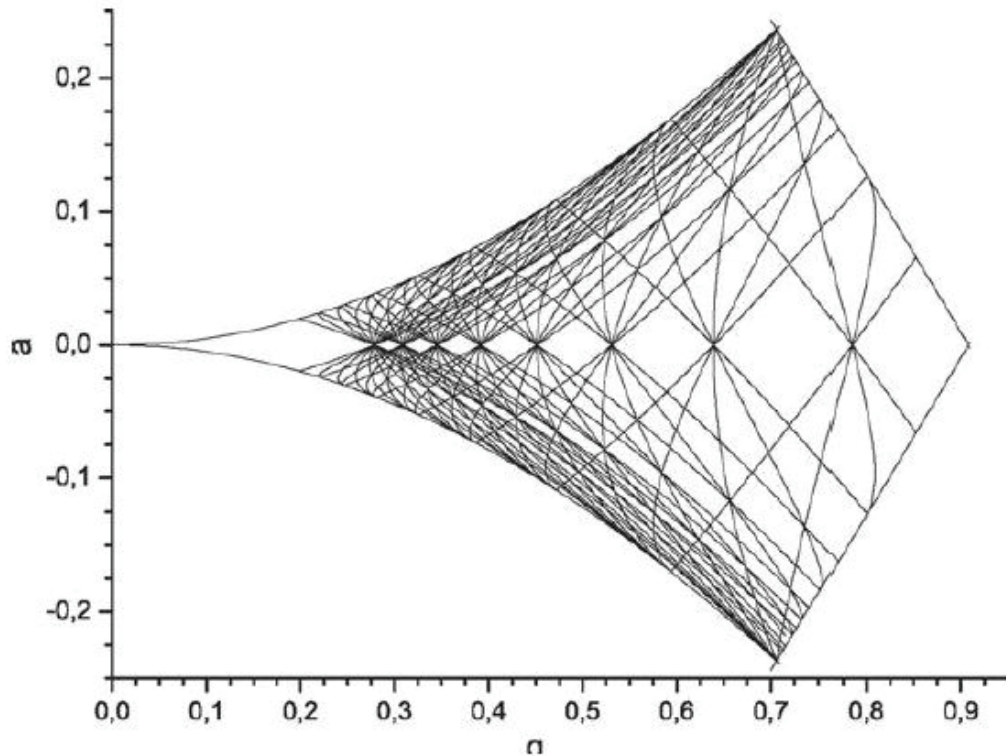


Figure II-14 : Lignes d'instabilité d'après l'équation II-36 pour N allant de 3 à 10 (d'après [32])

Ces imperfections du champ conduisent donc en particulier à un décalage de quelques pourcents des fréquences de résonance des ions dans un QMF ou un LIT à électrodes cylindriques. Ce décalage est cependant déterministe, il est donc possible d'en tenir compte lors de la calibration du système et donc de s'en affranchir lors de son utilisation.

II.2.2 Charge d'espace

Les ions confinés dans le système interagissent entre eux par le biais des champs électromagnétiques qu'ils génèrent. L'intensité de ce phénomène dépend de la densité de charge dans le dispositif et il existe une limite à cette densité au-delà de laquelle les ions ne peuvent plus être stabilisés par le champ radiofréquence (cf. [1], [33]).

Cette limite peut être aisément déterminée dans le cadre du modèle du pseudo-puits de potentiel : une densité de charge ρ (en $C.m^{-3}$) génère un potentiel électrostatique $V_{charges}$ qui satisfait en tout point de l'espace l'équation de Poisson :

$$\Delta V_{charges} = -\frac{\rho}{\epsilon_0} \quad \text{II-37}$$

En reprenant l'expression du puits de potentiel donnée par l'équation II-9 il est possible de faire apparaître l'expression du potentiel électrostatique V_{RF} qui lui serait associé :

$$V_{\text{RF}} = \frac{\bar{D}(r)}{e} = \frac{1}{8} \frac{m\Omega^2}{e} \left(a + \frac{q^2}{2} \right) r^2 \quad \text{II-38}$$

Le laplacien de ce potentiel quadratique est constant et vaut :

$$\Delta V_{\text{RF}} = \frac{1}{4} \frac{m\Omega^2}{e} \left(a + \frac{q^2}{2} \right) \quad \text{II-39}$$

En égalant les expressions données par les équations II-37 et II-39 il est possible de donner l'expression de ρ_{max} , densité de charges élémentaires (en cm^{-3}) qui génère un champ électrostatique contrebalançant exactement le puits de potentiel :

$$\rho_{\text{max}} = \frac{\varepsilon_0}{4e^2} m\Omega^2 \left(a + \frac{q^2}{2} \right) \quad \text{II-40}$$

En considérant une distribution de charges homogène dans un cylindre de rayon r_0 et de longueur L modélisant l'entrefer du LIT ou du QMF il devient possible de faire apparaître le nombre de charges élémentaires qu'il est possible de stocker dans le système¹ :

$$N_{\text{max}} = \frac{\pi\varepsilon_0}{4e^2} m r_0^2 \Omega^2 \left(a + \frac{q^2}{2} \right) L \quad \text{II-41}$$

La valeur de la densité maximale de charges élémentaires ρ_{max} est de l'ordre de 10^8 cm^{-3} pour $q = 0,38$ en mode RF-only sous une fréquence de l'ordre de 0,1 GHz (cf. [1]).

L'effet de charge d'espace, lorsque la densité des ions est faible devant ρ_{max} , peut s'interpréter comme l'ajout d'un terme U_{ion} au potentiel appliqué aux électrodes (donné par l'équation II-2 page 67) :

$$U_{\text{ion}} = \frac{\rho r_0^2}{4\varepsilon_0} \quad \text{II-42} \quad (\text{d'après [34]})$$

Dans les faits, cette contribution de l'effet de charge d'espace ajoute au plus quelques μV à la tension U (lorsque la densité de charges² est de l'ordre de 10^6 charges élémentaires par cm^3) et peut être négligée dans la suite.

Les interactions électromagnétiques entre les ions provoquent aussi l'apparition de couplages entre les différents degrés de liberté du nuage d'ions ce qui peut conduire à des résonances croisées et des décalages des fréquences de résonance (cf. [35], [36]), ce qui a pour effet de diminuer la résolution en masse de l'instrument (dans le cas du 2000QTrap, les effets de charge d'espace introduisent un biais en masse d'environ 10 mTh d'après [37]).

¹ En mode RF-only ($a = 0$) il est possible de simplifier encore l'expression qui devient $N_{\text{max}} = \frac{\pi\varepsilon_0}{2e} qzVL$

² Environ 500 mm^{-3} dans le Q3 du 2000QTrap d'après [39]

En conclusion, les effets de charge d'espace peuvent modifier le comportement des ions dans le système. Cependant ces effets ne sont perceptibles qu'à partir de densités de charges qui ne sont normalement pas atteintes dans les instruments commerciaux (cf. [35], [37], [38]). Ces effets ne seront donc pas pris en compte dans la suite.

II.2.3 Influence du gaz de refroidissement

Les instruments de spectrométrie de masse ne fonctionnent pas sous un vide parfait. Dans la plupart des instruments commerciaux un gaz neutre (souvent de l'hélium ou du diazote) est introduit dans le système afin de pouvoir refroidir les ions ou réaliser des fragmentations en mode CID. En régime d'utilisation normale (c'est-à-dire sans CID) la présence de molécules neutres modifie le comportement des ions qui, en moyenne, sont freinés et perdent de l'énergie cinétique. Ce phénomène focalise le nuage d'ions à proximité du centre du système. Ainsi Hager a montré (cf. [39]) que dans un LIT les ions se comportent comme s'ils étaient confinés dans un cylindre de rayon $\frac{r_0}{10}$, bien loin du rayon r_0 auquel ils ont en théorie accès.

Cette focalisation permet de s'affranchir des non linéarités du champ (cf. section II.2.1 page 87) dans le cas d'un instrument à électrodes cylindriques (cf. [40]). Elle permet aussi d'améliorer l'admittance et la transmittance d'un système QMF à haute résolution (plus la résolution en masse est grande, moins le système laisse passer d'ions au ratio masse/charge sélectionné, cf. [9]).

Cependant l'introduction d'un gaz modifie les équations du mouvement des ions (équation II-4) en y ajoutant un terme de freinage assimilable à une force de frottement. Chen *et al.* ont proposé (cf. [41]) le modèle de force suivant :

$$\vec{F} = -\kappa P \sqrt{\frac{m_{\text{gaz}}}{k_B T}} \sigma_{\text{gaz}} \vec{v} \quad \text{II-43}$$

Où P est la pression du gaz, T sa température, m_{gaz} la masse d'une molécule de gaz, σ_{gaz} la section efficace de collision de l'ion avec les molécules de gaz, v sa vitesse et κ un coefficient numérique sans dimension dépendant du type de collisions (diffuses ou spéculaires).

Sevugarajan et al. ont montré (cf. [29]) qu'aux pressions utilisées (environ 10^{-5} Torr pour le 2000 QTrap, cf. [37]), le terme de freinage induisait un décalage « vers le bleu » des fréquences de résonance des ions d'au plus 2 %, cet effet étant plus sensible sur les ions de faible masse que sur les ions de grande masse. Comme pour la prise en compte des éventuelles non linéarités du champ de confinement (cf. section II.2.1 page 87) ce décalage peut être compensé par une calibration appropriée du système.

En l'absence de terme de freinage une excitation, aussi faible soit-elle, provoque la déstabilisation des ions qui entrent en résonance à cette fréquence (cf. section II.1.1.5 page 78). Ceci n'est plus vrai lorsqu'un terme de freinage est présent. Celui-ci introduit alors un seuil pour l'amplitude du potentiel d'excitation, seuil en-deçà duquel l'excitation des ions est compensée par leur frottement avec le gaz neutre (cf. [23]).

II.2.4 Influence de la finitude des quadripôles linéaires réels

À la différence d'un QMF idéal, un QMF ou un LIT réel a une dimension finie selon l'axe Oz. Cette différence implique que les ions entrant dans le système ne subissent qu'un nombre fini de cycles RF avant d'en sortir.

Afin que les ions puissent suivre le comportement prévu par les équations de Mathieu (ou plus généralement par les équations de Hill) il est nécessaire qu'ils subissent au moins deux cycles RF (cf. [1]). Dans le cas d'un QMF, cela implique que la vitesse des ions selon l'axe Oz (noté v_z) respecte l'inégalité :

$$v_z \leq \frac{\Omega L}{4\pi} \quad \text{II-44}$$

La vitesse des ions selon l'axe Oz est conservée en première approximation dans le système (sous les hypothèses que le vide soit parfait et que les effets de bord soient négligeables). Cette dernière remarque conduit à une condition sur l'énergie cinétique des ions selon l'axe Oz qui sont introduits dans le piège :

$$E_{c|(Oz)} \leq \frac{1}{32\pi^2} m\Omega^2 L^2 \quad \text{II-45}$$

De la même façon, en se plaçant dans le cadre de l'approximation de Dehmelt (cf. section II.1.1.3 page 74), il est possible de donner une majoration de l'énergie cinétique des ions dans le plan Oxy en supposant que l'énergie cinétique des ions n'excède pas la profondeur du puits de potentiel :

$$E_{c|(Oxy)} \leq \frac{1}{8} \left(a + \frac{q^2}{2} \right) m\Omega^2 r_0^2 \quad \text{II-46}$$

En mode RF-only, en respectant la condition de validité que l'approximation de Dehmelt ($q \leq 0,4$), l'équation II-46 devient :

$$E_{c|(Oxy)} \leq \frac{1}{100} m\Omega^2 r_0^2 \quad \text{II-47}$$

Ces conditions permettent de donner, pour une tension d'accélération en entrée fixée, une valeur limite basse à la pulsation Ω pour utiliser le QMF dans le cadre de la théorie des équations de Mathieu et de Hill qui a été présentée auparavant (cf. section II.1 page 67), mais aussi des limites aux conditions initiales imposées aux ions dans le cadre des simulations numériques présentées ci-après (cf. section II.3.1).

II.3 Simulation informatique du comportement des ions

II.3.1 Dans le domaine temporel

L'étude du comportement d'un nuage d'ions en fonction du temps permet de répondre, entre autre, aux questions suivantes :

- Quel est l'effet de la valeur du paramètre géométrique r_0 sur le critère de stabilité des ions dans un QMF ou un LIT (cf. section II.3.1.1 page 96) ;
- Quels sont les effets d'une excitation sur le comportement des ions (ceux qui sont excités en théorie comme ceux qui ne devraient pas l'être) en termes d'énergie cinétique (cf. section II.3.1.2 page 101) et de position (cf. section II.3.1.3 page 104).

Ce dernier point permet de lier position et énergie cinétique des ions et de tracer un profil de potentiel moyen, cohérent avec le modèle du pseudo-puits de potentiel (cf. section II.1.1.3 page 74).

Les simulations numériques ont été réalisées à l'aide d'un logiciel de calcul développé dans le cadre de ce travail et nommé SIAQ¹. Ce logiciel, codé en C++, permet de calculer la trajectoire d'un ou plusieurs ions de masses et de charges données dans un potentiel de la forme :

$$\begin{aligned} \phi(r, \theta, t) = & \left(U - \sum_n V_n \cos \Omega_n t \right) \left(\left(\frac{r}{r_0} \right)^2 \cos 2\theta \right. \\ & \left. + \sum_{n>0} C_{4n+2} \left(\frac{r}{r_0} \right)^{4n+2} \cos(4n+2)\theta \right) \end{aligned} \quad \text{II-48}$$

Le logiciel SIAQ permet donc de calculer la trajectoire d'ions dans des champs quadrupolaires avec éventuellement des composantes d'ordres plus élevés (hexapolaires, octopolaires etc.) avec ou sans potentiels d'excitation. Il ne permet pas, en revanche, de prendre en compte d'éventuelles interactions entre les ions ou entre les ions et des molécules de gaz. Les résultats des simulations réalisées en prenant un champ non purement quadrupolaire étant conformes aux résultats présentés à la section II.2.1 (page 87), ceux-ci ne seront pas détaillés ici.

La propagation de la trajectoire se fait en résolvant les équations du mouvement (cf. équation II-3 page 67) par la méthode d'Euler avec un pas de temps fixé à l'avance et inférieur à dix fois la limite de Nyquist, ce qui assure l'existence d'au moins vingt points d'intégration de la trajectoire pour chaque cycle de RF. Le critère d'arrêt des simulations est le suivant :

¹ Simulateur d'Ions dans un Analyseur Quadrupolaire

II.3 Simulation informatique du comportement des ions

- Soit les ions traversent le QMF et atteignent un point dont la coordonnée selon l'axe Oz dépasse une valeur L fixée à l'avance (dans toute la suite cette valeur est fixée à 10 cm), auquel cas les ions sont considérés comme stables ;
- Soit les ions voient leur excursion r dépasser une valeur r_0 fixée à l'avance (dans toute la suite cette valeur est fixée à 2 mm, valeur du même ordre de grandeur que dans le 2000 QTrap), auquel cas les ions sont considérés comme instables.

La trajectoire des ions dépendant des conditions initiales (position et vitesse), les calculs sont effectués sur des nuages d'ions identiques dont les vitesses et les positions initiales sont fixées aléatoirement dans une gamme donnée. Cela permet de déterminer un comportement moyen, indépendant des conditions initiales.

II.3.1.1 Critères de stabilité réelle et transmittance du système

Les théories mathématiques des équations de Hill et de Mathieu ne prennent pas en compte l'existence de limites spatiales sur la position des ions. En particulier les limites L et r_0 ne sont pas considérées pour déterminer le critère de stabilité des ions. Or, dans un système QMF à détection axiale (comme le 2000 QTrap), les ions dont l'excursion r dépasse la valeur r_0 (dimension de l'entrefer du système) sont perdus et ne peuvent être détectés. L'étude de l'influence de cette limite revêt donc une importance capitale pour la suite de cette étude.

Le calcul du diagramme de stabilité « réaliste » a été effectué comme suit : un nuage de 500 ions de ratio m/z fixé à 100 Th a été généré avec des conditions initiales déterminées aléatoirement et telles que :

- L'énergie cinétique des ions selon l'axe Oz soit constante de valeur 10 eV (valeur cohérente avec la limite imposée par l'équation II-45) ;
- L'énergie cinétique des ions projetée dans le plan Oxy varie uniformément entre 0 et 1,5 eV (valeurs cohérentes avec la limite imposée par l'équation II-47) ;
- La position initiale des ions est fixée à $z = 0$ et r varie uniformément entre 0 et $0,1r_0$ (conformément au comportement réel des ions, cf. section II.2.3 page 93).

Les trajectoires de ces ions et leurs stabilités ont alors été déterminées pour 10000 valeurs de a et de q différentes dans le plan de Mathieu (a variant de 0 à 0,3 et q variant de 0 à 1). Le décompte du nombre d'ions transmis par le système permet de tracer un diagramme de stabilité « réaliste » (cf. Figure II-15) et de reporter dessus la transmittance du système (défini comme le ratio du nombre d'ions transmis sur le nombre d'ions introduits à l'origine, il est donc compris entre 0 et 1).

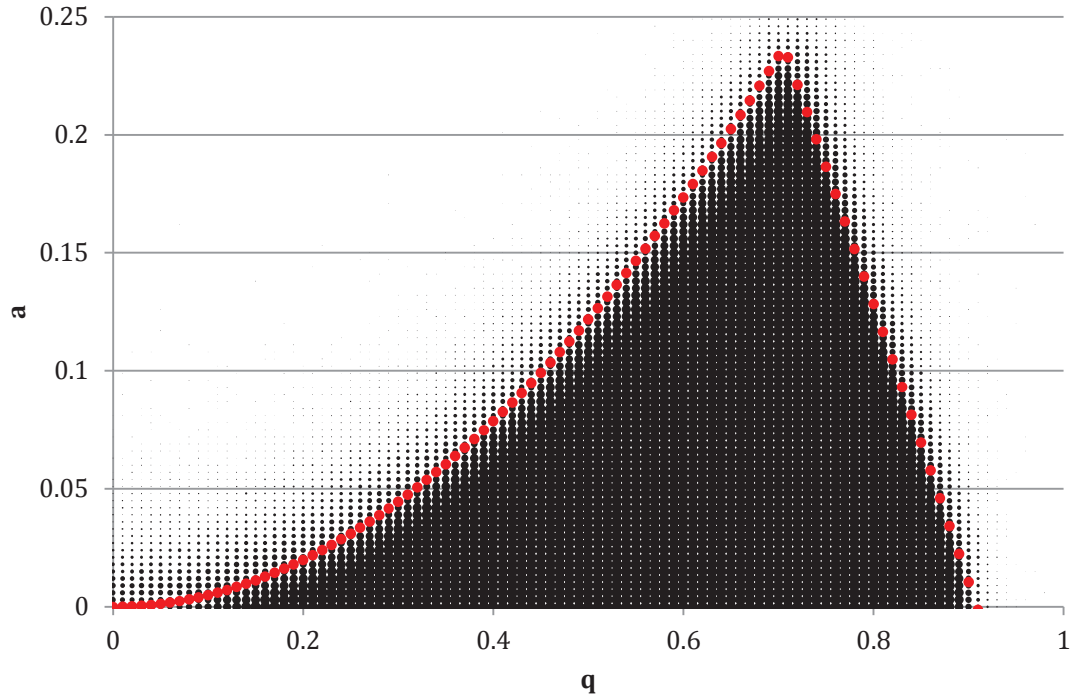


Figure II-15 : Diagramme de stabilité « réaliste » d'un QMF simulé par le logiciel SIAQ. Le diamètre de chaque point noir est proportionnel à la transmittance du système. Les points rouges figurent les limites théoriques du diagramme de stabilité, données par l'équation II-7

La forme du diagramme de stabilité « réaliste » est similaire au diagramme de stabilité théorique d'un QMF idéal (cf. Figure II-4). Cependant le nombre d'ions traversant le système est plus faible lorsque les paramètres a et q sont choisis proches des frontières de la zone de stabilité. Cela est particulièrement vrai au niveau de l'apex. Cette remarque est cohérente avec la propriété de l'apex suivante, décrite par Douglas *et al.* (cf. [9]) : plus la sélectivité en masse est importante, plus la transmittance est faible. Cette propriété est liée au caractère fini de r_0 . Par ailleurs, la transmittance du système n'est pas nulle en dehors de la zone théorique de stabilité (en particulier pour les valeurs de q élevées, qui correspondent à des ions de rapport m/z élevé et donc dont le mouvement est peu sensible aux champs RF), cela s'explique par le fait que les ions subissent un nombre fini de cycles de RF (la longueur L d'un QMF étant finie).

Le logiciel SIAQ permet aussi d'étudier la transmittance d'ions de différentes masses en fonction de l'intensité relative d'excitation q' définie comme :

$$q' = \frac{q_1}{q} = \frac{V_{\text{excitation}}}{V} \tag{II-49}$$

II.3 Simulation informatique du comportement des ions

Ce calcul a été réalisé dans le cas d'une population d'ions de ratio m/z s'échelonnant de 300 Th à 700 Th par pas de 1 Th. Les valeurs de U , V et $\Omega/2\pi$ ont été fixées à, respectivement, 0 V, 100 V et 1 MHz. Le nombre d'ions de chaque masse est fixé à 500 et les conditions initiales ont été fixées comme précédemment. Le système est soumis à une tension d'excitation d'intensité relative q' et de fréquence calculée (selon l'équation II-14 page 77) de façon à ce que la masse théoriquement déplétée soit 400 Th. La transmittance du système a alors été calculée pour différentes valeurs de q' et les résultats sont présentés sur le graphique de la Figure II-16.

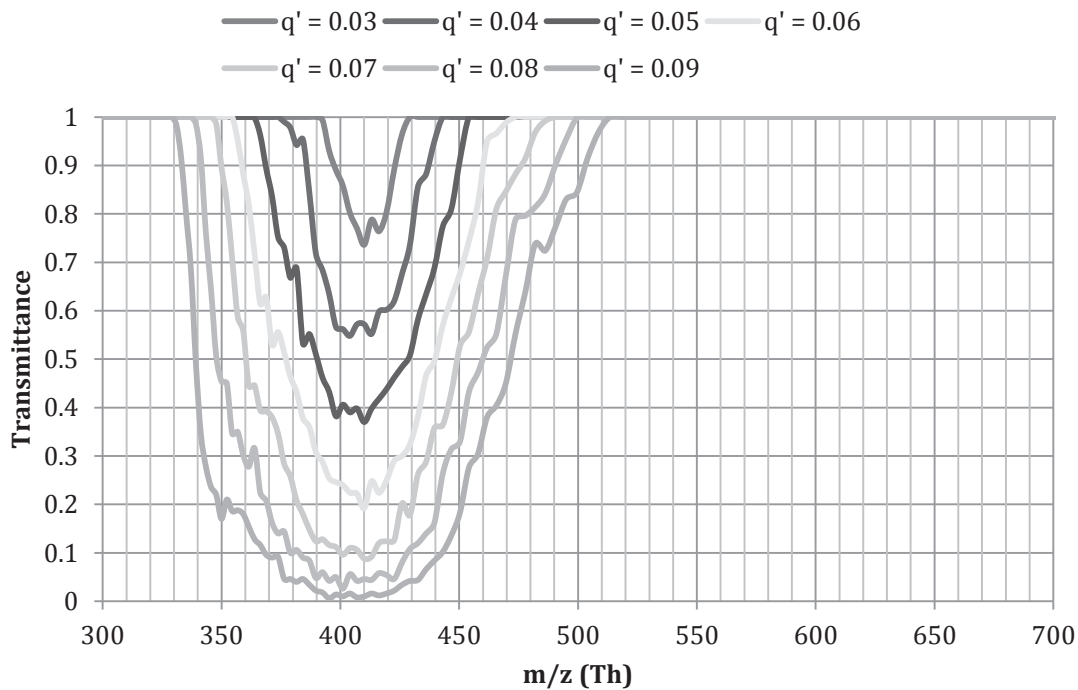


Figure II-16 : Graphe des transmittances d'ions soumis à une excitation en fonction de l'intensité relative q' de l'excitation

Ce résultat appelle plusieurs remarques. D'une part l'équation II-14 permettant de déterminer théoriquement β (et donc $\Omega_{\text{excitation}}$) en fonction des paramètres a et q permet en effet de générer une tension excitant les ions de ratio m/z prévu. D'autre part la largeur de la vallée de déplétion, ainsi que sa profondeur, sont fonctions de l'amplitude de la tension d'excitation : plus l'amplitude de l'excitation est forte, plus la vallée est large et profonde. Dans les exemples des Figure II-16 et Figure II-17 la largeur de la vallée d'instabilité est très importante (et donc la résolution en masse $\Delta m/m$ très faible : de l'ordre de 0,1 pour l'excitation à 400 Th, $q' = 0,04$), bien loin des résolutions atteintes en pratique (cf. Chapitre IV). Cela s'explique d'une part par l'absence des effets du gaz de refroidissement dans le système simulé mais aussi par la valeur maximale des $E_{c1(0xy)}$ en condition initiales, bien supérieures à celles rencontrées dans un système réel.

La question du comportement du QMF lorsque plusieurs excitations sont simultanément imposées peut, de la même façon, être résolue par le logiciel SIAQ. Dans l'exemple présenté à la Figure II-17, deux tensions d'excitation ont été superposées au potentiel de confinement, d'abord séparément puis concomitamment avec la même amplitude (ici $q' = 0,04$ ou $q' = 0,06$). Le comportement des ions soumis à deux excitations simultanées est similaire à celui qu'ils auraient s'ils étaient soumis à ces deux mêmes excitations mais imposées l'une après l'autre. La zone d'instabilité autour de 315 Th provient d'une résonance d'ordre plus élevée ($K = 2$ dans l'équation II-23 page 79).

Cette relative indépendance entre les deux excitations est à considérer avec prudence cependant, ici la superposition des deux provoque tout de même un décalage des zones d'instabilité vers les faibles masses lorsque $q' = 0,6$.

II.3 Simulation informatique du comportement des ions

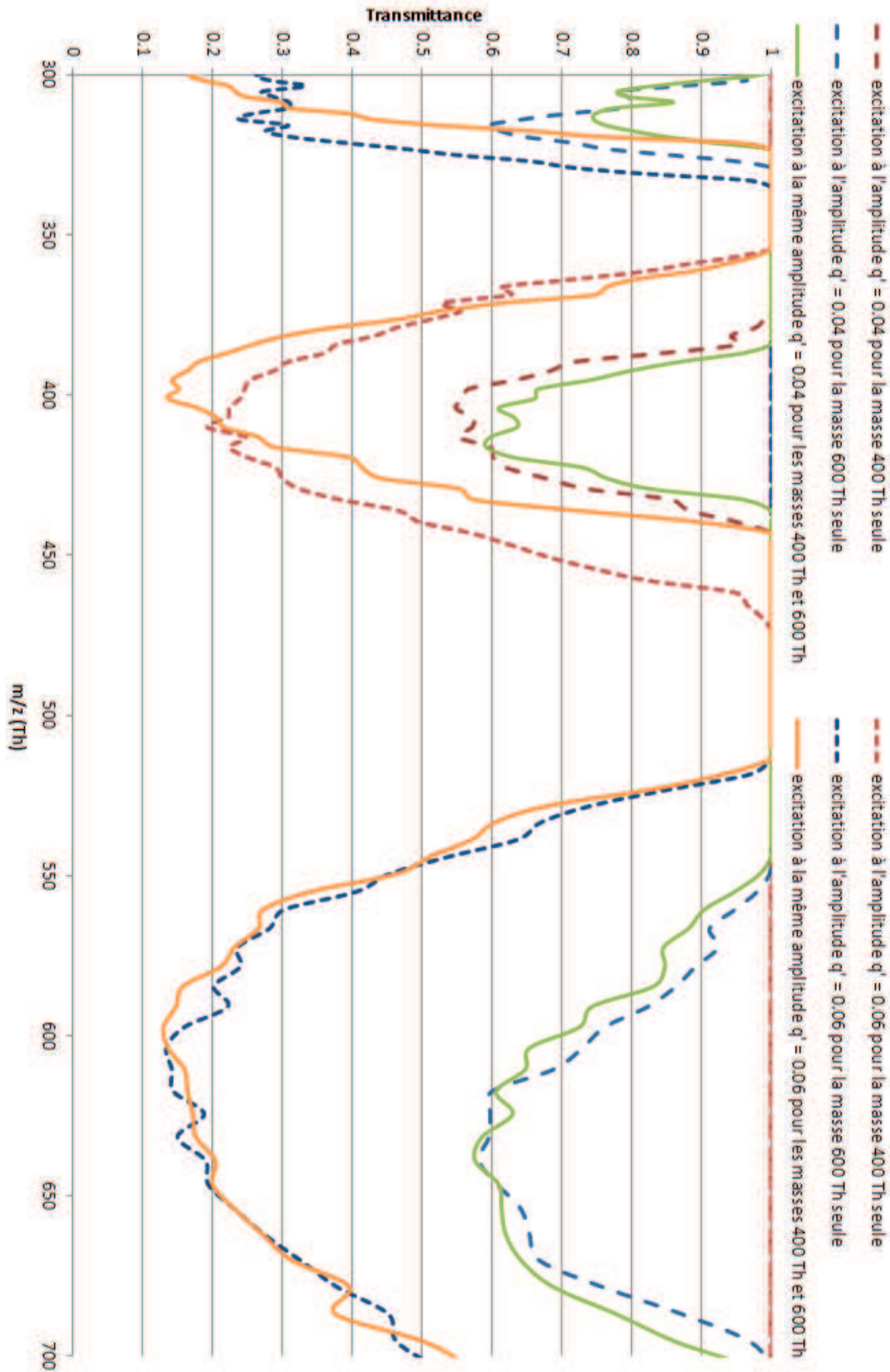


Figure II-17: Graphe des transmittances d'ions soumis à deux excitations en fonction de l'intensité relative q' de l'excitation

En conclusion, afin d'avoir une bonne sélectivité en masse il est nécessaire de choisir une intensité d'excitation la plus faible possible, sous la contrainte qu'une intensité arbitrairement faible ne permettrait pas d'exciter suffisamment les ions pour les déstabiliser. Cette limitation, en contradiction apparente avec les résultats théoriques obtenus et présentés plus loin (cf. section II.3.2 page 105), provient du fait que la longueur du QMF, et donc la durée d'excitation des ions, est finie. Seule une quantité d'énergie finie peut être transmise du champ vers les ions en un temps fini.

II.3.1.2 Influence de l'excitation sur l'énergie cinétique moyenne des ions

Calculer numériquement les trajectoires des ions dans un QMF réel permet aussi d'avoir accès à d'autres paramètres physiques, au nombre desquels se trouve l'énergie cinétique moyenne $\langle E_c \rangle$.

Si ce paramètre ne revêt que peu d'importance pour l'étude de la stabilité des ions, il est en revanche crucial dans l'étude de la dynamique des ions, en particulier lorsque ceux-ci doivent franchir une barrière de potentiel pour atteindre les optiques de sortie et, in fine, le détecteur.

Une étude de l'influence d'un potentiel d'excitation sur un ion a été réalisée. Une population de 500 ions de masse 750 Th injectés avec des conditions initiales définies aléatoirement comme précédemment dans un champ généré par les potentiels $U = 0$ V, $V = 50$ V, $\Omega = 0,6 \cdot 10^6$ rad.s⁻¹ (correspondant à une fréquence de 100 kHz) et soumis à un potentiel d'excitation d'amplitude et de pulsation variable a été étudiée. Le graphique de la Figure II-18 met en regard la décomposition de Fourier du mouvement des ions non excités d'une part et leur énergie cinétique moyenne en fonction de l'amplitude de l'excitation et de sa fréquence d'autre part.

II.3 Simulation informatique du comportement des ions

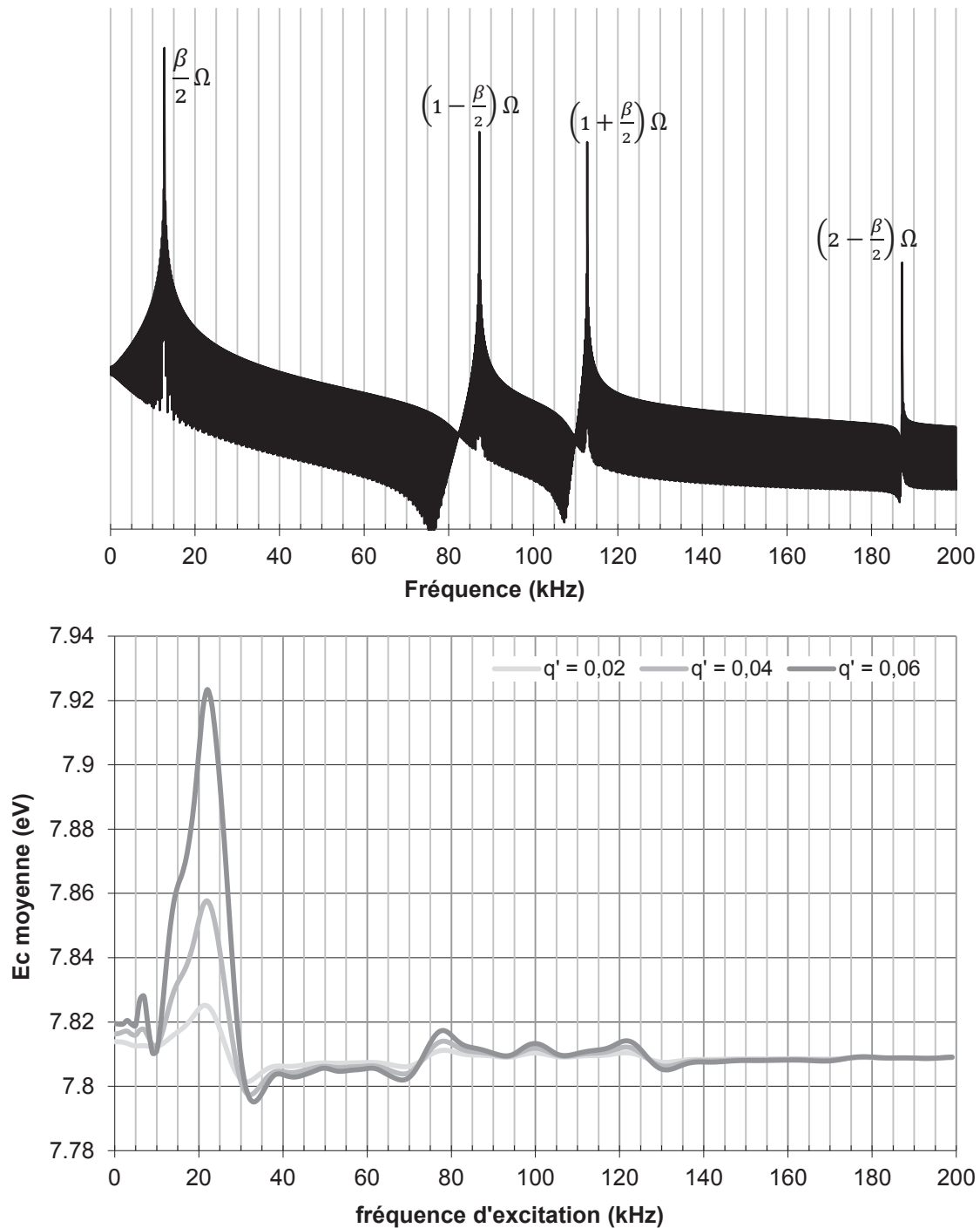


Figure II-18 : FFT¹ spatiale du mouvement d'un ion de 750 Th dans un champ généré par les potentiels $U = 0$ V, $V = 50$ V et $\Omega = 0,6 \cdot 10^6$ rad.s⁻¹. Les différentes fréquences de giration (données par l'équation II-17 page 78) y sont visibles. L'énergie cinétique moyenne de cet ion est portée en regard en fonction de la fréquence et de l'amplitude de l'excitation à laquelle il est soumis.

Cette étude permet de mettre en lumière plusieurs phénomènes :

- Il est possible d'identifier exactement les fréquences du mouvement des ions avec les pulsations $\Omega_{ion}^{(n)}$ données par l'équation II-17 ;

¹ Fast Fourier Transform

- La fréquence d'excitation qui provoque la plus grande modification de l'énergie cinétique des ions est celle qui correspond à la pulsation $\Omega_{\text{excitation}}$ donnée par l'équation II-23 (page 79) lorsque $K = 1$ et $n = 0$ (ici 22 kHz) ;
- D'autres fréquences d'excitation ont un effet sur l'énergie cinétique des ions (ici les fréquences 76 kHz et 119 kHz). Cet effet est bien moindre et correspond à des paramètres n différents de zéro dans l'équation II-23 ;
- L'effet observé lorsque la fréquence d'excitation est égale à 100 kHz provient de la modification de la valeur du paramètre q , la fréquence d'excitation étant alors égale à la fréquence de confinement ;
- Il existe des fréquences pour lesquelles l'énergie cinétique des ions est diminuée (ici 3 kHz, 9 kHz, 32 kHz, 66 kHz et 129 kHz), ce phénomène s'apparente à des anti-résonances ;
- Plus l'amplitude de l'excitation est importante (à la fréquence de résonance), plus l'énergie cinétique moyenne des ions est augmentée ;
- Il existe des fréquences d'excitation à des valeurs basses (ici 6 kHz et 11 kHz) correspondant à des ordres K élevés dans l'équation II-23. La fréquence d'excitation à 11 kHz est cependant difficilement décelable, étant noyée dans le pic correspondant à la résonance principale.

Ces remarques corroborent donc les études mathématiques précédemment menées (cf. section II.1.1.5 page 78) en y ajoutant cependant quelques raffinements. En particulier les effets sur l'énergie cinétique des résonances avec des paramètres K , respectivement n , différents de 1, respectivement 0, dans l'équation II-23 (page 79) sont beaucoup plus faibles que la résonance principale.

Il est aussi possible d'étudier l'évolution de l'énergie cinétique moyenne des ions avec l'amplitude de l'excitation lorsque l'on se place à la fréquence de résonance (cf. Figure II-19).

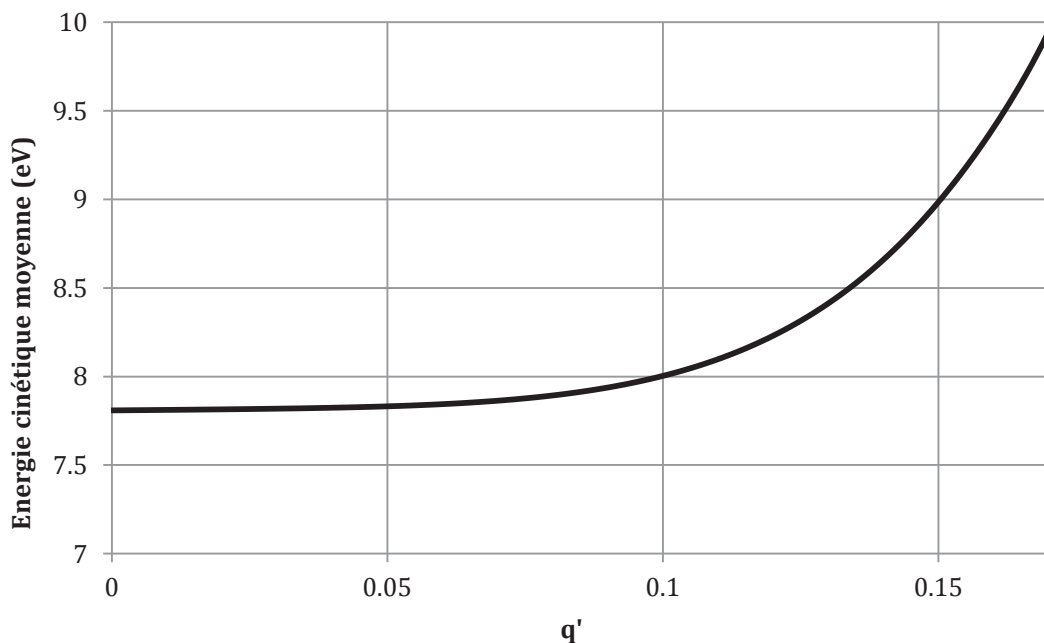


Figure II-19 : Évolution de l'énergie cinétique moyenne avec l'amplitude relative de l'excitation

II.3 Simulation informatique du comportement des ions

Cette évolution présente un profil exponentiel avec un palier d'amplitude en-dessous duquel l'influence de l'excitation sur l'énergie cinétique moyenne des ions est peu sensible (dans le cas présenté à la Figure II-19 ce palier prend fin pour $q' = 0,1$). La valeur de ce palier dépend de la valeur des paramètres a et q des ions.

Dans le cadre de cette étude, les ions excités doivent pouvoir éventuellement traverser une barrière de potentiel imposée par les optiques de sortie du QMF ou du LIT, leur énergie cinétique doit donc pouvoir excéder une certaine valeur. Il serait cependant contre-productif d'augmenter arbitrairement cette énergie cinétique. En effet, malgré une bonne qualité de vide dans le dispositif lorsqu'il ne fonctionne pas en cellule de collision, des ions ayant une trop grande énergie cinétique ne seraient plus en régime de thermalisation avec le gaz de refroidissement mais seraient en régime collisionnel, ce qui pourrait induire des fragmentations parasites par CID.

II.3.1.3 Influence de l'excitation sur la position moyenne des ions

A ppliquer un potentiel d'excitation modifie l'énergie cinétique des ions. Dans le cadre du modèle du pseudo-potential cela revient à augmenter le volume de l'espace accessible aux ions. Ceux-ci peuvent donc, dans un LIT, accéder aux zones du piège où les effets de bords ne sont plus négligeables. Ainsi les ions excités peuvent subir des non-linéarités du champ qui les conduiront à sortir du piège et à accéder au détecteur (cf. section I.4.1 page 40).

Au premier ordre, la forme du pseudo-puits de potentiel, donnée par l'équation II-9 (page 75), permet de calculer le gain en excursion Δr lorsque l'énergie cinétique de l'ion est augmentée d'une quantité ΔE_c :

$$\Delta r = \frac{4}{m\Omega^2 \left(a + \frac{q^2}{2}\right)} \cdot \frac{\Delta E_c}{\langle|r|\rangle} \quad \text{II-50}$$

Lorsque le piège fonctionne en mode RF-only, l'équation II-50 se simplifie et devient :

$$\Delta r = \frac{r_0^4 \Omega^2}{2e^2 V^2} \cdot \frac{m}{z^2} \cdot \frac{\Delta E_c}{\langle|r|\rangle} \quad \text{II-51}$$

Où la quantité $\langle|r|\rangle$ dans les équations II-50 et II-51 représente la moyenne temporelle de la valeur absolue de la distance de l'ion au centre du piège ou encore, ce qui revient au même sous l'hypothèse d'ergodicité, la moyenne de la valeur absolue de la distance au centre du piège de l'ensemble des ions de mêmes paramètres.

Donc, en mode RF-only, l'augmentation de l'excursion spatiale des ions subissant une excitation ne dépend pas du rapport m/z des ions mais du rapport m/z^2 . Ce phénomène n'entraîne pourtant pas de ségrégation spatiale des ions ayant un même rapport masse/charge mais des états de charge différents. En effet, les variations d'énergie cinétiques sont induites par l'application de potentiels d'excitations dont l'effet est proportionnel à la charge des ions.

II.3.2 Dans le plan de Mathieu

L'étude des simulations numériques du comportement des ions dans un analyseur quadripolaire a permis de mettre en évidence des comportements a priori non prédictibles par la simple étude de la théorie des équations de Mathieu, à savoir en particulier :

- L'élargissement des zones d'instabilité avec l'amplitude de l'excitation ;
- Le décalage de ces zones vers les faibles masses lorsque l'amplitude relative de l'excitation devient non négligeable devant 1.

L'étude mathématique des équations de Hill à l'aide de la théorie de Floquet rend possible le tracé des diagrammes de stabilité des QMF avec un ou plusieurs potentiels d'excitation. Ces diagrammes permettent de prévoir avec une grande précision la stabilité des ions dans un tel système et même de calculer rigoureusement les paramètres β en tenant compte de l'excitation (cf. section II.1.2.2.3 page 83). Elle ne donne en revanche aucune information sur les grandeurs locales que sont l'énergie ou l'excursion des ions par exemple.

II.3.2.1 Critère de stabilité numérique

Le tracé des diagrammes de stabilité passe par le calcul de la matrice de monodromie (cf. section II.1.2.2.2 page 82). Celui-ci est effectué en résolvant l'équation différentielle matricielle du premier ordre suivante :

$$\begin{cases} \dot{X} + \begin{pmatrix} 0 & 1 \\ H(t) & 0 \end{pmatrix} X = 0 \\ X(0) = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \end{cases} \quad \text{II-52}$$

Où la fonction H est une fonction T -périodique. Une fois cette équation intégrée, la valeur de la matrice X au temps T donne directement la valeur de la matrice de monodromie de l'équation.

La résolution numérique de l'équation II-52 a été faite par la méthode d'Euler à temps constant en prenant comme pas d'intégration $\tau = 0,001 \cdot T$ ce qui permet d'assurer une bonne stabilité de la méthode (le nombre de pas assez faible, de l'ordre de 10^4 , assure la stabilité de la résolution numérique).

Néanmoins, les éventuelles erreurs d'arrondi et les erreurs sur la propagation de la solution par la méthode d'Euler conduisent nécessairement à une imprécision sur les coefficients de la matrice de monodromie. Ce biais a été contourné de la manière suivante :

II.3 Simulation informatique du comportement des ions

Supposons calculée la matrice de monodromie M par la méthode décrite précédemment. Son déterminant est théoriquement égal à 1 (cf. section II.1.2.2.1 page 81), cependant les erreurs dans le calcul conduisent à une erreur ε_Δ sur ce déterminant, erreur qui peut être mise sous la forme :

$$\varepsilon_\Delta = |1 - \text{Det } M| \quad \text{II-53}$$

La matrice M étant une matrice carrée d'ordre deux, le calcul de ε_Δ permet aisément de remonter à un majorant de l'erreur commise sur le calcul de ses coefficients. En notant ε ce majorant il vient, au premier ordre en ε :

$$\varepsilon = \frac{1}{2} \varepsilon_\Delta \quad \text{II-54}$$

Où $M = \begin{pmatrix} a(1 + \varepsilon) & b(1 + \varepsilon) \\ c(1 + \varepsilon) & d(1 + \varepsilon) \end{pmatrix}$ lorsque la valeur exacte de la matrice de monodromie est $\begin{pmatrix} a & b \\ c & d \end{pmatrix}$.

Finalement, l'erreur commise sur la trace de cette matrice, noté ε_t , prend la forme :

$$\varepsilon_t = \varepsilon \cdot \text{Tr } M = \frac{1}{2} \varepsilon_\Delta \cdot \text{Tr } M \quad \text{II-55}$$

Ainsi donc, le critère de stabilité retenu pour le calcul numérique devient :

$$|\text{Tr } M| \leq 2 + |1 - \text{Det } M| \quad \text{II-56}$$

Ce critère permet de s'affranchir des éventuelles erreurs de calcul lors de l'intégration numérique de l'équation II-52 et permet de tracer les diagrammes de stabilité associés à cette équation avec une grande précision (l'erreur maximale calculée sur les simulations présentées dans ce mémoire est de l'ordre de 10^{-5}).

II.3.2.2 Introduction du plan (q ; q') en mode RF-only

A fin de pouvoir représenter graphiquement les zones de stabilité des ions lorsque ceux-ci sont soumis à un potentiel de confinement superposé à un potentiel d'excitation il est nécessaire de choisir les paramètres adimensionnels pertinents qui déterminent le mouvement des ions.

L'équation II-22 (page 79) permettait de déterminer le mouvement des ions selon l'axe Ox dans un système paramétré de manière adimensionnelle lorsqu'il n'y avait qu'une excitation, en phase avec le potentiel de confinement. Cette équation peut être étendue naturellement au mouvement des ions dans le plan Oxy dans le cas où plusieurs excitations, éventuellement déphasées par rapport au potentiel de confinement, seraient appliquées :

$$\begin{cases} \frac{d^2x}{d\xi^2} + \left(a - 2q \cos 2\xi - 2 \sum_{n>0} q_n \cos(2\nu_n \xi + \varphi_n) \right) x = 0 \\ \frac{d^2y}{d\xi^2} - \left(a - 2q \cos 2\xi - 2 \sum_{n>0} q_n \cos(2\nu_n \xi + \varphi_n) \right) y = 0 \end{cases} \quad \text{II-57}$$

Où les paramètres a et q sont les paramètres de Mathieu classiques (cf. équation II-5 page 68) et les paramètres q_n ont, lorsque $V_{\text{excitation}}^{(n)}$ est l'amplitude de la nième tension d'excitation, pour valeur :

$$q_n = \frac{4zeV_{\text{excitation}}^{(n)}}{mr_0^2\Omega^2} \quad \text{II-58}$$

Si ce paramétrage répond au problème posé, il n'est cependant pas optimal car les paramètres q_n restent dépendants du rapport m/z des ions. Cependant, de la même façon que l'amplitude relative de l'excitation, dans le cas où il n'y en avait qu'une, avait été introduit à l'équation II-49 (page 97) ; il est possible d'introduire les paramètres $q^{(n)}$ définis comme :

$$q^{(n)} = \frac{q_n}{q} = \frac{V_{\text{excitation}}^{(n)}}{V} \quad \text{II-59}$$

L'équation II-57 devient alors :

$$\begin{cases} \frac{d^2x}{d\xi^2} + \left(a - 2q \left(\cos 2\xi + \sum_{n>0} q^{(n)} \cos(2\nu_n \xi + \varphi_n) \right) \right) x = 0 \\ \frac{d^2y}{d\xi^2} - \left(a - 2q \left(\cos 2\xi + \sum_{n>0} q^{(n)} \cos(2\nu_n \xi + \varphi_n) \right) \right) y = 0 \end{cases} \quad \text{II-60}$$

Ainsi donc, la stabilité d'un ion soumis à n excitations dans un QMF peut être entièrement déterminée par la donnée des deux paramètres a et q complétés par la donnée de n triplets $(q^{(n)}, \nu_n, \varphi_n)$, soit au total $3n+2$ paramètres adimensionnels.

Afin de pouvoir tracer dans un plan l'évolution de la stabilité des ions soumis à n potentiels d'excitations, la solution retenue consiste à fixer arbitrairement la valeurs de $3n$ paramètres (par exemple les phases φ_n , les paramètres ν_n ainsi que le paramètre a) et faire varier deux paramètres, par exemple le paramètre q et un paramètre q' tel que $\forall n > 0, q' = q^{(n)}$. L'équation II-60 prend alors la forme :

$$\begin{cases} \frac{d^2x}{d\xi^2} + \left(a - 2q \left(\cos 2\xi + q' \sum_{n>0} \cos(2\nu_n \xi + \varphi_n) \right) \right) x = 0 \\ \frac{d^2y}{d\xi^2} - \left(a - 2q \left(\cos 2\xi + q' \sum_{n>0} \cos(2\nu_n \xi + \varphi_n) \right) \right) y = 0 \end{cases} \quad \text{II-61}$$

Les résultats de l'étude de la stabilité des solutions de l'équation II-57 seront donc tracés dans le plan $(q ; q')$ ainsi obtenu.

II.3.2.3 Influence de la phase de l'excitation

En se plaçant en mode RF-only (c'est-à-dire quand $a = 0$) et lorsqu'il n'y a qu'une seule fréquence d'excitation, l'équation II-61 devient :

$$\begin{cases} \frac{d^2x}{d\xi^2} - 2q(\cos 2\xi + q' \cos(2\nu_1\xi + \varphi_1))x = 0 \\ \frac{d^2y}{d\xi^2} + 2q(\cos 2\xi + q' \cos(2\nu_1\xi + \varphi_1))y = 0 \end{cases} \quad \text{II-62}$$

Il y a donc, dans ce cas-là, quatre paramètres à considérer pour étudier la stabilité des solutions de l'équation. En fixant arbitrairement la valeur des paramètres ν_1 et φ_1 , seuls les paramètres q et q' peuvent varier, ce qui permet de tracer le diagramme de stabilité associé à l'équation II-62 dans le plan (q ; q') à l'aide de l'algorithme décrit à la section II.3.2.1 (page 105).

L'étude de quelques exemples (cf. Figure II-20 pour $\nu_1 = 0,33$ et $\varphi_1 = 0,0$ rad ou $1,0$ rad) permet de montrer que l'influence de la phase est non négligeable, en particulier pour les grandes valeurs de q' .

Par ailleurs ces exemples permettent de vérifier l'exactitude de notre algorithme sur quelques points particuliers :

- Lorsque $q' = 0$, l'équation II-62 se ramène à l'équation de Mathieu en mode RF-only, la zone de stabilité s'arrête donc à la valeur $q = 0,908$ (cf. section II.1.1.2.1 page 72) ;
- Les points à faibles valeurs de q correspondent à des ions de ratios m/z élevés, ce qui explique la relative insensibilité de ces points aux excitations, même de grandes amplitudes.

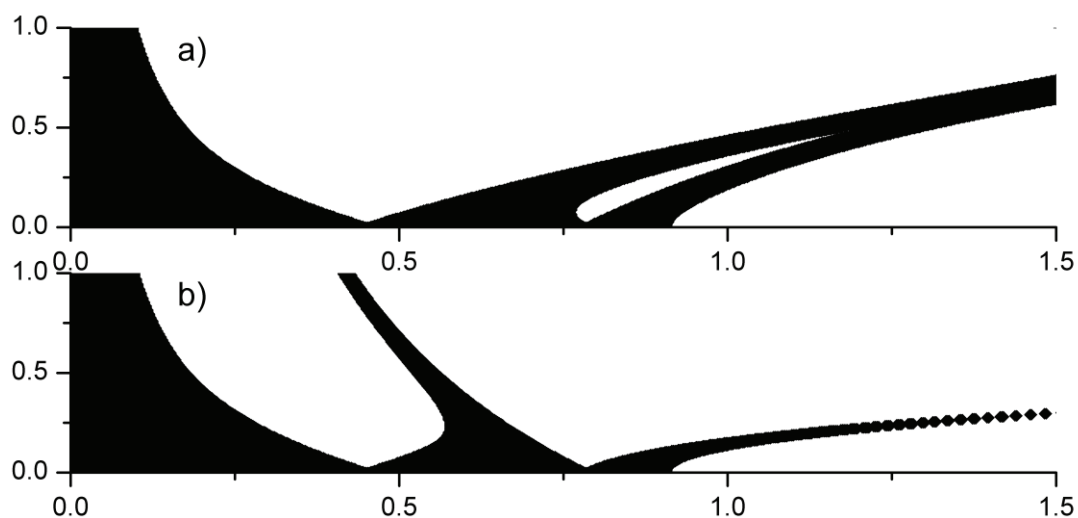


Figure II-20 : Diagramme de stabilité dans le plan (q ; q') lorsque $\nu_1 = 0,33$. La figure (a) montre le diagramme obtenu lorsque la phase φ_1 est nulle et la figure (b) lorsque la phase vaut $1,0$ rad

En revanche l'existence d'une « langue » de stabilité qui permet à des ions ayant de grands paramètres q (et donc de faibles rapports masse/charge) de rester stables en dépit de l'excitation est nettement plus contre-intuitif. Cette stabilisation paradoxale est en fait liée à l'existence des fréquences d'antirésonance qui ont précédemment été décrites (cf. section II.3.1.2 page 101) : lorsque la fréquence d'excitation imposée correspond à une fréquence d'anti-résonance d'ions de certains ratios m/z , ceux-ci voient leur énergie cinétique diminuer et donc aussi leur excursion (cf. section II.3.1.3 page 104). Certaines masses peuvent donc être stabilisées par l'ajout d'une composante radiofréquence supplémentaire.

Cette propriété est cependant difficilement vérifiable expérimentalement. Le montage expérimental utilisé pour valider ces travaux ne permet pas de verrouiller l'angle de phase entre le potentiel de confinement et le potentiel d'excitation (cf. section III.3 page 124). Afin d'obtenir un diagramme de stabilité indépendant de la phase, il est alors nécessaire de tracer le diagramme obtenu en réunissant tous les points du plan $(q ; q')$ stables pour toutes les valeurs possibles de la phase (ce qui revient à réaliser l'intersection des diagrammes de stabilité obtenus pour chaque phase).

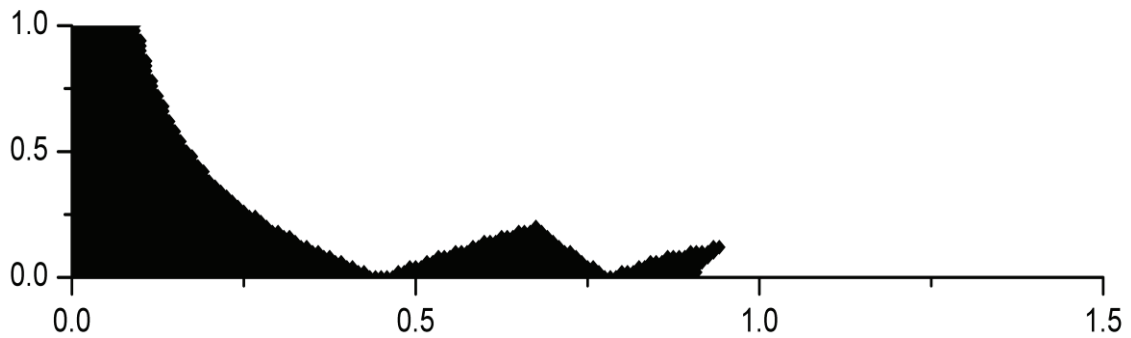


Figure II-21 : Diagramme de stabilité dans le plan $(q ; q')$ lorsque $v_1 = 0,33$ obtenu par intersection de tous les diagrammes de stabilités pour ϕ_1 variant de 0 à 2π

Le diagramme de la Figure II-21 a été obtenu par intersection de trente diagrammes de stabilité calculés pour $v_1 = 0,33$ et ϕ_1 variant de 0 à 2π par pas de $\pi/15$. On y distingue une bande de stabilité paradoxale résiduelle au-delà de la valeur limite $q = 0,908$ ainsi que deux vallées d'instabilité ayant pour origines $q = 0,451$ et $q = 0,784$. La première valeur correspond à la résonance du premier ordre ($K = 1$ dans l'équation II-23 page 79), la seconde correspond à la résonance du second ordre ($K = 2$ dans l'équation II-23).

Si cet exemple ne montre que deux vallées d'instabilité, c'est en raison de la grande simplicité du rapport v_1 (v_1 valant $1/3$). Lorsque le rapport v_1 est moins simple, le diagramme de stabilité devient plus complexe et les excitations d'ordres élevés apparaissent (cf. Figure II-22).

II.3 Simulation informatique du comportement des ions

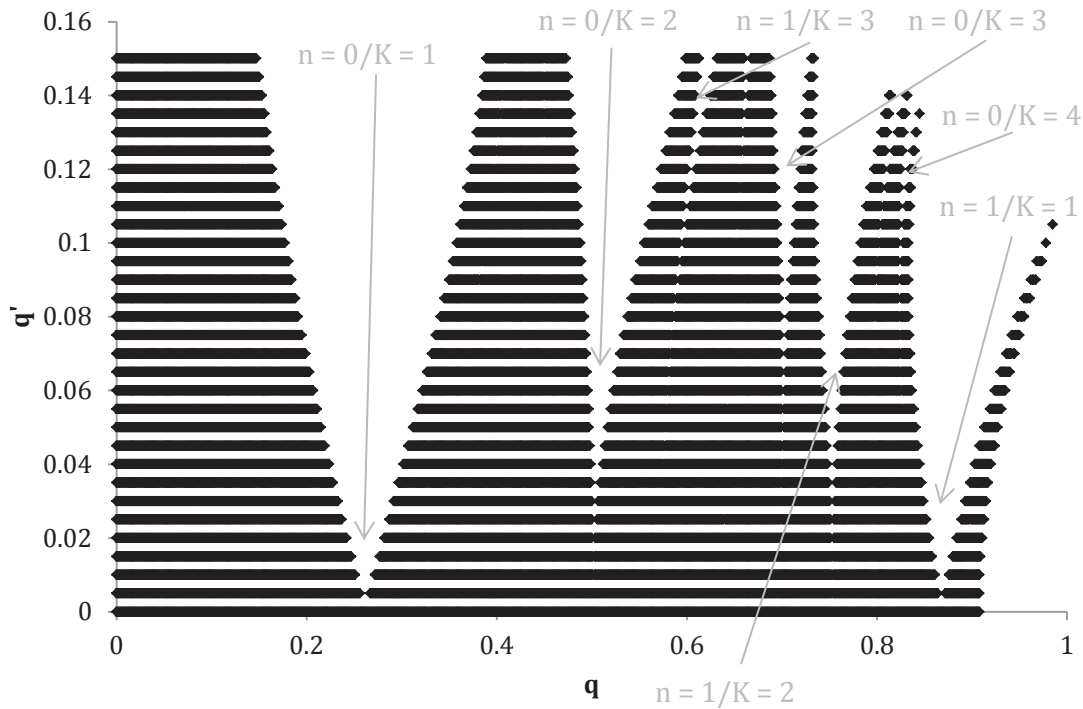


Figure II-22 : Diagramme de stabilité indépendant de la phase dans le plan $(q ; q')$ pour $v_1 = 0,188$. Les paramètres n et K des résonances (cf. équation II-23 page 79) y sont repérés

Sur l'exemple présenté Figure II-22 les résonances jusqu'à l'ordre 4 peuvent être décelés et provoquent l'apparition de vallées d'instabilité parasites qui pourraient provoquer des détections non désirées d'ions à la sortie d'un LIT par exemple. Cependant, ces résonances d'ordres élevés n'ont manifestement un effet sensible que lorsque l'intensité de l'excitation est importante (sur cet exemple les effets des résonances d'ordre 2 n'apparaissent que lorsque q' excède 0,02). Afin de s'affranchir des résonances d'ordres élevés il est donc préférable de travailler avec des amplitudes d'excitations les plus faibles possibles.

II.3.2.4 Largeurs des vallées d'instabilité

Les zones d'instabilités générées par l'application d'un potentiel d'excitation ont une largeur Δq qui varie avec q' (cf. Figure II-23).

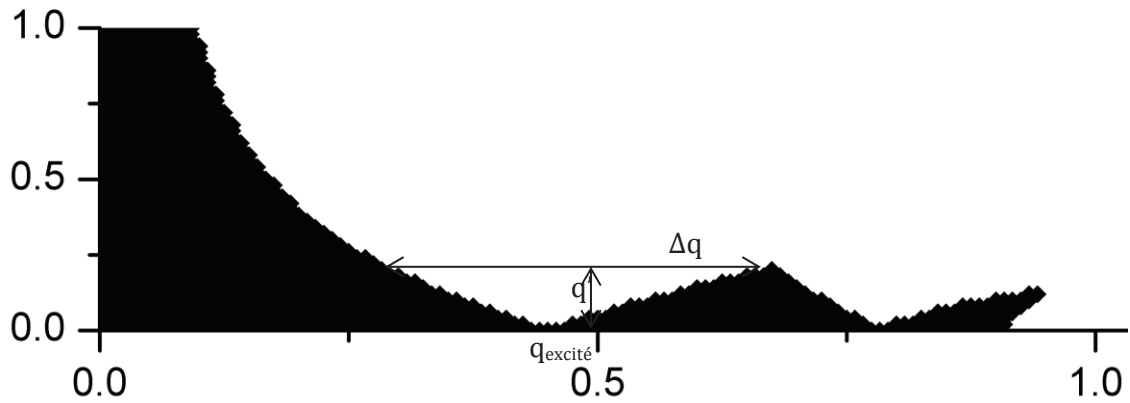


Figure II-23 : Évolution de la largeur de la vallée d’instabilité Δq correspondant à la résonance du premier ordre en fonction de l’amplitude relative de l’excitation q'

Cette largeur peut s’écrire au premier ordre :

$$\frac{\Delta q}{q_{\text{excité}}} = \sigma q' + o(q'^2) \tag{II-63}$$

Où σ est une grandeur sans dimension caractérisant la corrélation entre la largeur de la vallée d’instabilité et l’intensité de l’excitation q' . La convention de normalisation de Δq par $q_{\text{excité}}$ dans l’équation II-63 permet d’accéder facilement à une estimation de la largeur de la gamme de masse $\Delta(m/z)$ excitée dans le QMF. En effet, au premier ordre en Δq :

$$\frac{\Delta q}{q} = \frac{\Delta(m/z)}{(m/z)} \tag{II-64}$$

Le calcul de σ pour différentes valeurs de ν_1 sur les vallées d’instabilité correspondant aux résonances du premier ordre permet d’obtenir un modèle linéaire en $1/q$ avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,998$ (cf. Figure II-24) :

$$\sigma = \frac{2,507}{q_{\text{excité}}} - 0,978 \tag{II-65}$$

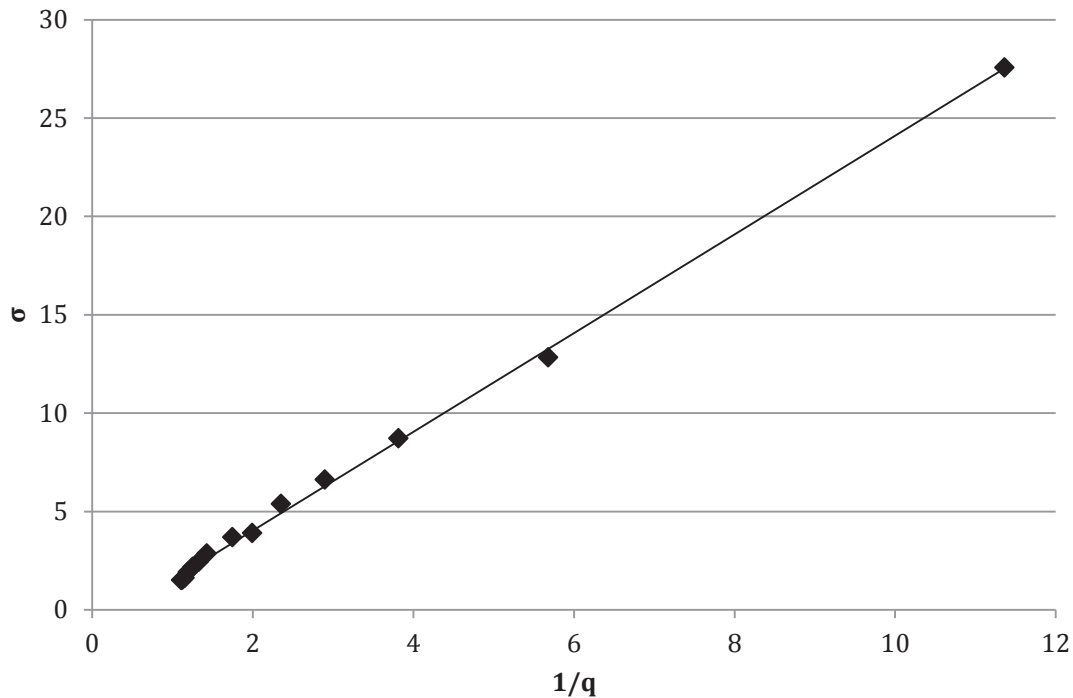


Figure II-24 : Graphe de σ en fonction de $1/q$, la droite de régression ainsi que les points de mesure y figurent

L'étude du paramètre σ permet en particulier de faire la remarque suivante : pour une amplitude q' donnée, plus la masse à exciter est faible (ou, ce qui revient au même, plus q est élevé) plus la largeur de la vallée d'instabilité autour de cette masse sera faible. Ainsi, pour avoir une bonne précision sur la fenêtre d'excitation autour d'une masse donnée, il est préférable de travailler avec des paramètres V et Ω lui assurant une valeur de q la plus élevée possible. Par ailleurs, toujours dans l'optique d'avoir une résolution en masse la plus élevée possible, il est nécessaire de travailler avec l'amplitude d'excitation q' la plus faible possible, ce qui nécessite éventuellement de faire un compromis entre spécificité (qui dépend de la résolution en masse) et sensibilité (qui dépend de la quantité d'ions expulsés du piège et donc de la valeur de q').

II.3.2.5 Superposition de plusieurs fréquences d'excitation

Jusqu'à présent l'étude des diagrammes de stabilité dans le plan $(q ; q')$ a été réalisée lorsqu'une seule tension d'excitation était imposée. Il est tout à fait possible d'effectuer le tracé des diagrammes d'excitations correspondant à l'équation II-61 tout en s'affranchissant de l'influence des phases φ_n . Il suffit pour cela de tracer les diagrammes correspondant à toutes les combinaisons de φ_n et d'en réaliser les intersections.

La Figure II-25 présente un exemple d'un tel diagramme de stabilité. Afin de représenter le diagramme de stabilité d'un mélange de deux excitations (ici $\nu_1 = 0,188$ et $\nu_2 = 0,344$), la convention adoptée à l'équation II-61 a été utilisée. La présence d'une langue de stabilité aux faibles masses est toujours présente, y compris lorsque les deux excitations sont mélangées. Hormis ce phénomène qui a déjà été décrit, deux comportements peuvent être décrit selon que l'amplitude de l'excitation est faible ou, au contraire, élevée.

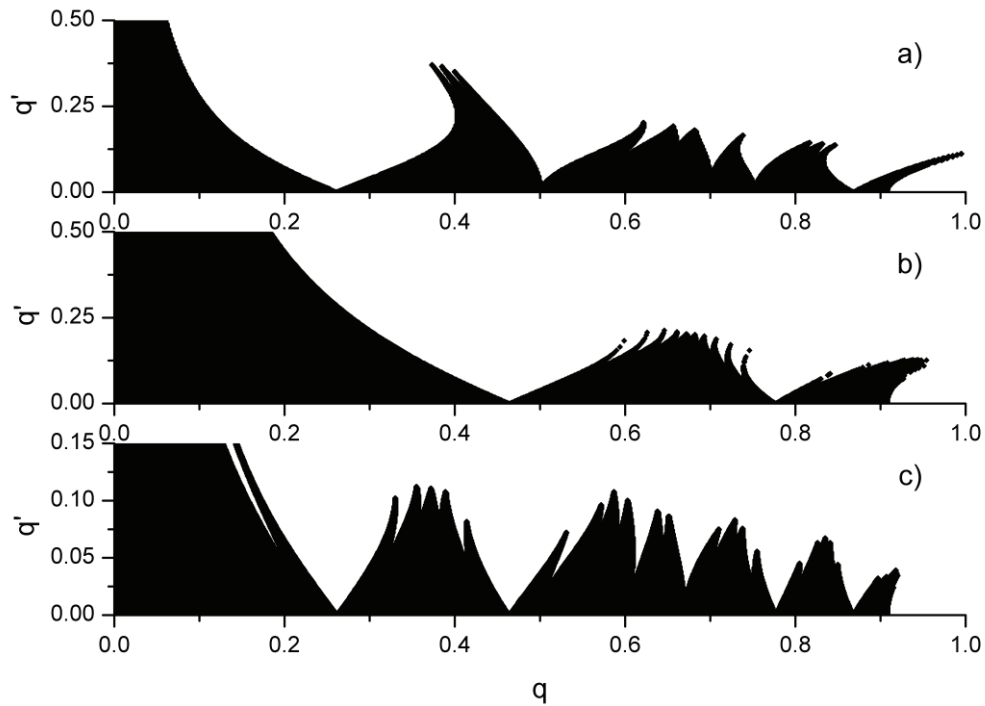


Figure II-25 : Diagrammes de stabilité théoriques dans le plan ($q ; q'$). (a) : pour $\nu_1 = 0,188$. (b) pour $\nu_1 = 0,344$. (c) pour $\nu_1 = 0,188$ et $\nu_2 = 0,344$

II.3.2.5.1 Effets à faibles excitations

À faible amplitude d'excitation ($q' < 0,02$), seules les résonances du premier ordre sont visibles sur les diagrammes à une seule excitation (cf. Figure II-25 (a) et (b) par exemple) et cette propriété a déjà été décrite auparavant (cf. section II.3.2.3 page 108). Cette propriété se retrouve sur le diagramme issu de la superposition des deux fréquences d'excitation (cf. Figure II-25 (c) par exemple) : lorsque l'amplitude des excitations est faible, les vallées d'instabilité sont exactement celles issues de chaque fréquence d'excitation prise séparément.

Ainsi donc, dans ce régime, la condition d'excitation de l'équation II-23 (page 79) s'applique encore. De même, la formule permettant de prédire la largeur des vallées (cf. équation II-65) est toujours valide. En revanche ces propriétés ne tiennent plus lorsque q' excède 0,02 (cf. section II.3.2.5.2 ci-après).

II.3.2.5.2 Effets à fortes excitations

Lorsque l'amplitude de l'excitation excède une certaine valeur (0,02 dans le cas présent) les effets des excitations ne se superposent plus, ils interagissent entre eux et provoquent l'apparition de comportements plus complexes. En effet, dans ce régime, le paramètre β cesse d'être la seule fonction des paramètres a et q pour devenir une fonction des paramètres a , q , v_1 , v_2 et q' . Ainsi, sur l'exemple de la Figure II-25, il apparaît un décalage des vallées correspondant aux résonances d'ordre 3, ce décalage avait déjà été mis en évidence par Collings *et al.* (cf. [19]).

II.3.2.6 Conclusion des simulations

Les simulations, qu'elles soient dans le domaine temporel ou dans le plan (q ; q') ont permis de valider aux faibles amplitudes d'excitation la condition de résonance donnée par l'équation II-23, même lorsque plusieurs excitations sont superposées, mais aussi de mettre en évidence un certain nombre de phénomènes nouveaux :

- L'influence de la phase sur les diagrammes de stabilité ;
- Les décalages des vallées de stabilité aux grandes amplitudes d'excitation ;
- L'existence de zones de stabilité paradoxales, correspondant à des fréquences d'antirésonance pour certaines masses ;
- La relation linéaire entre la largeur des vallées d'instabilité, caractérisée par le paramètre σ , et le ratio masse/charge des ions (ou, de façon équivalente, $1/q$).

Références bibliographiques

- [1] R. E. March and J. F. Todd, *Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry, 2nd Edition*, Second. Wiley, 2005.
- [2] T. Jones, "Mathieu's Equations and the Ideal rf-Paul Trap," *physics.drexel.edu*, 2008. [Online]. Available: <http://www.physics.drexel.edu/~tim/open/mat/mat.pdf>. [Accessed: 11-Jun-2013].
- [3] B. van der Pol and M. J. O. Strutt, "On the stability of the solutions of Mathieu's equation," *Philosophical Magazine*, vol. 5, no. 27, pp. 18–38, 1928.
- [4] H. Noshad and A. Doroudi, "Computation of five stability regions in a quadrupole ion trap using the fifth-order Runge–Kutta method," *International Journal of Mass Spectrometry*, vol. 281, no. 1–2, pp. 79–81, 2009.
- [5] N. W. McLachlan, *Theory and applications of Mathieu Functions*. Clarendon, 1947.
- [6] D. J. Douglas, A. J. Frank, and D. M. Mao, "Linear ion traps in mass spectrometry," *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 24, no. 1, pp. 1–29, 2005.
- [7] K. Maeda, A. Fukuda, and M. Sakimura, "Tables relating to Mathieu functions," *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*, vol. 17, no. 1, pp. 530–574, 1969.
- [8] R. F. Wuerker, H. Shelton, and R. V Langmuir, "Electrodynamic Containment of Charged Particles," *Journal of Applied Physics*, vol. 30, no. 3, pp. 342–349, 1959.
- [9] D. J. Douglas, "Linear quadrupoles in mass spectrometry," *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 28, no. 6, pp. 937–960, 2009.
- [10] E. de Hoffmann, "Tandem mass spectrometry: A primer," *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 31, no. 2, pp. 129–137, Feb. 1996.
- [11] H. G. Dehmelt, "Radiofrequency Spectroscopy of Stored Ions I: Storage," *Advances in Atomic and Molecular Physics*, vol. 3, pp. 53–72, 1968.
- [12] R. E. March, A. W. McMahon, F. A. Londry, R. L. Alfred, J. F. J. Todd, and F. Vedel, "Resonance excitation of ions stored in a quadrupole ion trap. Part 1. A simulation study," *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, vol. 95, no. 2, pp. 119–156, 1989.
- [13] H. Koizumi, W. B. Whitten, P. T. A. Reilly, and E. Koizumi, "Derivation of mathematical expressions to define resonant ejection from square and sinusoidal wave ion traps," *International Journal of Mass Spectrometry*, vol. 286, no. 2–3, pp. 64–69, 2009.
- [14] G. Teschl, "Ordinary Differential Equations and Dynamical Systems." 2011.
- [15] V. I. Arnold, *Mathematical Methods of Classical Mechanics*, 2nd editio. Springer, 1989.

Références bibliographiques

- [16] M. Sudakov, N. Konenkov, D. J. Douglas, and T. Glebova, "Excitation frequencies of ions confined in a quadrupole field with quadrupole excitation," *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 11, no. 1, pp. 10–18, Jan. 2000.
- [17] F. Vedel, M. Vedel, and R. E. March, "New Schemes for resonant ejection in r.f. quadrupolar ion traps," *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, vol. 99, no. 1–2, pp. 125–138, 1990.
- [18] E. A. Jackson, *Perspectives of nonlinear dynamics*, vol. 2. Cambridge: Cambridge University Press, 1990.
- [19] B. A. Collings, M. Sudakov, and F. A. Londry, "Resonance shifts in the excitation of the $n = 0$, $K = 1$ to 6 quadrupolar resonances for ions confined in a linear ion trap," *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 13, no. 5, pp. 577–586, 2002.
- [20] B. A. Collings and D. J. Douglas, "Observation of higher order quadrupole excitation frequencies in a linear ion trap," *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 11, no. 11, pp. 1016–1022, Nov. 2000.
- [21] M. Baril, "Etude des propriétés fondamentales de l'équation de Hill pour le dessin de filtre quadrupolaire," *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, vol. 35, no. 1–2, pp. 179–199, 1980.
- [22] W. Magnus and A. Shenitzer, *Hill's equation. Part I : General theory*, vol. 1. New York: Courant Institute of Mathematical Sciences, New York University, 1957, p. 42.
- [23] N. V. Konenkov, M. Sudakov, and D. J. Douglas, "Matrix methods for the calculation of stability diagrams in quadrupole mass spectrometry," *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 13, no. 6, pp. 597–613, 2002.
- [24] L. Ding, M. Sudakov, and S. Kumashiro, "A simulation study of the digital ion trap mass spectrometer," *International Journal of Mass Spectrometry*, vol. 221, no. 2, pp. 117–138, 2002.
- [25] L. Ding, M. Sudakov, F. L. Brancia, R. Giles, and S. Kumashiro, "A digital ion trap mass spectrometer coupled with atmospheric pressure ion sources," *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 39, no. 5, pp. 471–484, 2004.
- [26] L. Ding and S. Kumashiro, "Ion motion in the rectangular wave quadrupole field and digital operation mode of a quadrupole ion trap mass spectrometer," *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 20, no. 1, pp. 3–8, 2006.
- [27] Y. Wang, J. Franzen, and K. P. Wanczek, "The nonlinear resonance ion trap : Part 2. A general theoretical-analysis," *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, vol. 124, no. 2, pp. 125–144, Mar. 1993.

- [28] J. Schulte, P. V. Shevchenko, and A. V. Radchik, "Nonlinear field effects in quadrupole mass filters," *Review of Scientific Instruments*, vol. 70, no. 9, pp. 3566–3571, Sep. 1999.
- [29] S. Sevugarajan and A. G. Menon, "Frequency perturbation in nonlinear Paul traps:: A simulation study of the effect of geometric aberration, space charge, dipolar excitation, and damping on ion axial secular frequency," *International Journal of Mass Spectrometry*, vol. 197, no. 1–3, pp. 263–278, 2000.
- [30] S. Sevugarajan and A. G. Menon, "Transition curves and iso- β lines in nonlinear Paul traps," *International Journal of Mass Spectrometry*, vol. 218, no. 2, pp. 181–196, 2002.
- [31] X. Zhou, Z. Zhu, C. Xiong, R. Chen, W. Xu, H. Qiao, W.-P. Peng, Z. Nie, and Y. Chen, "Characteristics of stability boundary and frequency in nonlinear ion trap mass spectrometer," *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 21, no. 9, pp. 1588–1595, 2010.
- [32] A. Drakoudis, M. Soellner, and G. Werth, "Instabilities of ion motion in a linear Paul trap," *International Journal of Mass Spectrometry*, vol. 252, no. 1, pp. 61–68, 2006.
- [33] E. Fischer, "Die dreidimensionale Stabilisierung von Ladungsträgern in einem Vierpolfeld," *Zeitschrift für Physik*, vol. 156, no. 1, pp. 1–26, Mar. 1959.
- [34] H. Schuessler, E. Fortson, and H. Dehmelt, "Hyperfine Structure of the Ground State of He³⁺ by the Ion-Storage Exchange-Collision Technique," *Physical Review*, vol. 187, no. 1, pp. 5–38, Nov. 1969.
- [35] F. Vedel, "On the dynamics and energy of ion clouds stored in an R.F. quadrupole trap," *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, vol. 106, no. 0, pp. 33–61, 1991.
- [36] R. Alheit, S. Kleineidam, F. Vedel, M. Vedel, and G. Werth, "Higher order non-linear resonances in a Paul trap," *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, vol. 154, no. 3, pp. 155–169, 1996.
- [37] J. W. Hager and J. C. Yves Le Blanc, "Product ion scanning using a Q-q-Qlinear ion trap (Q TRAPTM) mass spectrometer," *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 17, no. 10, pp. 1056–1064, 2003.
- [38] F. Vedel and J. André, "Influence of space charge on the computed statistical properties of stored ions cooled by a buffer gas in a quadrupole rf trap," *Phys. Rev. A*, vol. 29, no. 4, pp. 2098–2101, 1984.
- [39] J. W. Hager, "A new linear ion trap mass spectrometer," *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 16, no. 6, pp. 512–526, 2002.
- [40] W. Xu, Q. Song, S. A. Smith, W. J. Chappell, and Z. Ouyang, "Ion Trap Mass Analysis at High Pressure: A Theoretical View," *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 20, no. 11, pp. 2144–2153, 2009.

Références bibliographiques

- [41] Y.-L. Chen, B. A. Collings, and D. J. Douglas, "Collision cross sections of myoglobin and cytochrome c ions with Ne, Ar, and Kr," *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 8, no. 7, pp. 681–687, 1997.
- [42] R. Kobes and S. Peles, "A Relationship Between Parametric Resonance and Chaos," *arXiv preprint nlin/0005005*, pp. 1–7, 2000.
- [43] R. S. Zounes and R. H. Rand, "Transition Curves for the Quasi-Periodic Mathieu Equation," *SIAM Journal on Applied Mathematics*, vol. 58, no. 4, pp. 1094–1115, Oct. 1998.

Chapitre III Montage expérimental

III.1	PRÉSENTATION GÉNÉRALE.....	121
III.2	SPECTROMÈTRE DE MASSE : LE 2000 QTRAP.....	122
III.3	ÉLECTRONIQUE DE PILOTAGE.....	124
III.3.1	GÉNÉRATION ET ADDITION DES SIGNAUX RADIOFRÉQUENCES.....	124
III.3.2	ÉLECTRONIQUE D'AMPLIFICATION ET BALUN.....	125
III.4	RÉGLAGES DE L'ÉLECTRONIQUE DE PILOTAGE.....	127
III.5	MÉTHODE D'ANALYSE DES RÉSULTATS.....	131
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	133

III.1 *Présentation générale*

Le dispositif utilisé afin de valider expérimentalement les résultats théoriques obtenus et présentés au Chapitre II se compose de cinq parties distinctes :

- Des générateurs de signaux radiofréquences permettant de générer des tensions sinusoïdales de faibles amplitudes ;
- Un système additionneur de tension qui superpose ces tensions et génère ainsi un signal unique combinant la tension de confinement et les éventuelles tensions d'excitation imposées au système ;
- Un amplificateur de puissance permettant de multiplier la tension générée par le système additionneur avec une grande fidélité ;
- Un balun permettant, à partir d'une tension d'entrée de générer en sortie deux signaux, le premier identique au signal d'entrée (à une fonction de transfert près, cf. section III.3.2 page 125) et le second déphasé de π radians.
- Un spectromètre de masse comportant un analyseur quadripolaire.

Ces différentes parties sont décrites plus en détail ci-après.

III.2 *Spectromètre de masse : le 2000 QTrap*

Le spectromètre de masse utilisé dans le montage expérimental est un instrument de la marque ABSciex, Framingham, USA, modèle 2000 QTrap¹. Il s'agit d'un spectromètre de type « triple quadripôle » qui présente l'avantage de permettre un accès aisé à son électronique de puissance. Ceci permet de facilement remplacer les tensions imposées par l'instrument aux quadripôles par des tensions ad hoc générées par un système extérieur.

Le 2000 QTrap est constitué de trois quadripôles à électrodes cylindriques (classiquement notés Q1, q2 et Q3) séparés les uns des autres par des optiques ioniques (cf. Figure III-1). Le premier quadripôle (Q1) fonctionne en mode QMF et sert de filtre en masse, le second (q2) fonctionne lui aussi en mode QMF et sert de cellule de collision. Quant au troisième (Q3), il peut aussi bien fonctionner en mode QMF qu'en mode LIT selon le paramétrage de l'instrument (cf. [1]). Cette configuration permet de réaliser de la MS simple, mais aussi de la MS² et de la MS³.

Différentes sources d'ions peuvent être adaptées sur l'instrument selon les besoins. Les sources utilisées pour cette étude sont une source ESI (cf. section I.2.1 page 30) et une source APCI (cf. section I.2.2 page 31).

Enfin, le détecteur installé sur le 2000 QTrap est un détecteur à dynodes discrètes (cf. section I.5 page 46) monté dans l'axe de l'instrument (cf. section I.4.1.2 page 41).

Afin de valider les résultats théoriques obtenus, l'électronique de puissance intégrée à l'instrument et alimentant le quadripôle Q3 a été déconnectée et remplacée par un système générateur permettant d'imposer plusieurs signaux RF simultanément. Cela permet d'utiliser le Q3 dans un régime où un potentiel RF sert de potentiel de confinement et un, ou plusieurs, potentiels d'excitation sont imposés et ainsi vérifier la possibilité d'expulser simultanément des ions de masses différentes du quadripôle Q3.

¹ Cet instrument peut travailler sur une gamme de masse allant de 50 Th à 2200 Th et possède une résolution de 0,6 Th (FWHM – Largeur à mi-hauteur) pour une vitesse de balayage fixée à 13 Th/ms (cf. [1], [3])

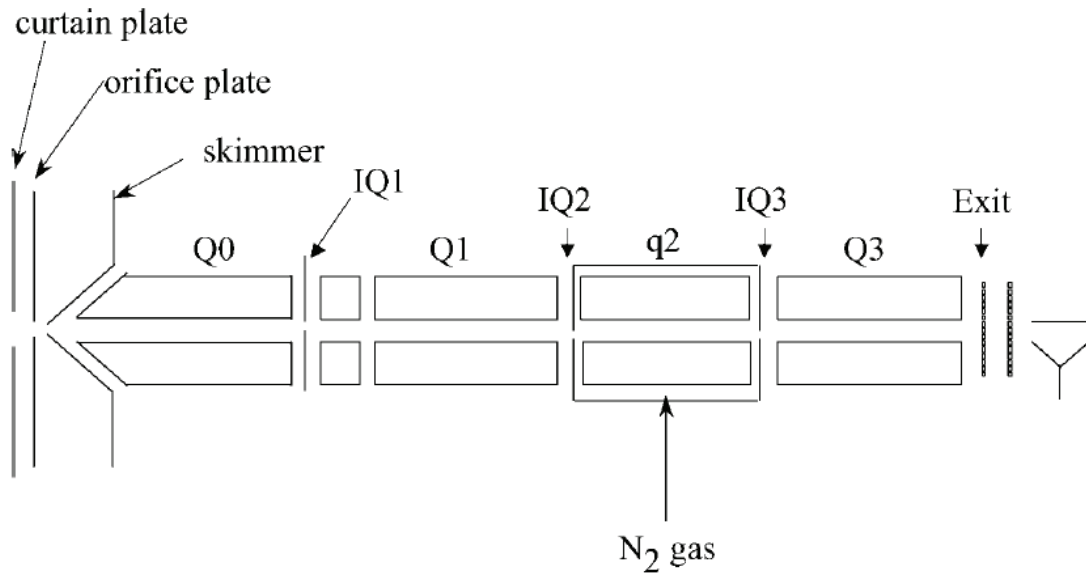


Figure III-1 : Schéma d'un 2000QTrap, q2 représente la cellule de collision sous diazote, Q1 et Q3 sont des QMF (dans le cas du 2000QTrap, Q3 peut aussi fonctionner en mode LIT et servir de cellule de collision annexe). Les IQ représentent les optiques d'entrée/sortie et Q0 est un quadripôle servant de guide d'ions (d'après [2])

III.3 *Électronique de pilotage*

L'électronique de pilotage utilisée pour imposer les tensions voulues aux électrodes du quadripôle Q3 est constituée de deux étages. Le premier (cf. section III.3.1 ci-dessous) est un système de faible puissance permettant de générer un signal composé de plusieurs fréquences. Ce signal est alors amplifié par le second étage avant d'être appliqué aux électrodes du Q3 (cf. section III.3.2 page 125).

III.3.1 *Génération et addition des signaux radiofréquences*

Les potentiels RF (que ce soit le potentiel de confinement ou ceux d'excitation) sont générés séparément par des GBF¹ (Digimess – modèle FG 100) pilotés par ordinateur via une liaison RS-232. Ce système permet de contrôler finement les amplitudes et les fréquences des signaux sinusoïdaux générés dans une gamme allant de 0,5 Hz à 20 MHz (avec une distorsion inférieure à 5 %) et de 10 mV à 10 V (avec une précision de 3 %) pour une impédance de sortie de 50 Ω.

Les tensions sinusoïdales ainsi générées sont acheminées via des câbles coaxiaux vers un dispositif additionneur de tension monté en amont d'un dispositif suiveur permettant à la fois de sommer les tensions de différentes fréquences ainsi que de réaliser l'adaptation d'impédance avec l'étage d'amplification (cf. section III.3.2 ci-après et Figure III-3).

Il est à noter que la valeur de la tension en sortie de ce système ne peut excéder la valeur de la tension d'alimentation des amplificateurs opérationnels qui le compose, c'est-à-dire ici 15 V. Au-delà de cette valeur maximale, le signal est écrêté. Il faut donc prendre garde de ne pas utiliser de tensions sinusoïdales dont les amplitudes, une fois additionnées, dépasseraient cette limite.

Les amplificateurs opérationnels utilisés sont de type TL081C (ST Microelectronics). Ceux-ci permettent de travailler dans une gamme de fréquence allant de 0 à 1 MHz avec une distorsion harmonique inférieure à 0,01 %. Le choix des valeurs des résistances utilisées dans le montage permet d'adapter les impédances d'entrées et de sorties du montage (cf. Figure III-2).

La génération de signaux RF multifréquences peut aussi être réalisée par le biais d'un convertisseur numérique-analogique. L'analyse fréquentielle de la réponse du système CNA qui a été testé durant ce travail (Carte M2i.6031-exp de Spectrum Systementwicklung Microelectronic GmbH, Grosshansdorf, Allemagne) montrait que les signaux générés présentaient un bruit haute fréquence très important. Cela empêchait d'utiliser ce système pour générer les signaux à appliquer au Q3.

¹ Générateur Basse Fréquence

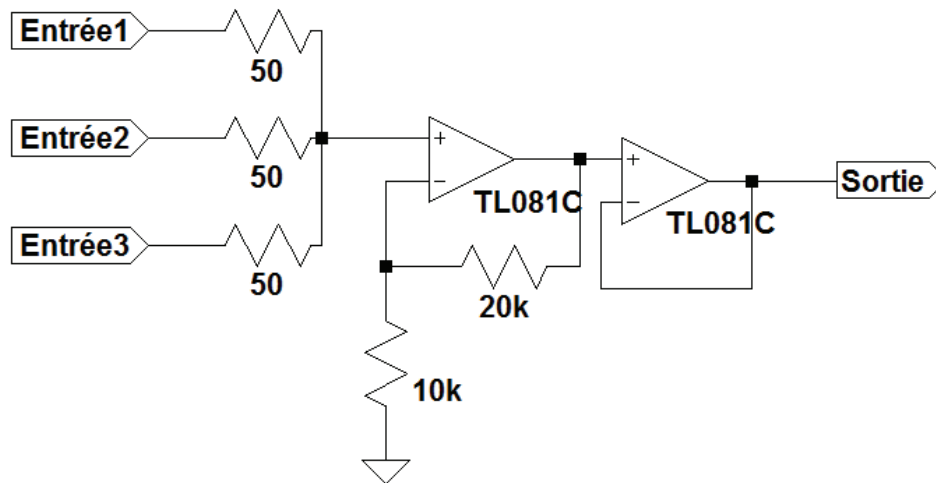


Figure III-2 : Schéma du montage additionneur de tensions. Celui-ci permet d'additionner jusqu'à trois tensions avec une impédance d'entrée de 50 Ω et une impédance de sortie nulle

III.3.2 Électronique d'amplification et balun

L'électronique de puissance du système de pilotage permet d'une part d'amplifier le signal provenant de l'additionneur de tensions et d'autre part de générer deux signaux déphasés de π radians à partir d'un unique signal d'entrée. Le premier rôle est dévolu à un amplificateur et le second à transformateur monté en balun.

L'amplificateur utilisé est un modèle 2100L – Electronics & Innovation Ltd. générant un gain de $50 \pm 1,5$ dB sur la gamme de 10 kHz à 12 MHz dans la limite de 100 VA¹ de puissance apparente en sortie.

Le balun est quant à lui constitué de deux transformateurs à noyaux ferriques toroïdaux identiques, de rapport 10 : 50 (cf. Figure III-3). Le bobinage est en fils de Litz afin de réduire les pertes par effet Joule à haute fréquence. Le déphasage de π radians entre les deux voies de sortie du balun (cf. Figure III-4) permet d'imposer aux électrodes du quadripôle des tensions permettant de l'utiliser comme un QMF (cf. section I.3.2.1 page 34).

¹ Volt-Ampère

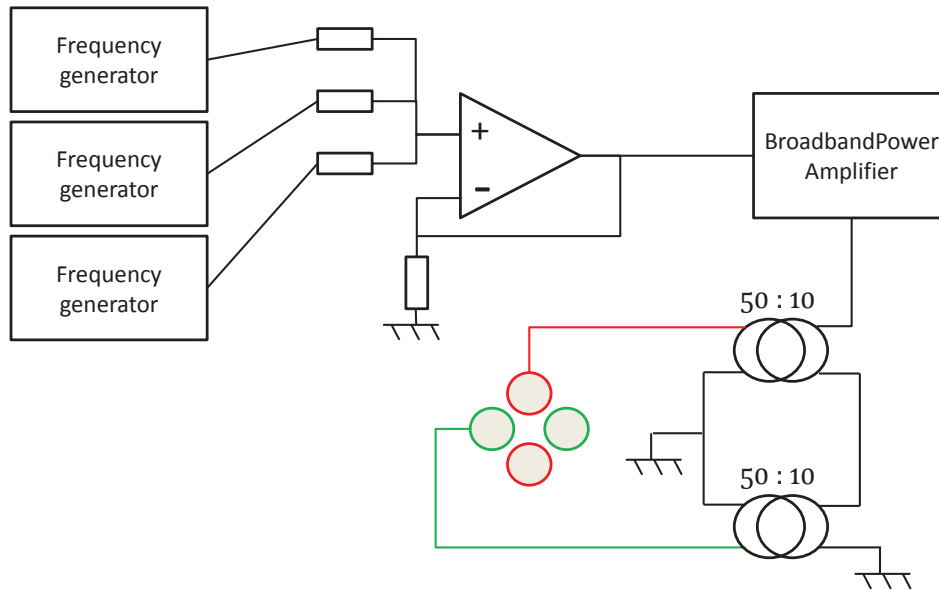


Figure III-3 : Schéma de principe du système électronique de pilotage branché aux électrodes du Q3. Les signaux de sortie des GBF sont additionnés, amplifiés et déphasés de π rad par le balun avant d'être imposés aux électrodes du Q3 de l'instrument

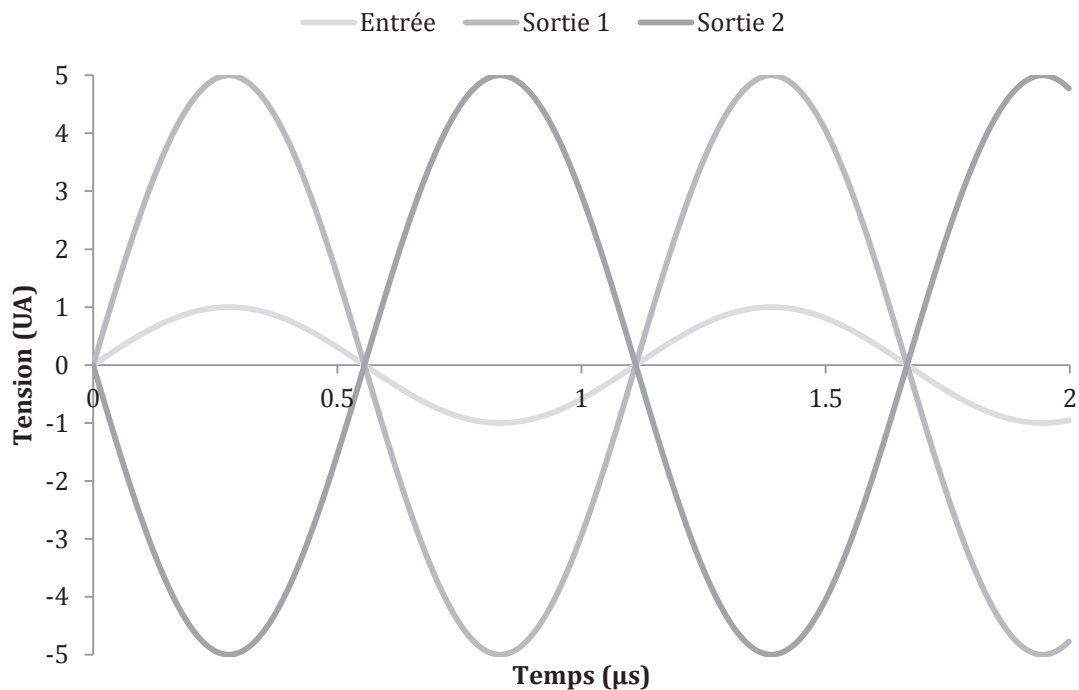


Figure III-4 : Tensions en entrée et en sorties du balun. Le balun permet, pour une tension sinusoïdale d'entrée donnée, d'obtenir sur les voies de sortie deux signaux de même fréquence, d'amplitude cinq fois plus élevée, dont l'un est en phase avec l'entrée et l'autre en opposition de phase

III.4 Réglages de l'électronique de pilotage

Une fois raccordé aux électrodes du quadripôle, le système de pilotage permet d'imposer une tension composée de plusieurs composantes sinusoïdales (ici, jusqu'à trois) de fréquences et d'amplitude réglables. Cependant la fonction de transfert du système électronique n'est pas constante et dépend de la fréquence (du fait de la présence des bobines du balun et de l'impédance de sortie, ici le quadripôle, modélisable par une capacité). Il est donc nécessaire au préalable de mesurer le gain de la chaîne d'amplification en fonction de la fréquence afin de pouvoir calculer la tension appliquée au quadripôle en fonction de la fréquence du signal et de la tension d'entrée délivrée par le GBF.

Cette mesure ne peut malheureusement pas être effectuée de manière directe en branchant un oscilloscope aux électrodes du quadripôle. En effet, l'impédance d'entrée d'un oscilloscope et des sondes hautes tensions n'est pas infinie : le comportement du système serait modifié par la mesure.

Ici, la mesure a donc été réalisée indirectement grâce à une mesure du LMCO¹ du Q3. En effet celui-ci dépend directement de V et de Ω en mode RF-only (cf. section II.1.1.2.1 page 72) :

$$V = 0,908 \cdot \frac{r_0^2}{4e} \cdot \Omega^2 (m/z)_{\text{LMCO}} \quad \text{III-1}$$

Pour ce faire, l'instrument a été configuré pour réaliser un balayage en masse en Q1, les quadripôles q2 et Q3 fonctionnent alors en simples guides d'ions. Un polymère (ici du PEG² 600 à une concentration de 0,3 mM dans un mélange équivolume eau/méthanol avec 1% d'acide acétique en volume) est infusé dans le spectromètre de masse. Ce polymère a la propriété de présenter un spectre en masse complexe avec de nombreux pics régulièrement espacés. La masse du LMCO du Q3 est donc facilement lisible sur ce spectre de masse : il s'agit de la masse la plus faible visible sur le spectre de masse, les ions de ratio masse/charge plus faible que le LMCO n'ayant pas pu traverser le Q3 et atteindre le détecteur (cf. Figure III-5).

¹ Low Mass Cut Off : valeur minimale du ratio m/z des ions pouvant être stabilisés dans un QMF

² Poly Éthylène Glycol (n° CAS : 25322-68-3), masse du monomère : 44 Da

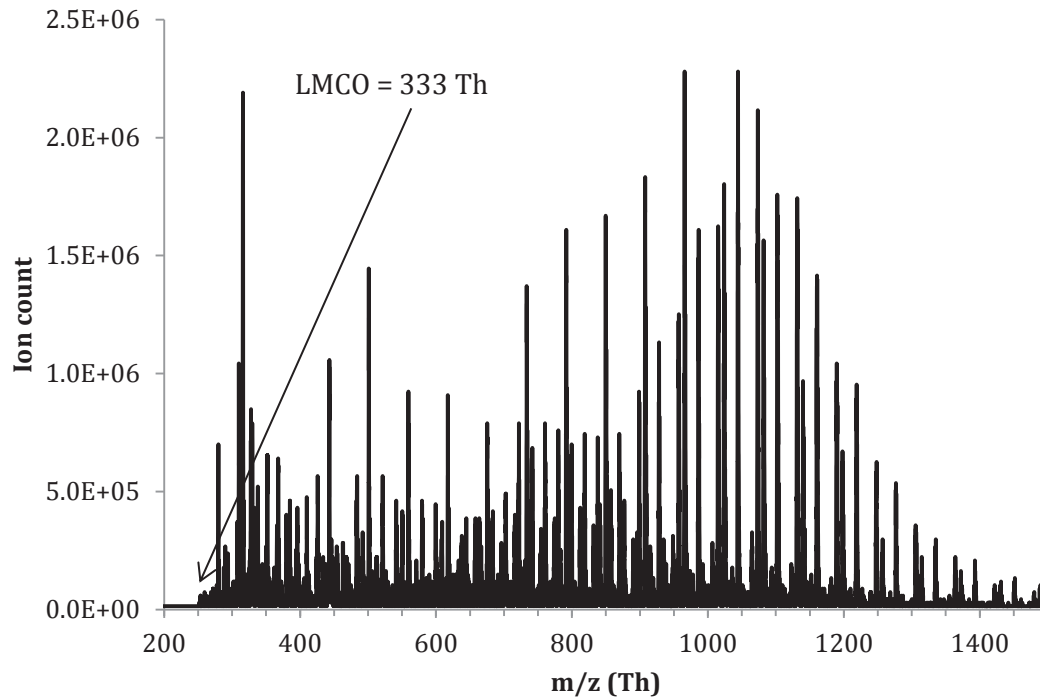


Figure III-5 : Exemple d'un spectre de masse d'une solution de PEG 600 en mode positif. Balayage en masse en Q1 (balayage de 100 Th à 1500 Th en 1s, somme de 300 scans). Tension d'entrée du GBF : 400 mV, 600 kHz. Le spectre en masse du PEG présente principalement des pics espacés de 44 Th (correspondant au m/z d'une unité monomérique monochargée) et des pics espacés de 22 Th (m/z d'une unité monomérique bichargée) mais aussi des pics espacés de 11 Th, 5,5 Th etc.

En configurant un des GBF pour qu'il délivre une tension sinusoïdale d'amplitude V_{GBF} à la pulsation Ω (les autres entrées de l'additionneur étant mises à la masse), le potentiel imposé aux électrodes du Q3 sera un potentiel sinusoïdal d'amplitude $V = H(\Omega)V_{GBF}$ (H étant la fonction de transfert du système ou, ce qui revient au même, le gain de la chaîne d'amplification) et de pulsation Ω . En utilisant l'équation III-1 il est donc possible de remonter à une mesure de la fonction de transfert (à une constante multiplicative près dépendant de la géométrie du système), connaissant V_{GBF} , Ω et pouvant mesurer le LMCO :

$$H(\Omega) \propto \frac{\Omega^2}{V_{GBF}} (m/z)_{LMCO} \quad \text{III-2}$$

Afin d'augmenter la précision de la mesure de la fonction de transfert, plusieurs mesures du LMCO ont été réalisées pour différentes valeurs de V_{GBF} à pulsation donnée. Les résultats obtenus sont présentés Figure III-6.

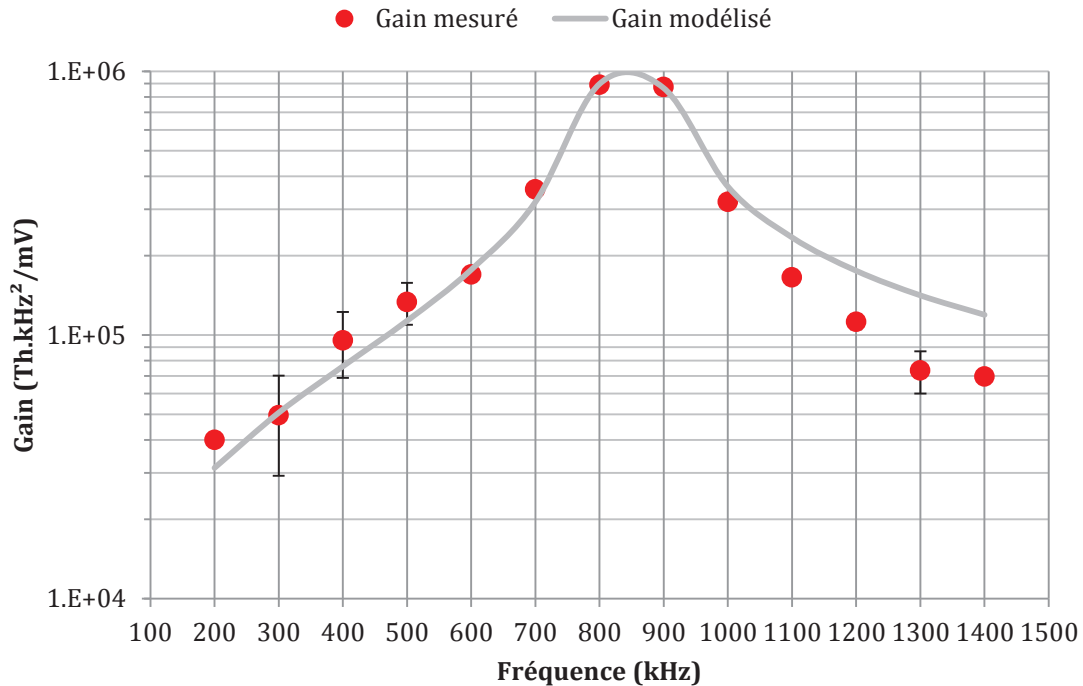


Figure III-6 : Gain du montage (exprimé en Th.kHz²/mV). Le modèle proposé est celui d'un filtre passe-bas d'ordre 2 de gain $G_0 = 1,0 \cdot 10^6$ Th.kHz²/mV, de fréquence de coupure $f_0 = 0,85$ MHz et de facteur de qualité $Q = 2,5 \cdot 10^6$

Le montage peut être modélisé avec une bonne précision (5,5 % d'écart quadratique moyen sur la gamme allant de 200 kHz à 1 MHz) par un système passe-bas d'ordre 2 dont la fonction de transfert est de la forme :

$$H(\Omega) = \frac{G_0}{\sqrt{\left[1 - \left(\frac{\Omega}{2\pi f_0}\right)^2\right]^2 + \frac{1}{Q^2} \left(\frac{\Omega}{2\pi f_0}\right)^2}} \quad \text{III-3}$$

Où le gain G_0 vaut $1,0 \cdot 10^6$ Th.kHz²/mV, la fréquence de coupure f_0 vaut 0,85 MHz et le facteur de qualité Q vaut $2,5 \cdot 10^6$. Ce modèle est cohérent avec le modèle d'un filtre passe-bas RLC où la partie RL modéliserait le balun et la capacité modéliserait le quadripôle Q3.

Afin de ne pas être limité par la puissance de l'amplificateur ainsi que pour avoir une bonne précision et une large gamme dynamique, il est préférable de travailler à des fréquences proches de la fréquence de coupure f_0 . Pour cette raison, la fréquence du potentiel de confinement utilisé est fixée à 0,9 MHz.

Par ailleurs, afin de valider expérimentalement les résultats théoriques du chapitre II il est nécessaire de pouvoir déterminer expérimentalement les paramètres q et q' lorsque des tensions d'excitation sont ajoutées à la tension de confinement.

III.4 Réglages de l'électronique de pilotage

Afin de déterminer le paramètre q d'un ion de ratio masse/charge donné connaissant le LMCO du système il suffit d'appliquer une simple règle de trois à partir de l'équation III-1 :

$$q = 0,908 \cdot \frac{(m/z)_{LMCO}}{(m/z)} \quad \text{III-4}$$

De même, afin de déterminer le facteur q' connaissant les paramètres v , V_{GBF} (amplitude de la tension de confinement) et V'_{GBF} (amplitude de la tension d'excitation) il est possible d'utiliser le modèle présenté à l'équation III-3 :

$$q' = \frac{H(v\Omega)}{H(\Omega)} \cdot \frac{V'_{GBF}}{V_{GBF}} \quad \text{III-5}$$

Le montage expérimental présenté aux sections III.2 et III.3 permet donc d'obtenir des résultats expérimentaux exprimables dans le plan (q ; q') utilisé dans l'étude théorique (cf. section II.3.2 page 125).

III.5 *Méthode d'analyse des résultats*

Afin de pouvoir déterminer expérimentalement les vallées d'instabilité dans le plan (q ; q') il est nécessaire de sélectionner un critère permettant de dire quand un ion est stable ou, a contrario, instable. Le critère retenu ici est le suivant (cf. Figure III-7) :

Un ion de ratio m/z donné est considéré comme instable quand une tension d'excitation est appliquée lorsque l'intensité de son pic dans le spectre de masse obtenu est inférieure à 1 % de l'intensité de son pic dans le spectre de masse de référence (obtenu sans excitation).

Étant entendu que les quadripôles q_2 et Q_3 fonctionnent en mode QMF sans balayage en masse, le spectre de masse est obtenu par un balayage en masse dans le quadripôle Q_1 . Ce balayage est réalisé par l'électronique interne du spectromètre de masse et contrôlé par le logiciel Analyst fourni par ABSciex avec l'instrument. De même les intensités de courant ionique mesurées par le détecteur sont traitées par l'électronique de l'instrument et par le logiciel Analyst.

Cette méthode assure (sous réserve de la bonne calibration en masse de l'instrument) que les ions détectés ont effectivement le ratio m/z prévu ce qui garantit la précision des mesures des bornes des vallées d'instabilité selon la masse, et donc selon le paramètre q .

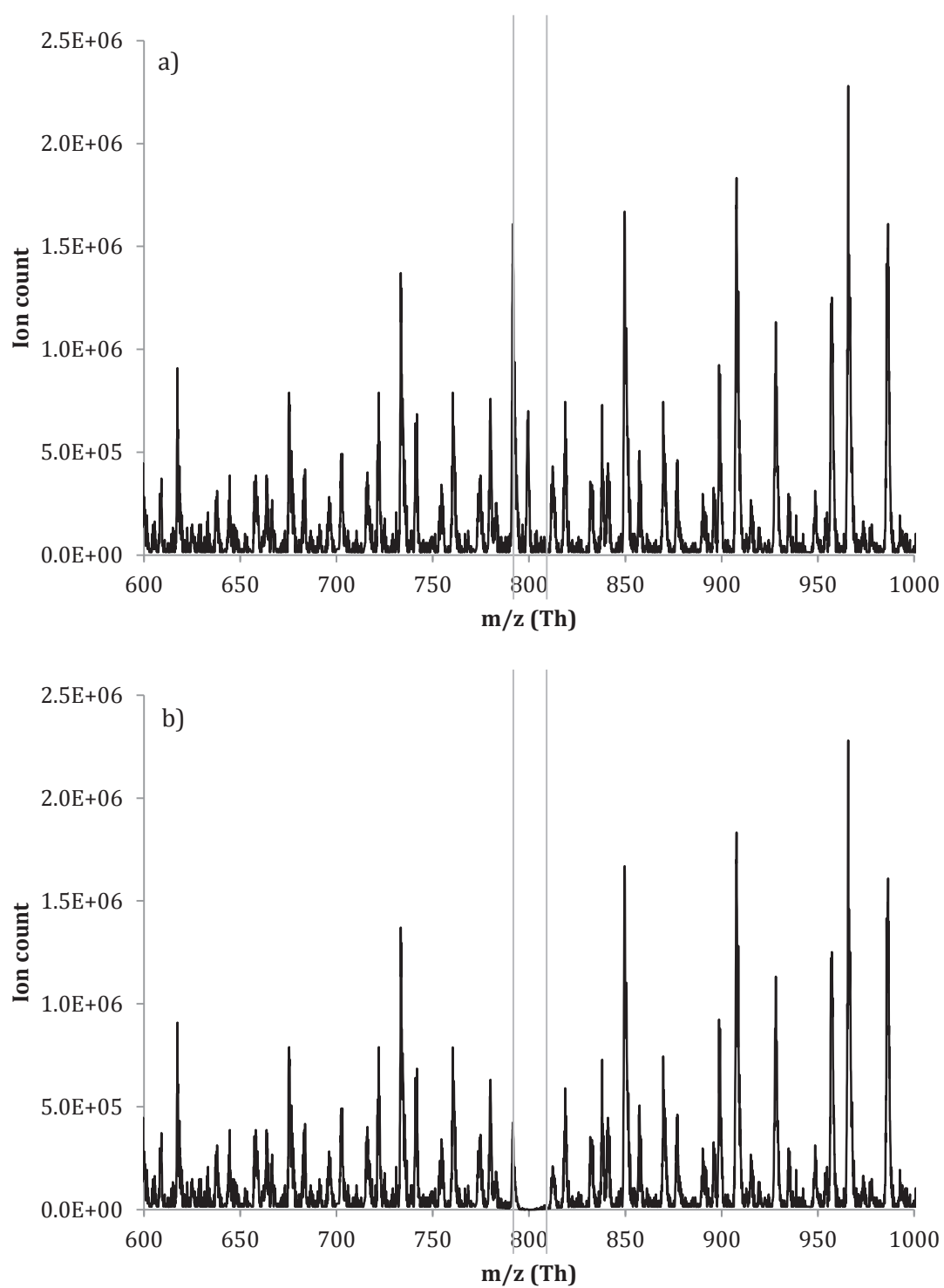


Figure III-7 : Exemple de spectres de spectres de masse (solution de PEG 600 en mode positif. Balayage en masse en Q1 100 Th à 1500 Th en 1s, somme de 300 scans). Le spectre (b) montre une déplétion entre 794 Th et 801 Th (par rapport au spectre (a)) d'après le critère décrit dans le corps du texte

Références bibliographiques

- [1] G. Hopfgartner, E. Varesio, V. Tschäppät, C. Grivet, E. Bourgogne, and L. A. Leuthold, "Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules," *J. Mass Spectrom.*, vol. 39, pp. 845–855, 2004.
- [2] J. W. Hager, "A new linear ion trap mass spectrometer," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 16, no. 6, pp. 512–526, 2002.
- [3] W. A. Korfmacher, *Using Mass Spectrometry for Drug Metabolism Studies*. Florida: CRC Press, 2004, p. 384.

**Chapitre IV *Excitations simultanées, comparaison théorie /
expérience***

IV.1	REMARQUES PRÉLIMINAIRES	137
IV.2	AVEC UNE EXCITATION	138
IV.3	AVEC DEUX EXCITATIONS.....	142
IV.4	APPLICATION À UN MÉLANGE TERNAIRE	143
IV.5	CONCLUSION DES EXPÉRIMENTATIONS.....	146

IV.1 Remarques préliminaires

Le montage expérimental décrit au Chapitre III permet d'imposer au quadripôle Q3 du 2000 QTrap un potentiel périodique comportant plusieurs composantes fréquentielles d'amplitudes et de fréquences choisies. La première de ces composantes permet de stabiliser les ions dans le Q3. Sa fréquence est fixe et a été choisie afin d'optimiser la précision des mesures (cf. section III.4 page 127). Les autres composantes fréquentielles permettent, en théorie, d'exciter des ions de ratios m/z choisis lorsqu'ils traversent Q3, conformément aux résultats théoriques présentés au chapitre II.

Le choix de l'amplitude de la première composante fréquentielle détermine le LMCO du Q3 (cf. section III.4 page 127) mais aussi la profondeur du puits de potentiel en mode RF-only. En effet, dans l'approximation de Dehmelt lorsque $a = 0$ (cf. section II.1.1.3 page 74) :

$$\bar{D}(r_0) = \frac{1}{4} zeVq \quad \text{IV-1}$$

Ainsi augmenter la valeur de V augmente la valeur du LMCO mais augmente aussi la profondeur du puits de potentiel et donc l'admittance, et donc la sensibilité, du système. Dans la suite la valeur de V a été fixée afin que le LMCO du système vaille 100 Th. Ce choix permet de réaliser un bon compromis entre l'intensité du signal et la détection d'ions de ratios m/z faibles dans les spectres expérimentaux. Cette valeur étant fixée, lorsqu'une composante fréquentielle d'excitation est ajoutée, le calcul du paramètre q' se fait simplement en utilisant l'équation III-5 (page 130).

En théorie le spectromètre de masse utilisé permet d'employer le quadripôle Q3 comme un QMF ce qui permet, en faisant un balayage en masse sur Q1, d'obtenir des spectres de masses avec des zones de déplétion et donc de confronter théorie et expérience, mais aussi de l'employer comme un LIT. Ce dernier mode de fonctionnement permettrait, lorsque plusieurs excitations sont imposées, de déstabiliser simultanément les ions de plusieurs ratios m/z choisis et donc de les détecter simultanément (cf. sections I.4.1.2 page 41 et II.3.1.3 page 104), ce qui était l'objectif final de ce travail. Malheureusement de nombreux problèmes techniques ont empêchés de mener à bien la validation expérimentale de ce mode de fonctionnement.

Néanmoins le fonctionnement du quadripôle Q3 en mode QMF a permis de vérifier expérimentalement les résultats théoriques obtenus lorsqu'une seule excitation est imposée (cf. section IV.2 ci-dessous) et lorsque deux excitations sont simultanément imposées (cf. section IV.3 page 142).

IV.2 Avec une excitation

Imposer une seule excitation permet non seulement de valider expérimentalement la condition de résonance des ions (cf. équation II-23 page 79) mais aussi de vérifier la formule donnant la valeur de β en fonction des paramètres a et q (cf. équation II-14 page 77).

En faisant varier $\Omega_{\text{excitation}}$ (et donc le paramètre ν) tout en conservant un paramètre q' le plus petit possible (afin d'avoir une résolution en masse la plus grande possible, cf. section II.3.2.4 page 110) il est possible de relever les ratios m/z correspondant aux ions excités (ceux-ci sont déstabilisés dans le Q3 et ne sont donc pas détectés, conséquemment les pics correspondant dans le spectre de masse ne sont plus visibles) et de les comparer avec les valeurs théoriquement prévues par l'équation II-14 (page 77). Le résultat de cette étude (réalisée en infusant la solution de PEG précédemment décrite, cf. section III.4 (page 127), dans le dispositif expérimental, en utilisant Q1 pour réaliser un spectre de masse et en imposant à Q3 une tension d'excitation de fréquence variable) est présenté Figure IV-1. L'accord des résultats expérimentaux avec les prévisions théoriques est remarquable, ce qui permet de valider a posteriori l'hypothèse qui a été faite en négligeant les non-linéarités du système (dues aux imperfections du champ et à la présence du gaz de refroidissement, cf. section II.2 page 87).

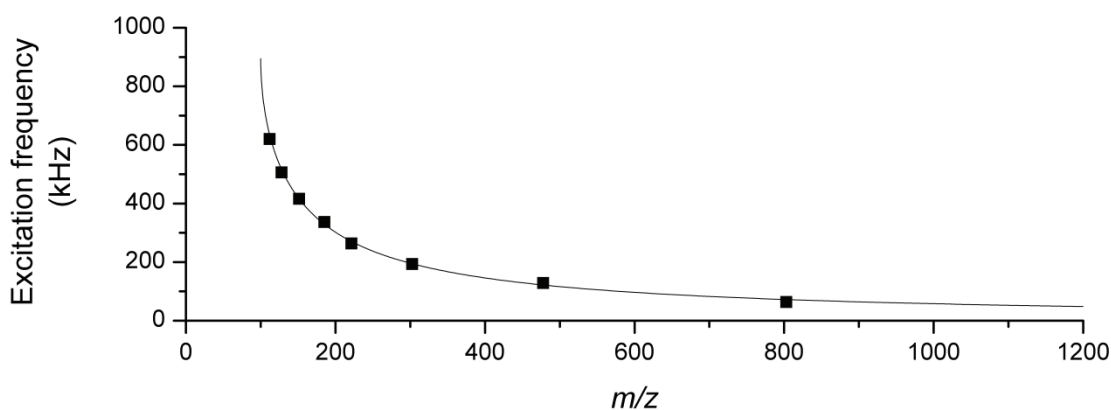


Figure IV-1 : Comparaison entre les valeurs théoriques et expérimentales des ratios m/z (en Th) excités par une fréquence donnée au premier ordre ($K = 1$ et $n = 0$)

À l'inverse, en fixant $\Omega_{\text{excitation}}$ et en faisant varier l'amplitude de la tension d'excitation (et donc le paramètre q'), il est possible de valider expérimentalement la justesse des diagrammes de stabilité dans le plan $(q; q')$ obtenus en analysant numériquement le comportement des équations de Hill associées (cf. section II.3.2 page 105). Pour ce faire, les bornes des zones d'instabilité ont été relevées dans le spectre de masse du PEG d'après le critère décrit à la section III.5 (page 131) pour plusieurs valeurs de q' (cf. Figure IV-2). Ces bornes ont été reportées dans le plan $(q; q')$ et comparées aux diagrammes de stabilité obtenus par l'étude des équations de Hill associées. Les résultats de cette étude sont présentés à la Figure IV-3.

Là encore les résultats expérimentaux sont en bon accord avec les résultats théoriques obtenus précédemment, y compris pour les résonances annexes (correspondant pour $K = 1$ et $n = -1$ aux ratios m/z 105 Th et 177 Th dans l'exemple présenté Figure IV-3). Les détails les plus fins des diagrammes de stabilité (correspondant à des résonances d'ordres élevés) ne sont malheureusement pas accessibles expérimentalement en raison de la difficulté de visualiser un éventuel intervalle d'instabilité lorsque celui-ci est situé entre deux pics du spectre de masse du PEG. Par ailleurs la zone de stabilité au-delà de la valeur $q = 0,908$ ne peut être observée sur ce montage expérimental en raison des limitations en masse imposées par le Q_1 et le q_2 . Néanmoins l'accord des mesures avec les données théoriques permet non seulement de valider la condition théorique de résonance pour les ordres élevés (équation II-23 page 79) mais aussi la formule donnant la largeur des vallées d'instabilité en fonction du paramètre q' (équation II-65).

IV.2 Avec une excitation

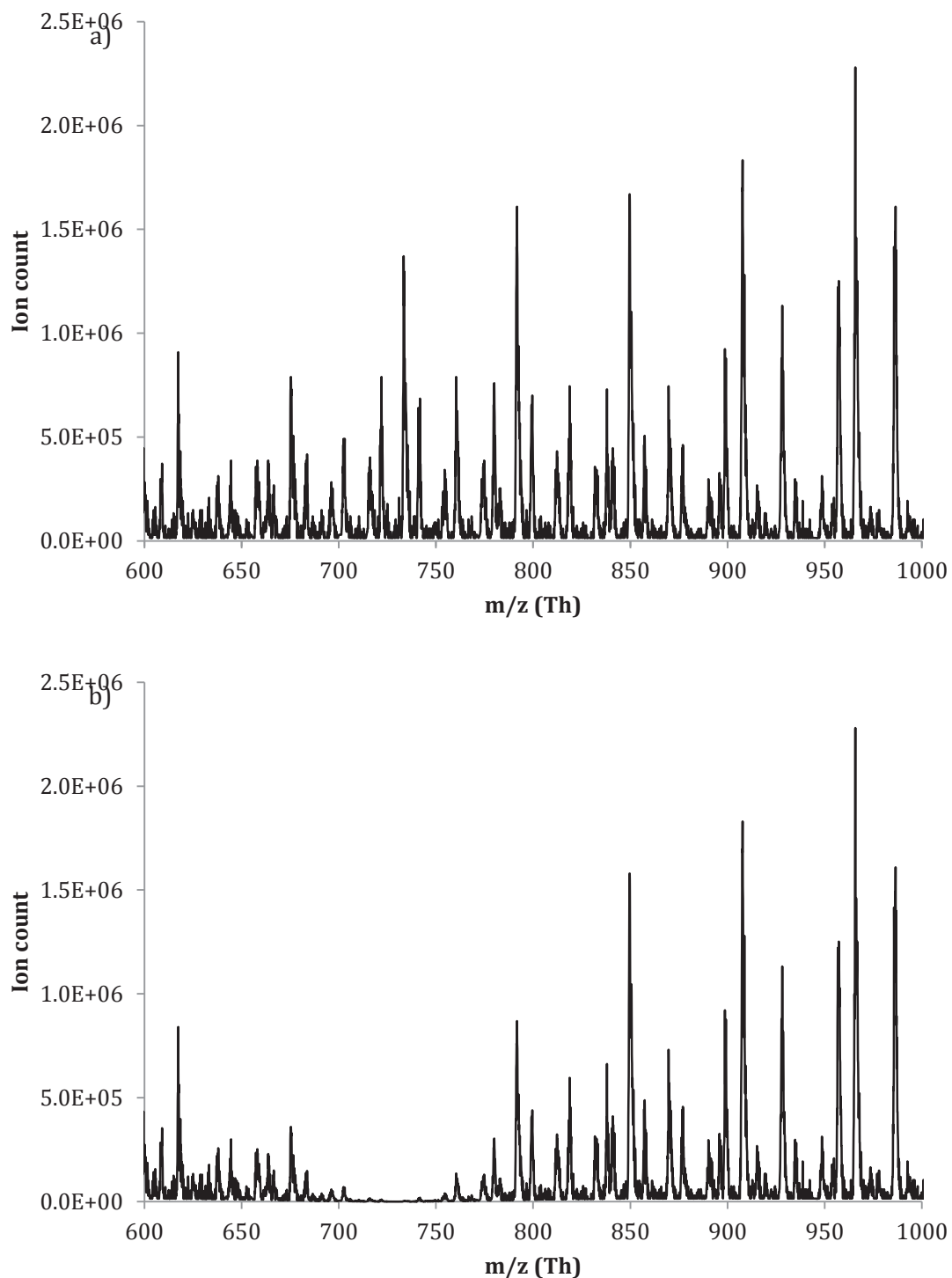


Figure IV-2 : Exemples de spectres de masse pour la solution de PEG 600. Le spectre (a) correspond au spectre de référence, le spectre (b) correspond à un spectre mesuré lorsqu'une tension d'excitation de 90 kHz ($\nu = 0,1$) et d'amplitude relative 0,05 est appliquée à Q3. Cette excitation provoque l'apparition d'une bande d'instabilité entre les masses 720 Th et 750 th

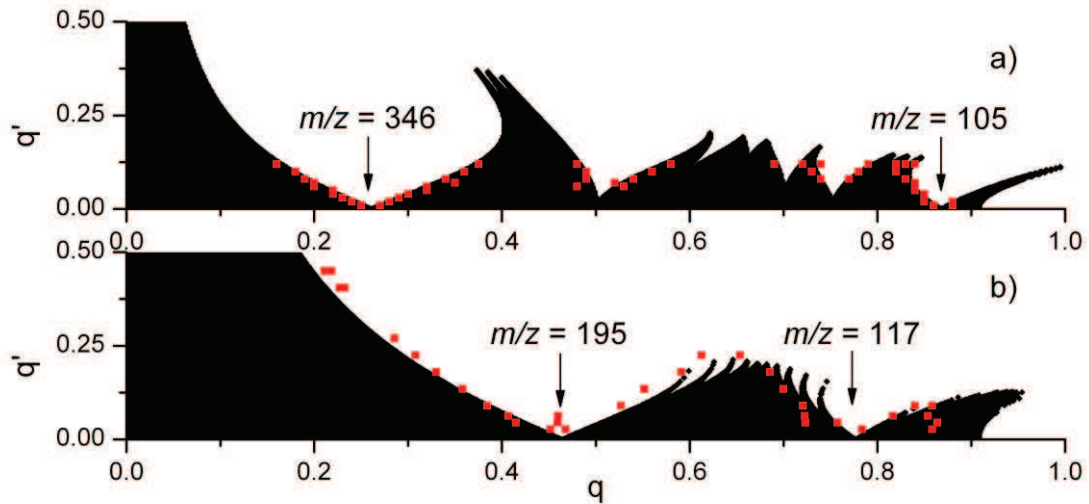


Figure IV-3 : Comparaison entre un diagramme de stabilité dans le plan $(q ; q')$ obtenu par l'étude des équations de Hill (zones noires) et les bornes des zones d'instabilité relevées expérimentalement (points rouges). Figure (a) : $\nu = 0,188$ et figure (b) : $\nu = 0,344$. Les déplétions centrées sur les masses de 346 Th et 195 Th correspondent à des résonances de paramètres $K = 1$ et $n = 0$. Les déplétions centrées sur les masses de 105 Th et 117 Th correspondent à des résonances de paramètres $K = 1$ et $n = 1$. Les autres vallées de déplétion correspondent à des résonances d'ordres plus élevés

IV.3 Avec deux excitations

Lorsque deux tensions d'excitations sont superposées la théorie prévoit qu'aux faibles amplitudes ($q' < 0,02$) les zones d'instabilités soient indépendantes et soient centrées autour des valeurs prévues par l'équation II-23 (page 79). À l'inverse, aux amplitudes plus élevées, un décalage des vallées d'instabilité devait apparaître. Les résultats expérimentaux, dont un exemple est présenté à la Figure IV-4, confirment ces conclusions.

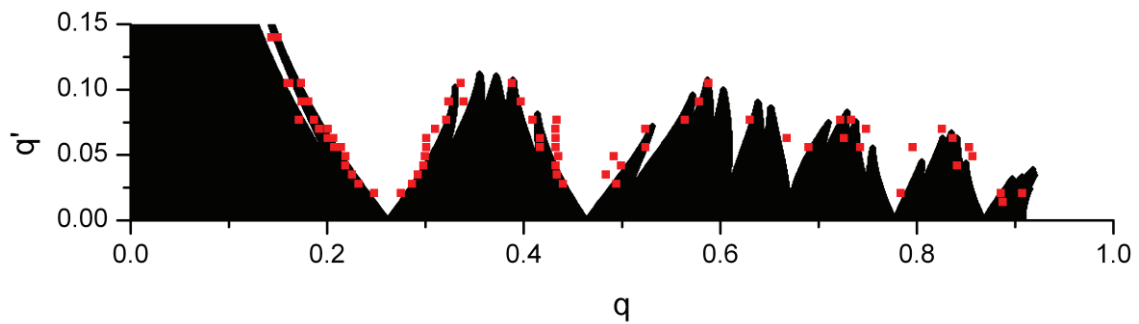


Figure IV-4 : Comparaison entre un diagramme de stabilité dans le plan $(q ; q')$ obtenu par l'étude des équations de Hill ($\nu_1 = 0,188$ et $\nu_2 = 0,344$, les amplitudes relatives de ces deux potentiels d'excitation sont identiques et égales à q' , conformément à l'équation II-61) et les bornes des zones d'instabilité relevées expérimentalement

IV.4 Application à un mélange ternaire

Les résultats présentés aux sections IV.2 et IV.3 permettent de valider les résultats théoriques présentés au chapitre II, en particulier en ce qui concerne la position et la largeur des vallées d'instabilité au premier ordre lorsque l'amplitude q' des excitations est faible.

Ces résultats ont été appliqués à un mélange constitué de trois molécules (propranolol¹, nadolol² et acébutolol³) donnant un spectre de masse composé de trois pics en mode positif, situés respectivement à 259 Th, 309 Th et 336 Th (cf. Figure IV-5). Ces trois molécules sont des substances pharmaceutiques de la classe des bêtabloquants possédant un site préférentiel de protonation (un groupement amine secondaire). Elles ont été choisies pour réaliser cette expérimentation car elles génèrent toutes trois des ions pseudomoléculaires monochargés en mode positif avec une grande intensité dans une gamme de masse assez restreinte (77 Th entre le pic de l'acébutolol et celui du propranolol).

Une excitation d'amplitude 0,01 à la fréquence de résonance prévue par la théorie (cf. section II.1.1.5 page 78) permet de déstabiliser sélectivement les ions moléculaires du propranolol ou ceux de l'acébutolol. Les deux excitations combinées permettent de déstabiliser simultanément les ions moléculaires de ces deux composés tout en gardant stables ceux du nadolol (cf. Figure IV-6). L'intensité des pics dans les spectres de masse obtenus reste constante, ce qui permet de conclure à l'absence de modification de la transmittance d'un QMF en dehors des zones d'instabilité lorsque l'amplitude des potentiels d'excitation reste faible.

¹ N° CAS : 525-66-6

² N° CAS : 42200-33-9

³ N° CAS : 37517-30-9

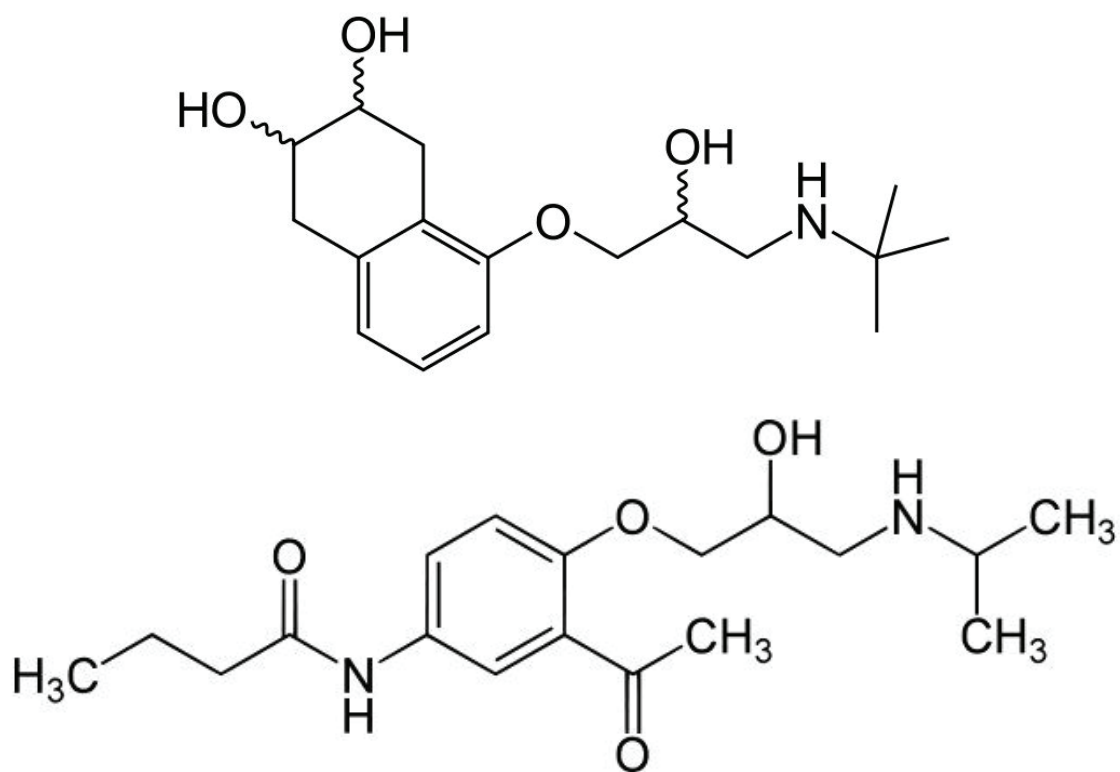


Figure IV-5 : Formules développées des molécules de nadolol, d'acébutolol et de propranolol (de bas en haut)

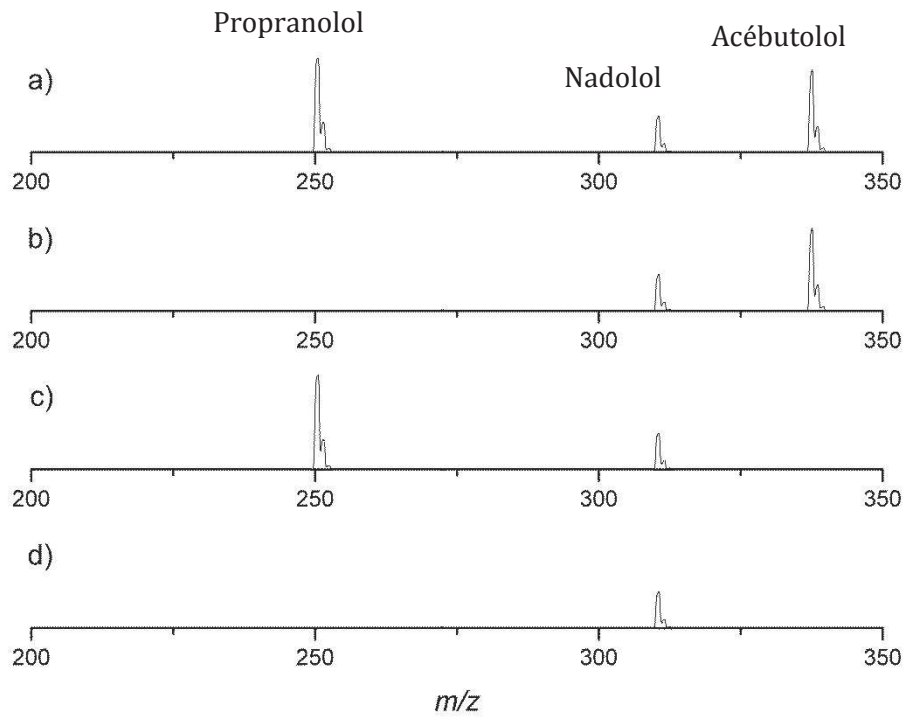


Figure IV-6 : Spectres de masse d'un mélange de propranolol ($m/z = 259$ Th), de nadolol ($m/z = 309$ Th) et d'acébutolol ($m/z = 336$ Th). (a) : spectre de masse obtenu sans excitation ; (b) : spectre de masse obtenu avec une excitation à $q' = 0,01$ centrée sur $m/z = 259$ Th ; (c) : spectre de masse obtenu avec une excitation à $q' = 0,01$ centrée sur $m/z = 336$ Th ; (d) : spectre de masse obtenu avec deux excitations à $q' = 0,01$ centrés respectivement sur 259 Th et 336 Th

IV.5 *Conclusion des expérimentations*

L'étude expérimentale des effets des potentiels d'excitation sur le fonctionnement des QMF confirme la plupart des résultats théoriques obtenus, à savoir en particulier :

- La relation linéaire reliant la largeur des vallées d'instabilité à l'amplitude des excitations ;
- La formule donnant la position de ces vallées dans le diagramme de stabilité ;
- L'indépendance de la position des vallées aux faibles amplitudes lorsque plusieurs excitations sont imposées simultanément.

De surcroît, l'expérience menée sur un mélange simple a permis de vérifier que l'ajout d'un ou de plusieurs potentiels d'excitation ne modifiait pas la transmittance d'un QMF en dehors des zones d'instabilité lorsque l'amplitude des excitations restait faible.

Conclusion

La spectrométrie de masse en mode MRM³ couplée à une méthode de séparation chromatographique telle que l'HPLC est une technologie permettant de détecter et d'identifier des molécules dans des mélanges complexes, notamment d'origine biologique, avec une grande sensibilité et une grande spécificité. Un moyen, probablement le plus simple, pour augmenter à la fois la sensibilité et la spécificité de cette méthode d'analyse est d'augmenter la cadence de chaque cycle d'analyse en masse. Cela peut être fait en supprimant l'étape de balayage en masse et en la remplaçant par une étape d'expulsion simultanée d'ions fragments représentatifs des molécules à détecter.

Dans un premier temps une étude théorique des équations du mouvement des ions dans un système quadrupolaire a été réalisée. Celle-ci a permis de mettre au jour une représentation graphique des zones de stabilité des ions dans un piège ionique lorsqu'un ou plusieurs potentiels RF d'excitation étaient appliqués. Ces diagrammes de stabilités ont permis :

- De valider le critère de résonance des ions obtenu lorsqu'une seule excitation était imposée et dans la limite où l'amplitude de cette excitation est nulle ;
- D'obtenir une loi phénoménologique reliant l'intensité de l'excitation à la largeur de la gamme de masse déplétée au premier ordre ;
- D'étendre le critère de résonance des ions au cas où plusieurs potentiels d'excitations sont simultanément appliqués ;
- De mettre au jour des phénomènes de stabilisations paradoxales liées à l'apparition de fréquences d'antirésonances lorsque le potentiel de stabilisation et les potentiels d'excitations sont accordés en phase ;
- De déceler un phénomène de stabilisation des faibles masses en-deçà du LMCO en présence d'un potentiel d'excitation, phénomène qui pourrait être utilisé en routine afin de détecter des fragments de très faibles m/z .

Dans un second temps cette étude théorique a été validée expérimentalement sur un appareil commercial, d'abord sur une solution de polymère puis sur un mélange de trois molécules. Ces résultats expérimentaux sont en excellent accord avec les résultats théorique précédemment établis, ce qui valide la possibilité d'expulser simultanément, sélectivement et de façon répétable, plusieurs ions de ratios m/z donnés d'un système quadrupolaire.

Cependant, afin de pouvoir utiliser cette méthode d'analyse pour des applications industrielles, en particulier dans le cadre de la détection de protéines d'intérêt dans le domaine du diagnostic *in vitro*, il sera nécessaire de tester la technologie d'expulsion simultanée sur un QIT. Une discussion avec un constructeur d'instruments de spectrométrie de masse devra être menée afin de pouvoir utiliser cette technologie en routine sur des appareils commerciaux.

Annexes

A.	GÉNÉRALISATION DE L'APPROXIMATION DU Puits DE POTENTIEL	151
B.	PROGRAMME INFORMATIQUE CALCULANT β EN FONCTION DES PARAMÈTRES A ET Q	154
C.	PUBLICATIONS	156
C.1	ALTERNATIVE REPRESENTATION FOR THE STABILITY DIAGRAM OF QUADRUPOLE ION TRAPS UPON ADDITIONAL QUADRUPOLAR EXCITATION.....	157
C.2	VACUUM ULTRAVIOLET ACTION SPECTROSCOPY OF POLYSACCHARIDES	167
C.3	MULTI ELECTRON CAPTURE AND DEPROTONATION PROCESSES OBSERVED IN Xe ⁸⁺ - CYTOCHROME C ^{Q+} (Q=15-19) COLLISIONS	177

A. Généralisation de l'approximation du puits de potentiel

L'article de Wuerker *et al.*¹ présente la méthode pour trouver une expression analytique du potentiel dans le modèle de Dehmelt (cf. section II.1.1.4.1 page 76) lorsque le champ appliqué est purement quadripolaire.

La méthode décrite ci-après est plus générale car elle ne fait aucune hypothèse a priori sur la forme du champ produit par les électrodes. Les autres hypothèses faites sont exactement les mêmes que celle de la méthode de Wuerker.

Considérons l'équation adimensionnée du mouvement des ions (cf. équation II-6 page 68) :

$$\frac{d^2\vec{x}}{d\xi^2} + (a - 2q \cos 2\xi) \frac{\nabla\phi(\vec{x})}{2} = \vec{0} \quad \text{A-1}$$

Il est possible de décomposer le mouvement de l'ion selon deux composantes \vec{X} et $\vec{\delta}$:

$$\vec{x} = \vec{X} + \vec{\delta} \quad \text{A-2}$$

Sous l'hypothèse que la composante \vec{X} est de grande amplitude devant la composante $\vec{\delta}$ (soit encore $\|\vec{X}\| \gg \|\vec{\delta}\|$) l'équation A-1 devient :

$$\frac{d^2\vec{x}}{d\xi^2} = -\frac{1}{2}(a - 2q \cos 2\xi)\nabla\phi(\vec{X}) \quad \text{A-3}$$

Sous l'hypothèse que la composante $\vec{\delta}$ varie rapidement devant la composante \vec{X} (soit encore $\left\|\frac{d^2\vec{X}}{dt^2}\right\| \ll \left\|\frac{d^2\vec{\delta}}{dt^2}\right\|$) l'équation A-3 devient :

$$\frac{d^2\vec{\delta}}{d\xi^2} = -\frac{1}{2}(a - 2q \cos 2\xi)\nabla\phi(\vec{X}) \quad \text{A-4}$$

Sous l'hypothèse que la composante continue du potentiel est négligeable devant la composante sinusoïdale (soit encore $a \ll q$) l'équation A-4 devient :

$$\frac{d^2\vec{\delta}}{d\xi^2} = q \cos 2\xi \nabla\phi(\vec{X}) \quad \text{A-5}$$

Enfin, sous l'hypothèse que \vec{X} reste constant sur une période de temps assez brève (de l'ordre de $\frac{2\pi}{\Omega}$) il est possible d'intégrer deux fois l'équation A-5 pour obtenir :

¹ R.F. Wuerker, H. Shelton and R.V. Langmuir – Electrodynamic containment of charged particles – Journal of Applied Physics, 30 (3) : 342-349, 1959

$$\vec{\delta} = -\frac{q}{4} \cos 2\xi \nabla \phi(\vec{X}) \quad \text{A-6}$$

En réinjectant cette approximation dans l'équation A-2 il vient :

$$\vec{x} = \vec{X} - \frac{q}{4} \cos 2\xi \nabla \phi(\vec{X}) \quad \text{A-7}$$

En substituant cette expression dans le membre de droite de l'équation A-1 il vient :

$$\frac{d^2 \vec{x}}{d\xi^2} = -\frac{1}{2} (a - 2q \cos 2\xi) \nabla \phi \left(\vec{X} - \frac{q}{4} \cos 2\xi \nabla \phi(\vec{X}) \right) \quad \text{A-8}$$

L'hypothèse $\|\vec{X}\| \gg \|\vec{\delta}\|$ permet de faire un développement limité de ϕ autour de \vec{X} dans l'équation A-8 :

$$\frac{d^2 \vec{x}}{d\xi^2} = -\frac{1}{2} (a - 2q \cos 2\xi) \left[\nabla \phi(\vec{X}) - \frac{q}{4} \cos 2\xi \nabla (\nabla \phi(\vec{X})) \cdot \nabla \phi(\vec{X}) \right] \quad \text{A-9}$$

En introduisant l'opérateur Λ agissant sur les champs scalaires comme $\forall F, \Lambda F = \nabla(\nabla F) \cdot \nabla F$, l'équation A-9 se simplifie en :

$$\frac{d^2 \vec{x}}{d\xi^2} = -\frac{1}{2} (a - 2q \cos 2\xi) \left[\nabla \phi(\vec{X}) - \frac{q}{4} \cos 2\xi \Lambda \phi(\vec{X}) \right] \quad \text{A-10}$$

Sous l'hypothèse $\frac{d^2 \vec{X}}{d\xi^2} = \frac{1}{\pi} \int_{\xi}^{\xi+\pi} \frac{d^2 \vec{x}}{d\xi^2} dt$ (les variations de la composante $\vec{\delta}$ sont suffisamment rapides pour avoir une moyenne nulle sur une durée de l'ordre de $\frac{2\pi}{\Omega}$) l'équation A-10 se simplifie une dernière fois :

$$\frac{d^2 \vec{X}}{d\xi^2} = -\frac{1}{2} \left(a \nabla \phi(\vec{X}) + \frac{q^2}{4} \Lambda \phi(\vec{X}) \right) \quad \text{A-11}$$

L'opérateur Λ a comme composantes en base cartésienne $\forall F, \Lambda F = \begin{pmatrix} \frac{\partial F}{\partial x} \frac{\partial^2 F}{\partial x^2} + \frac{\partial F}{\partial y} \frac{\partial^2 F}{\partial x \partial y} + \frac{\partial F}{\partial z} \frac{\partial^2 F}{\partial x \partial z} \\ \frac{\partial F}{\partial x} \frac{\partial^2 F}{\partial x \partial y} + \frac{\partial F}{\partial y} \frac{\partial^2 F}{\partial y^2} + \frac{\partial F}{\partial z} \frac{\partial^2 F}{\partial y \partial z} \\ \frac{\partial F}{\partial x} \frac{\partial^2 F}{\partial x \partial z} + \frac{\partial F}{\partial y} \frac{\partial^2 F}{\partial y \partial z} + \frac{\partial F}{\partial z} \frac{\partial^2 F}{\partial z^2} \end{pmatrix}$

et en base cylindrique $\forall F, \Lambda F = \frac{1}{r^3} \begin{pmatrix} r^3 \frac{\partial F}{\partial r} \frac{\partial^2 F}{\partial r^2} + r \frac{\partial F}{\partial \theta} \frac{\partial^2 F}{\partial r \partial \theta} + r^3 \frac{\partial F}{\partial z} \frac{\partial^2 F}{\partial r \partial z} \\ r^2 \frac{\partial F}{\partial r} \frac{\partial^2 F}{\partial r \partial \theta} + \frac{\partial F}{\partial \theta} \frac{\partial^2 F}{\partial \theta^2} + r^2 \frac{\partial F}{\partial z} \frac{\partial^2 F}{\partial \theta \partial z} \\ r^3 \frac{\partial F}{\partial r} \frac{\partial^2 F}{\partial r \partial z} + r \frac{\partial F}{\partial \theta} \frac{\partial^2 F}{\partial \theta \partial z} + r^3 \frac{\partial F}{\partial z} \frac{\partial^2 F}{\partial z^2} \end{pmatrix}$.

L'équation A-11 permet d'appliquer le modèle du pseudo-puits de potentiel à n'importe quel potentiel ϕ , même non quadratique. En particulier le théorème de Helmholtz-Hodge permet de décomposer le champ vectoriel $\Lambda\phi$ en une composante « longitudinale » $\nabla\psi$ (i.e. dérivant d'un potentiel ψ qui s'ajoute alors au potentiel ϕ) et en une composante « solénoïdale » $\nabla \wedge \vec{A}$ (i.e. dérivant d'un potentiel vecteur \vec{A}).

Vérifions tout de même la validité de l'équation A-11 sur un potentiel quadratique de la forme

$$\phi \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix} = x^2 - y^2 :$$

- En ce cas, $a\nabla\phi \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix} = 2a \begin{pmatrix} x \\ -y \end{pmatrix}$;
- De même, $\frac{q^2}{4}\Lambda\phi(\vec{X}) = q^2 \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix}$.

De là, l'équation A-11 permet d'écrire $\frac{d^2\vec{X}}{d\xi^2} = -\frac{1}{2}\left[2a \begin{pmatrix} x \\ -y \end{pmatrix} + q^2 \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix}\right]$ soit encore

$$\begin{cases} \frac{d^2x}{d\xi^2} = -\left(a + \frac{q^2}{2}\right)x \\ \frac{d^2y}{d\xi^2} = -\left(-a + \frac{q^2}{2}\right)y \end{cases}. \text{ Cette dernière expression étant cohérente avec celle obtenue par}$$

l'approximation de Dehmelt classique (cf. section II.1.1.4.1 page 76).

B. Programme informatique calculant β en fonction des paramètres a et q

L'équation permettant de calculer le paramètre β en fonction des paramètres de Mathieu a et q (équation II-14 page 77) est une équation transcendante en β . La méthode utilisée ici pour résoudre cette équation est la méthode dichotomique. Par propriété, le paramètre β est compris dans l'intervalle entre 0 et 1 lorsque les paramètres a et q sont dans la première zone de stabilité du diagramme de Mathieu. De plus la fonction $f_{a,q}(x)$ définie par l'équation B-12 est croissante. Le programme présenté ci-après utilise donc un algorithme de recherche dichotomique sur la fonction $f_{a,q}(x)$ en partant d'une valeur initiale $x_0 = 0,5$ (la variable représentant x est notée RES), en calculant la valeur de $f_{a,q}(x)$ (le calcul des fractions continues se fait sous un ordre d'itération donné, 100 itérations donnant une précision de l'ordre de 10^{-5}) et en augmentant ou en diminuant à chaque itération de l'algorithme la valeur de la variable RES d'une grandeur représentée par la variable PAS. Cette dernière étant elle-même divisée par 2 à chaque itération, jusqu'à ce que sa valeur soit inférieure à la précision souhaitée.

$$f_{a,q}(x) = a - x^2 + \frac{q^2}{(x+2)^2 - a - \frac{q^2}{(x+4)^2 - a - \frac{q^2}{(x+6)^2 - a - \dots}}} \quad \text{B-12}$$

$$+ \frac{q^2}{(x-2)^2 - a - \frac{q^2}{(x-4)^2 - a - \frac{q^2}{(x-6)^2 - a - \dots}}$$

Le programme en C++ est donné ci-dessous :

```
long double beta::beta_calc(int ordre, long double precision, long double a, long double q)
{
    long double res = 0.5;
    long double pas = 0.25;
    long double fp = 1.,fn = 1.,f = 1.;
    long double q2 = q* q;
    int i;
    while(pas >= precision)
    {
        for(i = ordre ; i >= 0 ; i--)
        {
            if(i == ordre)
            {
                fp = (res + 2*i)*(res + 2*i) - a;
                fn = (res - 2*i)*(res - 2*i) - a;
            }
            else
            {
                fp = (res + 2*i)*(res + 2*i) - a - q2/fp;
                fn = (res - 2*i)*(res - 2*i) - a - q2/fn;
            }
        }
    }
}
```

```
    }  
    f = fp + fn - res*res + a;  
    if(f > 0.)  
    {  
        res -= pas;  
        pas /= 2.;  
    }  
    if(f < 0.)  
    {  
        res += pas;  
        pas /= 2.;  
    }  
    if(f == 0.)  
    {  
        return res;  
    }  
    }  
    return res;  
}
```

C. Publications

Le travail réalisé durant cette thèse a donné lieu à la publication de résultats dans des journaux scientifiques à comité de lecture. Ces articles sont annexés ci-après.

Une partie des résultats présentés dans ce mémoire a fait l'objet d'une publication reproduite ici à l'annexe C.1¹. Les autres publications annexées (annexes C.2² et C.3³) concernent d'autres travaux de recherche auxquels l'auteur de ce mémoire a apporté sa contribution.

¹ European Journal of Mass Spectrometry: : Volume 19 (2013), Pages 141-149

² Journal of The American Society for Mass Spectrometry : Volume 24, Issue 8 (2013), Pages 1271-1279

³ Soumis pour publication au journal Physical Review A

C.1 *Alternative representation for the stability diagram of quadrupole ion traps upon additional quadrupolar excitation¹*

¹ European Journal of Mass Spectrometry: : Volume 19 (2013), Pages 141-149



Alternative representation for the stability diagram of quadrupole ion traps upon additional quadrupolar excitation

Arnaud Vernier,^{a,b} Fabien Chirot,^c Rodolphe Antoine,^a Arnaud Salvador,^c Jean-Philippe Charrier,^b Jerome Lemoine^c and Philippe Dugourd^a

^aUniversité de Lyon, UMR5306, Université Lyon 1, CNRS, France

^bR&D Proteomique, bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France

^cUniversité de Lyon, UMR5280, Université Lyon 1, CNRS, France. E-mail: fabien.chirot@univ-lyon1.fr

We present a combined theoretical and experimental study of the stability of ions in a linear ion trap under the application of one or two auxiliary radiofrequency (RF) fields, in order to perform simultaneous resonant excitation/ejection of several different ions. The influence of the amplitude and frequency of the auxiliary field is addressed through the construction of experimental and theoretical stability diagrams. Theoretical diagrams are constructed using the method developed by Konenkov *et al.* [*J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **13**, 597 (2002)]. We propose a new representation of stability diagrams more adapted to the study of auxiliary excitations than the canonical one. Stability regions are represented as a function of the fundamental RF amplitude and of the relative intensity of the excitation. This representation facilitates the monitoring of the evolution of the mass-selectivity of first- and higher-order resonant excitations in the trap, for which an empirical law is derived. We also show that the relative phase shift between the excitation field and the main driving field has a strong influence on the shape of the diagrams.

Keywords: ion trap, stability diagram, resonant excitation

Introduction

Stability diagrams certainly are the most powerful tool to discuss the motion of ions in radiofrequency (RF) fields and are thus at the basis of the development of new RF based instruments and mass spectrometric analytical strategies.^{1,2} The movement of ions in a pure quadrupolar field is governed by the Mathieu equation, which was solved more than a century ago.³ The trajectory of an ion in the field depends on its mass to charge ratio, on the magnitude of the applied DC and RF potentials, on the frequency of the RF potential and on the geometry of the field application device. The sets of parameters for which the trajectory of an ion in the field does not diverge can be conveniently

represented as regions on a plane, leading to the so called stability diagram.

Beyond the ideal case where the original Mathieu equation does apply, the construction of stability diagrams for real instruments is still challenging⁴ and has thus motivated numerous works.¹ Of particular interest is the problem of the use of auxiliary RF fields, which confer their high flexibility to quadrupole ion traps by allowing, for instance, resonant excitation and ejection of selected ions.⁵ Several theoretical approaches can be adopted to address this issue, ranging from purely numerical to analytical strategies. Based on the resolution of the Laplace equation for the electric field using finite element methods, ion trajectories can be propagated by

numerically solving Newton's equations of motion. The stability of a trajectory can finally be evaluated from an appropriate criterion. The main advantage of such an approach is that it allows one to address the impact of the actual finite geometry of the instrument (for example, possibly including fringe effects) and that it can apply to arbitrary shapes for the electric field. Moreover, the presence of a buffer gas or the influence of the initial velocity distribution or divergence in the ion beam can be accounted for.^{6,7} However, the numerical construction of the diagram requires the calculation of a high number of trajectories, which is highly time consuming.

More general insight in the motion of ions in a trap can be estimated to a good approximation via analytical descriptions, which have the great advantage to provide analytical expressions for trapping or ejection characteristics as a function of geometrical and electrical parameters. The excitation frequency necessary for resonant excitation of an ion of a given mass can be estimated in a good approximation using the pseudopotential model introduced by Major and Dehmelt.⁸ In this frame, ion trajectories under additional excitation can be described as forced harmonic oscillations (and damping can be introduced to account for collisions with a buffer gas). However, this model being valid only near the bottom of the potential well,^{9,10} it is intrinsically not well adapted for the evaluation of the stability of a trajectory and thus not suitable for stability diagram construction. To this end, a general theoretical framework based on a powerful matrix method¹¹ has been adapted by Douglas and Konenkov¹² to the resolution of the Mathieu equation, modified to include an additional excitation field. This method was initially developed for the more general Hill equation that describes the motion of a system under a periodic excitation. It is not fully analytical, but only requires the numerical evaluation of trajectories for two particular solutions of the equation, based on their initial conditions, throughout one period of the electric field. The stability of a trajectory can then be deduced via simple matrix algebra. From this method, it was shown that the application of an auxiliary RF potential in an ion trap modifies the shape of the stability regions. Namely, new islands of stability or instability appear in the stability diagram. In particular, this implies that different ions can be excited/ejected at the same time by judiciously choosing the auxiliary excitation.¹³

Building on these works, we investigated the potentiality of simultaneous ejection of different ions in a linear quadrupole ion trap by the application of one or two auxiliary excitations. Theoretical and experimental stability diagrams have been plotted as a function of the frequency and amplitude of the auxiliary excitation[s]. The usual way to present stability diagrams is in identifying stability regions on a two day plane as a function of the dimensionless parameters q and a related to the amplitudes of the RF and DC fields applied on the trap electrodes, respectively.⁵ In this canonical representation, the influence of an auxiliary RF field can thus be addressed by comparing diagrams for different excitation voltages. In the following we introduce an alternative way for representing the diagrams, more adapted to the problem

of auxiliary fields application. In this case, the stability of ions trajectories depends not only on the canonical a and q parameters, but also on the amplitude of the auxiliary voltage and on its phase relative to the main driving voltage. As a consequence, a complete representation of the stability landscape would be shown as a four dimensional diagram. In order to specifically address the influence of the auxiliary voltage, however, two dimensional cross sections of this four dimensional diagram can be conveniently extracted. Instead of working in the $[a, q]$ plane to build conventional stability diagrams, we use a representation in the $[q, \kappa_1]$ plane, κ_1 being defined as the ratio between the amplitude of the additional excitation voltage and the amplitude of the main driving field. In the $[q, \kappa_1]$ representation, resonant excitations of ions with different m/z appear as instability valleys for each ion species. The shape of these valleys gives insight into the evolution of the mass selectivity of the excitation/ejection as a function of the amplitude of the auxiliary voltage. Evidence for the stabilization of ions below the low mass cut off (LMCO) from the normal operation mode is also shown. Furthermore, this representation allowed us to address the influence of the phase shift between the excitation field and the driving field, which can dramatically alter the diagram. Regarding high order excitations, our results account for the shift pointed by Collings *et al.*¹⁴ between the actual excited mass and the value expected from perturbation theory.¹⁵

Experimental

Experiments were carried out on a 2000 Q Trap (AB Sciex, Framingham, USA). It consists of a series of three quadrupole poles, conventionally denoted Q1, Q2 and Q3. In normal operation mode, Q1 can be used either as a mass filter locked on a selected mass to charge ratio, or ramped to scan across a wide mass range and record a mass spectrum. The second quadrupole pole is operated in RF only mode and filled with a buffer gas.

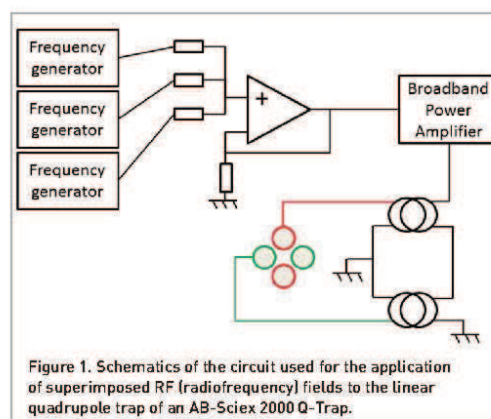


Figure 1. Schematics of the circuit used for the application of superimposed RF (radiofrequency) fields to the linear quadrupole trap of an AB-Sciex 2000 Q-Trap.

It acts as an ion guide or a collision cell. The third quadrupole is used as a linear ion trap through the application of appropriate voltages on its fore and back electrodes. The set up was modified so that the voltages applied to Q3 can be controlled via a home-made device allowing the application of superimposed RF voltages to each rod pair. As depicted in Figure 1, sinusoidal waveforms are generated using frequency generators and mixed through a simple voltage adder. A 2100 L broadband power amplifier (Electronics and Innovation) is used to amplify the signal. The proper adaptation to the impedance of the rods and the π phase shift between the two voltages to be applied is insured by a classical "balun" coil assembly. In this work, up to three RF signals were added: the main RF driving field and two auxiliary fields. The amplitude and frequency of the applied voltages are software controlled and the frequency response of the whole circuit has been carefully evaluated in order to properly compensate for possible distortions in the relative amplitude of the different components of the signal. Note that the different RF waveforms, since generated by different devices, are not phase locked. This has consequences on the stability of the ions in the trap, as discussed below.

The instrument was operated in full scan mode at Q1. In other words, the first quadrupole filter was ramped in order to detect a mass spectrum, with the second quadrupole being used as an ion guide. In this mode, if only the main RF driving voltage is applied to the trap, all ions whose mass to charge ratio lies above the LMCD are transmitted. Full mass spectra can thus be recorded based on the ramp applied on Q1. We used a 900 kHz sinusoidal waveform as the driving voltage with an amplitude of 133 V (to peak V_{0-p}). Given the inscribed radius of the trap being 4.2 mm, the resulting LMCD is at m/z 100. Mass spectra were also recorded while auxiliary voltages were applied to the trap. Experimental stability diagrams were then constructed by comparing the spectra obtained with and without auxiliary voltages. An ion was considered to be destabilized in the trap if the intensity of the corresponding peak in the mass spectrum decreased by more than 99%.

In order to cover a large mass range, we used a polyethylene glycol 600 (PEG600) solution at 0.3 mM in $H_2O:CH_3OH$ 1:1 with 1% (v/v) acetic acid that yields a distribution centered at 548 Th with peaks separated by 44 Da for the monocharged distribution. Alternatively, a mix of three molecules, namely propranolol (m/z 259), nadolol (m/z 309) and acebutolol (m/z 336), was also used. The solutions were sprayed directly in $H_2O:CH_3OH$ 1:1.

Theory of quadrupolar excitation

Equations of motion under the application of an auxiliary RF field

When the electrodes of a quadrupole mass filter (QMF) are subjected to a time periodic potential $\Psi(t)$, the equations of motion for an ion of mass m and number charge z inside the QMF can be expressed as follows:⁵

$$\begin{cases} \frac{d^2x}{dt^2} + \frac{2ez}{mr_0^2} \Psi(t)x = 0 \\ \frac{d^2y}{dt^2} - \frac{2ez}{mr_0^2} \Psi(t)y = 0 \end{cases} \quad (1)$$

where x and y denote the coordinates in the directions of the two rod pairs, e is the elementary charge and r_0 is the radius of the inscribed circle touching the four electrodes. In most instruments, $\Psi(t) = U - V \cos \Omega t$, it is thus convenient to introduce adimensional parameters a and q :

$$\begin{cases} a = \frac{8eU}{(m/z)r_0^2\Omega^2} \\ q = \frac{4eV}{(m/z)r_0^2\Omega^2} \end{cases} \quad (2)$$

If we introduce the adimensional time parameter $\xi = \Omega t/2$, Equation (1) can finally be re-written in a generalized form as:

$$\frac{d^2u}{d\xi^2} + [a_u - 2q_u \cos 2\xi]u = 0 \quad (3)$$

where u stands for either x or y and $a_x = a_y = a$, and $q_x = q_y = q$. This form is that of the well-known Mathieu equation, which has been studied thoroughly.^{16–18} This equation cannot be explicitly solved but an analytical development of the solution can be derived. It arises from the above equations that the stability of the trajectory of an ion in a QMF only depends on the value of the parameters a and q . The (a, q) sets, for which the movement is stable both in the x and y directions, can be conveniently represented as regions of the 2-dimensional (a, q) plane. Such representation is called a stability diagram, or Mathieu diagram.

Let us now examine the case where an additional RF field is applied. If this field has a frequency $\nu_1 \Omega$ (ν_1 , a constant) and a phase shift φ_1 with respect to the main driving voltage, it can be straightforwardly accounted for by modifying the second member of the above equation as follows:

$$\frac{d^2u}{d\xi^2} + \left\{ a_u - 2q_u [\cos 2\xi - \kappa_1 \cos(2\nu_1 \xi + \varphi_1)] \right\} u = 0 \quad (4)$$

Here the parameter κ_1 is defined from the 0 to peak amplitude V_1 of the excitation field as:

$$\kappa_1 = \frac{V_1}{V} \quad (5)$$

Additional auxiliary voltages can be added following the same formalism at frequencies $\nu_i \Omega$ and with amplitudes V_i and phases φ_i , yielding the introduction of parameters $\kappa_i = V_i/V$. In the frame of the present work, up to two auxiliary voltages were added and the trap was operated in the RF only mode ($a=0$). Under these conditions, the equation of movement is of the form:

$$\frac{d^2u}{d\xi^2} - 2q_u \begin{bmatrix} \cos 2\xi - \kappa_1 \cos(2\nu_1 \xi + \varphi_1) \\ \kappa_2 \cos(2\nu_2 \xi + \varphi_2) \end{bmatrix} u = 0 \quad (6)$$

Note that, in this case, if the trap geometry and the main RF field are kept constant, ions with a given mass charge ratio correspond to a unique value of q

Resonant excitation

Parametric resonant excitation of the ion motion via the auxiliary fields can be achieved by choosing appropriate values for the auxiliary field frequencies [i.e. for the ν_i]. The application of Floquet's theorem on Equation (3) yields an expression of the fundamental secular frequency ω for the stable motion of an ion in the absence of auxiliary field as:¹

$$\omega = \frac{\beta\Omega}{2} \quad (7)$$

with β a non integer dimensionless parameter which depends on the Mathieu parameters a and q , and thus on the mass to charge ratio. The value of β can be estimated from the recursion formula:¹⁹

$$\beta^2 = a + \frac{q^2}{(\beta+2)^2 - a - \frac{q^2}{(\beta+4)^2 - a - \frac{q^2}{(\beta+6)^2 - a - \dots}}} + \frac{q^2}{(\beta-2)^2 - a - \frac{q^2}{(\beta-4)^2 - a - \frac{q^2}{(\beta-6)^2 - a - \dots}} \quad (8)$$

The secular frequency corresponding to ions with specific mass to charge ratio can therefore be calculated from the above equations since, in the RF only mode, they correspond to specific values of q and β . The application of an auxiliary field can be accounted for using a perturbative approach,¹⁹ which yields a condition on excitation frequencies $\nu_i\Omega$ that can be used to resonantly excite an ion of secular frequency $\beta\Omega/2$:

$$\nu_1 = \frac{|n+\beta|}{K}, \quad K \in \mathbb{N}^* \text{ and } n \in \mathbb{Z} \quad (9)$$

where K is the order of the resonance.

Resolution and stability

Assuming that the excitation frequencies $\nu_i\Omega$ and the driving frequency Ω are commensurable, i.e. the values of ν_i are rational, the applied electric field [second term of Equation (6)] is periodic. This assumption is not stringent since any frequency ratio to be used in practice can be closely approximated by a rational number. But the fact that Equation (6) is periodic and linear permits one to apply the matrix method described in Reference 12 to question the stability of the trajectories for a given set of parameters $(q, \{\kappa_i\}, \{\nu_i\}, \{\varphi_i\})$.

Let us briefly recall the procedure to evaluate any solution $u(\xi)$ of Equation (6) from the knowledge of two particular solutions of the equation over one period. From the linearity

of the equation, if two linearly independent solutions $u_1(\xi)$ and $u_2(\xi)$ are known, $u(\xi)$ can be expressed as a linear combination of u_1 and u_2 at any time, in particular, if u_1 and u_2 meet initial conditions so that:

$$u_1(0)=1, \frac{du_1}{d\xi}(0)=0 \text{ and } u_2(0)=0, \frac{du_2}{d\xi}(0)=1 \quad (10)$$

The solution with initial conditions (x_0, v_0) is then:

$$u(\xi) = x_0 u_1(\xi) + v_0 u_2(\xi) \quad (11)$$

As the periodicity of the applied potential, $u(\xi)$ can be evaluated at any time if the values for u_1 and u_2 are known for one period. Provided that u_1 and u_2 have been calculated for $0 \leq \xi \leq \pi$, the value of u at any time $\xi = n\pi + \tau$, $n \in \mathbb{N}$ can be expressed as:

$$u(n\pi + \tau) = u(n\pi)u(\tau) + \frac{du}{d\xi}(n\pi)u_2(\tau) \quad (12)$$

As a consequence, the value of u and its derivative at the end of each period can be expressed under matrix form as a function of the initial conditions (x_0, v_0) :

$$\begin{pmatrix} x_n \\ v_n \end{pmatrix} = M_u^n \begin{pmatrix} x_0 \\ v_0 \end{pmatrix} \quad (13)$$

where $x_n = u(n\pi)$ and $v_n = \frac{du}{d\xi}(n\pi)$. M is the so called monodromy or the transfer matrix:

$$M_u = \begin{pmatrix} u_1(\pi) & u_2(\pi) \\ \frac{du_1}{d\xi}(\pi) & \frac{du_2}{d\xi}(\pi) \end{pmatrix} \quad (14)$$

It is clear from Equation (12) that the stability of a solution depends on M . More precisely, if both eigenvalues from M_x and M_y have their modulus smaller than 1, then the solutions do not diverge with time. In practice, since the determinant of M is 1 [this can be readily shown considering u_1 and u_2 are solutions from Equation (6)], the sole evaluation of the trace of the matrix is sufficient to predict if the chosen parameters set yields stable trajectories in the trap. Namely, stability conditions are fulfilled if $|\text{tr}[M_x]| \leq 2$ and $|\text{tr}[M_y]| \leq 2$.

Theoretical diagram construction

Based on the above results, theoretical stability diagrams were constructed point by point by propagating u_1 and u_2 for different sets of parameters $(q, \{\kappa_i\}, \{\nu_i\}, \{\varphi_i\})$ over one period of the RF potential. This was done using Euler's method, and the accuracy of the results was tested against the fact that the determinant of M is 1. Finally, the stability or instability associated with the considered parameter set was evaluated based on the trace of the corresponding monodromy matrix.

Results and discussion

Theoretical stability diagrams calculated for a single excitation at $\nu_1 = 1/3$ are presented in Figure 2. The dark regions

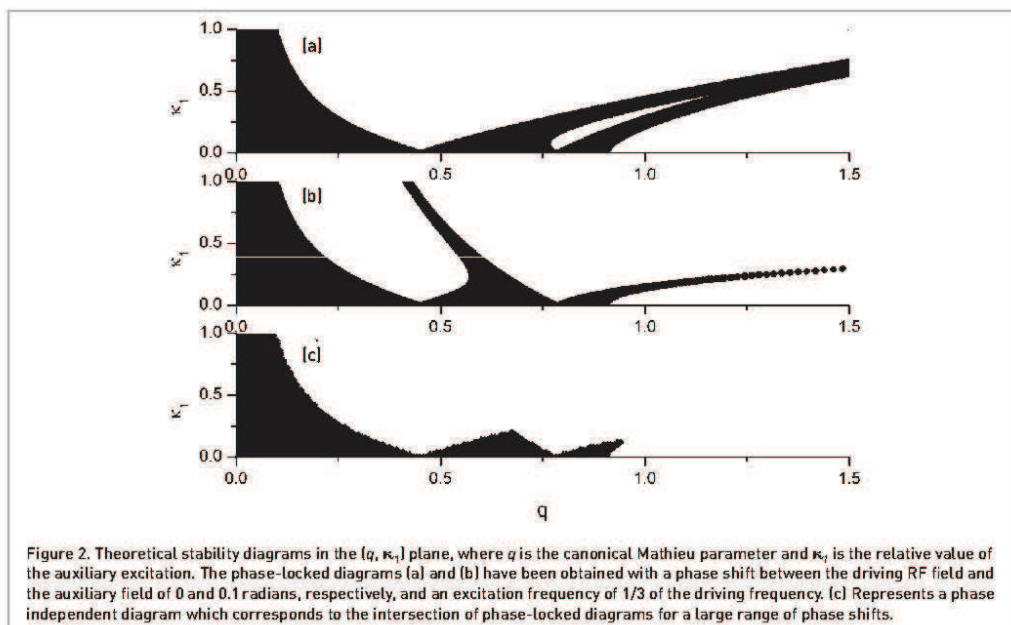


Figure 2. Theoretical stability diagrams in the (q, κ_1) plane, where q is the canonical Mathieu parameter and κ_1 is the relative value of the auxiliary excitation. The phase-locked diagrams (a) and (b) have been obtained with a phase shift between the driving RF field and the auxiliary field of 0 and 0.1 radians, respectively, and an excitation frequency of $1/3$ of the driving frequency. (c) Represents a phase independent diagram which corresponds to the intersection of phase-locked diagrams for a large range of phase shifts.

correspond to values of q and κ_1 for which stability conditions are fulfilled. Since q depends on m/z , the q scale can also be read as an inverted mass scale; the highest values of q corresponding to ions with the smallest mass to charge ratio. On the other hand, the κ_1 axis only represents the amplitude of the excitation. This representation is therefore particularly well suited to address the influence of excitation on the stability of ions as a function of their mass to charge ratio.

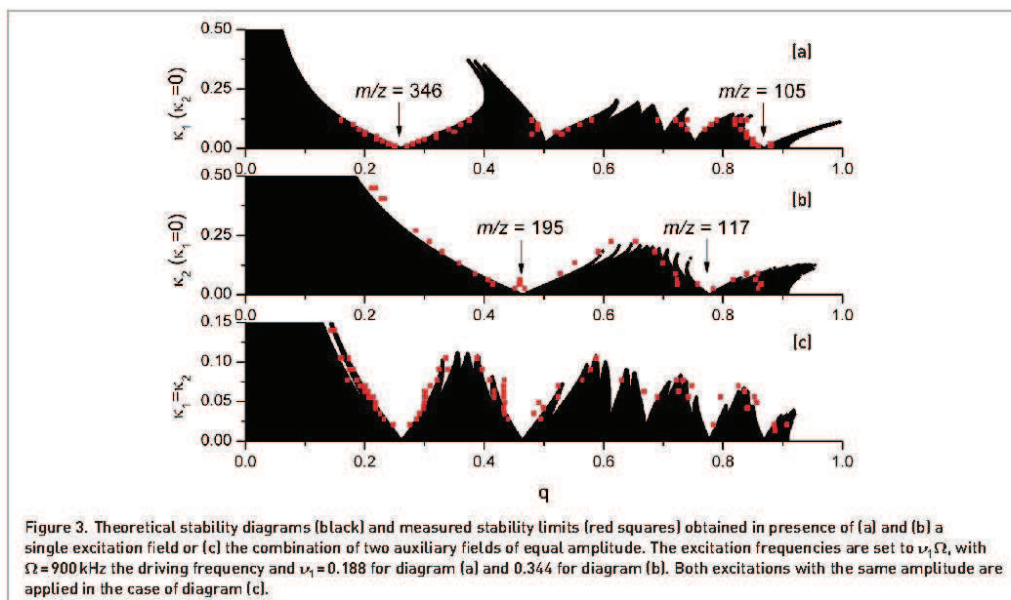
The top two panels of Figure 2 display results for different values of the phase shift φ_1 between the two applied voltages. If we first focus on the bases of the diagrams (low excitation), similar behavior is observed in both cases. First, when no excitation is applied, ions for which $q < 0.908$ are found to be stable in the trap, which corresponds to the well known LMCD for quadrupole filters when used in RF only mode.

When κ_1 is slightly increased, a similar trend is visible in both diagrams. On the one hand, destabilization is observed for ions corresponding to $q = 0.451$ and $q = 0.785$. These values correspond to the first order resonant excitation as predicted by Equation (9), where $K = 1$ and $n = 0$ or 1 , respectively. Note that the first order excitations for other values of n would correspond to values of q that fall out of the first stability region studied here. On the other hand, ions with $q > 0.908$ are stabilized. Such an effect was already reported by Konenkov et al.²⁰ It appears that increasing κ_1 leads to stabilization for higher values of q , i.e. lower m/z below the LMCD.

The trends described in the latter paragraph (resonant destabilization and stabilization of m/z below the LMCD)

appear in the same region of the diagram, independent of the phase shift φ_1 of the excitation voltage relative to the driving voltage, as expected in the frame of the perturbation theory.¹⁵ However, if the amplitude of the excitation voltage is increased ($\kappa_1 \approx 0.02$), different values of φ_1 yield completely different diagrams. Such an influence of phase shift has never been reported to our knowledge. In previous works, the investigated values of κ_1 were small enough so that phase effects would not have been discernible. We could not investigate this effect experimentally since the different RF signals applied to our set up are not phase locked. In order to produce stability diagrams adapted to these experimental conditions, we constructed phase independent diagrams by considering the intersection of the stability regions of different phase locked diagrams. More precisely, phase locked diagrams were calculated for different phase shifts φ_1 in the range $0 < \varphi_1 < 2\pi$. The stability region of the phase independent diagram was then constructed from the (q, κ_1) points that are common to all the phase locked diagrams. The phase independent diagram obtained for $\nu_1 = 1/3$ is displayed in Figure 2(c) and shows stable regions only for the smallest values of κ_1 . As already visible in Figures 2(a) and 2(b), the effect of the phase shift is more pronounced for large values of q , which corresponds to ions with lower mass to charge ratio. This can be understood in terms of the higher sensitivity of these ions to the RF fields.

Theoretical phase independent diagrams are compared to experimental measurements in Figure 3 for different excitation conditions. The main driving frequency used for the experiment



was set to $\Omega=900$ kHz, with an amplitude $V=133 V_{0-p}$, which corresponds to an LMCD at $q=0.908$ of m/z 100. Experimental evaluation of the stability regions was done by systematically recording mass spectra for PEG600 as a function of the excitation amplitude in the case of a constant RF only driving voltage applied to the trap. The experimental data points correspond to the limits of stability for each ion visible in the mass spectrum. Namely, the abscissa of a point represents the value of q associated with the mass to charge ratio of the corresponding ion and the ordinate is the value of κ_1 for which this ion disappears. Several points can then be associated with the same mass to charge ratio if an ion is found to be destabilized and re-stabilized as κ_1 increases.

Figures 3(a) and 3(b) represents experimental and theoretical stability diagrams with a single excitation at frequency $\nu_1=0.188$ and 0.344 , respectively. According to Equation (9), this corresponds to the first order resonant excitations of ions with m/z 346 and m/z 105 (for $n=0$ and 1 , respectively) for the first value of ν_1 and m/z 195 and m/z 117 (for $n=0$ and 1 , respectively) for the second value of ν_1 . In both cases, the experimental and theoretical stability limits are in good agreement. In particular, the destabilization of the selected ions is well reproduced by the theory. This was checked systematically through the available mass range by measuring the mass to charge ratio of the depleted ion as a function of the excitation frequency together with the theoretical prediction from Equation (9), as represented in Figure 4(b).

Also well reproduced is the broadening of the destabilization region as κ_1 increases, which appears as unstable "valleys"

using the present representation. The width of the valleys is an important issue if one considers potential applications of resonant excitations for the simultaneous ejection or collisional activation of ions with different selected masses. We calculated the width Δm of the valley for different selected mass to charge ranging from 100 Th to 1100 Th. The value of Δm was extracted through a linear regression near the bottom of the valley ($\kappa_1=0$). We derived an excitation width parameter $\sigma=\Delta m/\kappa_1 m$ that accounts for the mass selectivity of the excitation across the mass range for small values of κ_1 . In other words, a high value of σ corresponds to a low mass selectivity. As displayed in Figure 4(a), the selectivity is more important for the smallest values of m/z . The width parameter σ is found to scale linearly with the mass to charge ratio as:

$$\sigma = 2.761 \frac{m/z}{LMCO} - 0.978 \quad (15)$$

As emphasized in the insert of Figure 4(a), this relation fails close enough to the LMCD at $q=0.908$ [corresponding to m/z 100 under the present conditions]. Indeed, at the limit where the excited mass equals the LMCD, the corresponding excitation frequency diverges, as visible in Figure 4(b), and the present model is certainly no more valid.

The diagrams in Figure 3 also allow one to address the stability behavior of the ion trap as the amplitude of the excitation increases. For $\kappa_1 > 0.02$, other instability valleys appear on both the theoretical and the experimental diagrams. This is particularly clear in Figure 3(c) for $q=0.52$ (m/z 175) and $q=0.76$ (m/z 119), which correspond to second order

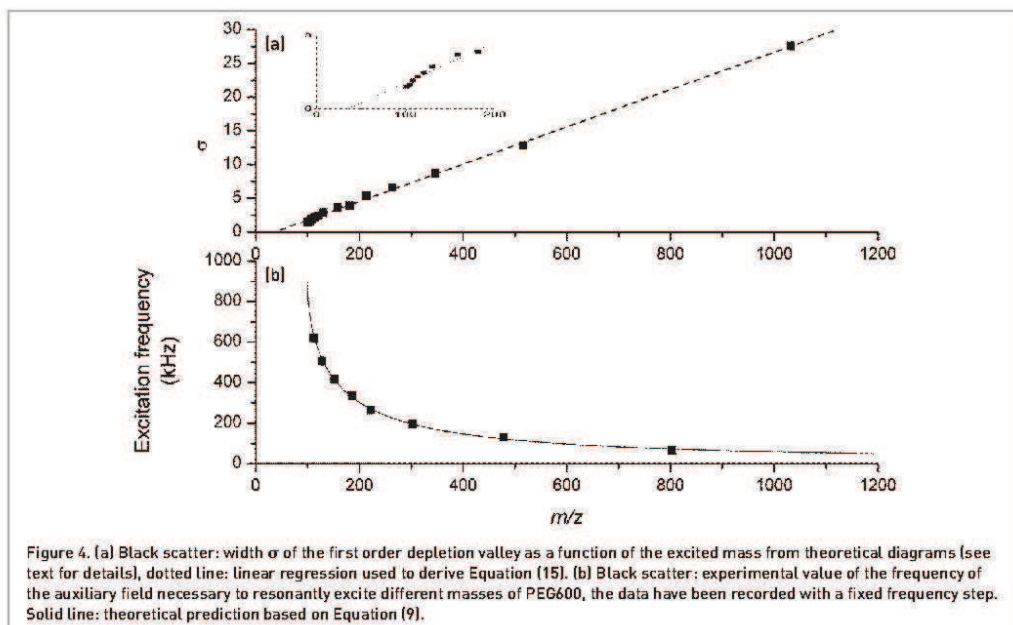


Figure 4. (a) Black scatter: width σ of the first order depletion valley as a function of the excited mass from theoretical diagrams (see text for details), dotted line: linear regression used to derive Equation (15). (b) Black scatter: experimental value of the frequency of the auxiliary field necessary to resonantly excite different masses of PEG600, the data have been recorded with a fixed frequency step. Solid line: theoretical prediction based on Equation (9).

resonant excitations. Third order excitation yield valleys arise at $q=0.591$ (m/z 154) and $q=0.7$ (m/z 130) for even higher values of κ_1 . However, the values of q at which these higher order excitations appear are slightly shifted from the ones predicted by Equation (9). For instance, in the case of the third order excitations, Equation (9) would yield $q_{th}=0.615$ and 0.728 for $K=3$ and $n=1$ and 0 , respectively. The present values both in the theory and in the experiment are then shifted by about 4%. A smaller shift (0.1%) may also be present for 2nd order excitations. The existence of such a shift was already pointed out in Reference 14. It originates from the fact that the expression of the β parameter used in Equation (9) only depends on the canonical Mathieu parameters a and q , but not on the auxiliary field. If the effect of the auxiliary field on the value of β is negligible at the arbitrarily low κ_1 necessary to obtain the first order excitations, it is obviously no more the case, at least above the second order.

Fringes that are visible on the theoretical diagrams of Figure 3 for even higher values of κ_1 can be interpreted as higher order excitations but were not possible to capture in the experiments due to their sharpness not being compatible with the mass comb available with the polymer used. For the extreme values of q (low and high m/z values) no experimental data could be recorded due to the transmission limitation of the first quadrupole, in the low mass range and to the decrease of the ion signal in the high mass range. This prevented us from addressing the stabilization of ions below the mass cut off that is predicted by the theory.

The excitation frequencies used to obtain Figures 3(a) and 3(b) were combined to produce the diagrams in Figure 3(c), which thus corresponds to the simultaneous application of the two excitation fields. For the sake of simplicity, the amplitude used for the two auxiliary voltages was set to the same value ($\kappa_1=\kappa_2$). This allows more straightforward comparison of the three diagrams that are all plotted in the $[q, \kappa_1]$ plane.

In the two excitations diagram, satisfactory agreement is obtained between the theory and the experiment since the main features are present in both cases. The four deepest valleys visible on the diagram correspond to first order excitations of the same masses as when each of the excitation fields is applied separately. In the low excitation limit, the two excitation diagram can thus be reasonably approximated by the intersection of the corresponding two mono excitation diagrams. Indeed, the effect of the excitation fields in this case is small enough not to affect the stability of ions lying far from the resonantly excited masses. More complex behavior arises when the value of κ_1 is increased. In this case, second order excitation at each individual auxiliary frequency is still visible. Note that the masses for which these excitations appear is shifted from the theoretical predictions as already mentioned in the case of a single excitation. Interestingly, the amplitude of the shift does not appear significantly higher when two excitations are applied. In addition, other valleys are visible that may arise from the interplay between the two applied frequencies. A detailed interpretation of this phenomenon would require the development of theoretical methods

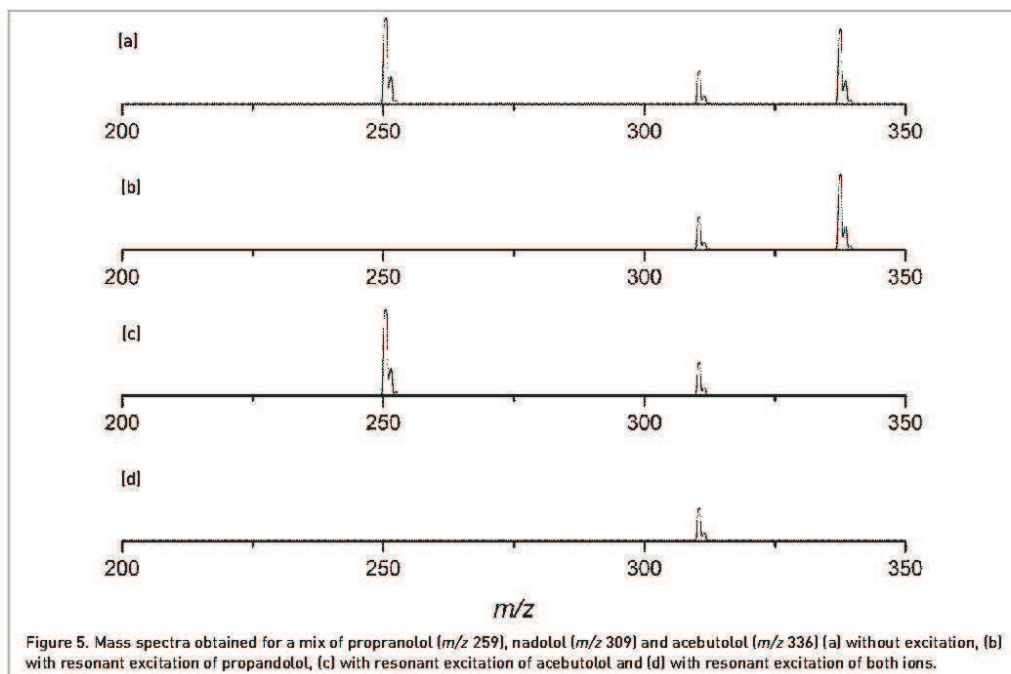


Figure 5. Mass spectra obtained for a mix of propranolol (m/z 259), nadolol (m/z 309) and acebutolol (m/z 336) (a) without excitation, (b) with resonant excitation of propranolol, (c) with resonant excitation of acebutolol and (d) with resonant excitation of both ions.

more adapted than the perturbative framework developed in Reference 15 to account for several perturbations of similar amplitudes, which lies out of the range of the present paper. Nevertheless the present (q, κ_i) diagrams can be of help to predict the maximum excitation amplitude below which the effects of the different auxiliary fields can be considered separately. In the case presented in Figure 3, if $\kappa_i < 0.02$, the two excitations diagram can be well approximated by the superposition of the individual mono excitation diagrams. Note that this limit approximately matches the threshold for the apparition of second order excitations. Consequently, in this regime, only ions whose secular frequency, as calculated using Equation [9], which correspond to one of the applied auxiliary RF frequencies, are actually excited. Moreover, the mass selectivity of the excitations can be estimated using the empirical Relation 15.

A simple example of simultaneous ejection of ions with two distinct mass to charge ratios is given in Figure 5. The full mass spectrum in the absence of excitation is represented in Figure 5(a). Three peaks are visible at m/z 259, m/z 309 and m/z 336 corresponding to the singly charged ions of propranolol, nadolol and acebutolol, respectively. The peak at m/z 259 can be completely removed from the mass spectrum using an auxiliary RF field of amplitude $0.5V_{0-p}$ and frequency 228.78 kHz, as presented in Figure 5(b). Note that the relative amplitude of the other peaks is not modified. Similarly, the

application of a $0.5V_{0-p}$ RF field at 174.42 kHz yields the spectrum of Figure 5(c), where the peak at m/z 336 has completely disappeared. Finally, simultaneous application of the above two fields results in the simultaneous resonant ejection of ions at m/z 259 and m/z 336 [Figure 5(d)].

This simple example illustrates how simultaneous excitation of ions with different mass to charge ratios can be achieved in a quadrupole ion trap by the application of several auxiliary voltages. Potential applications of this method include selective activation of different ions at the same time, but could also be used to simultaneously detect ions with different masses as described in Reference 21, which would save time in MRM like processes, for instance.

Conclusion

We have proposed an alternative way of representing stability diagrams that allows visualization of the influence of one or several auxiliary RF voltages on the stability of ion trajectories in a quadrupole ion trap. Using this framework, evidence for the influence of the phase shift between the applied voltages on trajectory stability was found, which could potentially be exploited in ion trap operation.

In the case where multiple auxiliary voltages are simultaneously applied, we showed that the resulting stability

diagram is more complex than the superposition of the stability diagrams for each individual voltage. The diagram representation proposed here allows one to quantitatively determine the domain in which the amplitude of the auxiliary voltages is low enough for only first order excitations to occur. In this domain, the relation between the frequency of the excitation voltage and the m/z of the excited ions is simple and can be estimated from a perturbative approach.¹⁹ Moreover, an empirical relation was derived to predict the mass selectivity of the excitation in this low excitation domain.

References

1. R.E. March, "Quadrupole ion traps", *Mass Spectrom. Rev.* **28**(6), 961 (2009). doi: [10.1002/mas.20250](https://doi.org/10.1002/mas.20250)
2. D.J. Douglas, A.J. Frank and D. Mao, "Linear quadrupoles in mass spectrometry", *Mass Spectrom. Rev.* **28**(6), 937 (2009). doi: [10.1002/mas.20249](https://doi.org/10.1002/mas.20249)
3. C. Floquet, "Sur les équations différentielles linéaires à coefficients périodiques", *Ann. Sci. École Norm. Supérieure* **12**, 47 (1883).
4. M. Sudakov and M. Apatskaya, "Perturbation theory for ion motion in quadrupole radio frequency field", *Int. J. Mass Spectrom.* **325**, 58 (2012). doi: [10.1016/j.ijms.2012.07.019](https://doi.org/10.1016/j.ijms.2012.07.019)
5. J.F.J. Todd and R.E. March, "Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry, 2nd Edn. Wiley Interscience, New York, USA (2005).
6. A.D. Appelhans and D.A. Dahl, "SIMION ion optics simulations at atmospheric pressure", *Int. J. Mass Spectrom.* **244**, 1 (2005). doi: [10.1016/j.ijms.2005.03.010](https://doi.org/10.1016/j.ijms.2005.03.010)
7. F. Albrieux, R. Antoine and F. Chirôt, "Ion trajectory simulations in a high pressure cylindrical ion trap", *Eur. J. Mass Spectrom.* **16**, 557 (2010). doi: [10.1255/ejms.1098](https://doi.org/10.1255/ejms.1098)
8. F. Major and H. Dehmelt, "Exchange collision technique for the RF spectroscopy of stored ions", *Phys. Rev.* **170**, 91 (1968). doi: [10.1103/PhysRev.170.91](https://doi.org/10.1103/PhysRev.170.91)
9. N.S. Arnold, C. Hars and H.L.C. Meuzelaar, "Extended theoretical considerations for mass resolution in the resonance ejection mode of quadrupole ion trap mass spectrometry", *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **5**, 676 (1994). doi: [10.1016/1044-0305\(94\)85008-9](https://doi.org/10.1016/1044-0305(94)85008-9)
10. D. Goeringer, W. Whitten, J. Ramsey, S. McLuckey and G. Glish, "Theory of high resolution mass spectrometry achieved via resonance ejection in the quadrupole ion trap", *Anal. Chem.* **64**, 1434 (1992). doi: [10.1021/ac00037a023](https://doi.org/10.1021/ac00037a023)
11. L.A. Pipes, "Matrix solution of equations of the Mathieu Hill type", *J. Appl. Phys.* **24**, 902 (1953). doi: [10.1063/1.1721400](https://doi.org/10.1063/1.1721400)
12. N.V. Konenkov, M. Sudakov and D.J. Douglas, "Matrix methods for the calculation of stability diagrams in quadrupole mass spectrometry", *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **13**(6), 597 (2002). doi: [10.1016/S1044-0305\(02\)00365-3](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(02)00365-3)
13. X. Zhao, Z. Xiao and D.J. Douglas, "Mass analysis with islands of stability with linear quadrupoles incorporating higher order multipole fields", *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **21**(3), 393 (2010). doi: [10.1016/j.jasms.2009.11.002](https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.11.002)
14. B.A. Collings, M. Sudakov and F.A. Londry, "Resonance shifts in the excitation of the $n=0$, $K=1$ to 6 quadrupolar resonances for ions confined in a linear ion trap", *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **13**(5), 577 (2002). doi: [10.1016/S1044-0305\(02\)00361-6](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(02)00361-6)
15. M. Sudakov, N. Konenkov, D.J. Douglas and T. Glebova, "Excitation frequencies of ions confined in a quadrupole field with quadrupole excitation", *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **11**(1), 10 (2000). doi: [10.1016/S1044-0305\(99\)00111-7](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(99)00111-7)
16. W. Paul and M. Raether, "Das elektrische Massenfilter", *Z. Phys. Hadrons Nucl.* **140**, 262 (1955). doi: [10.1007/BF01328923](https://doi.org/10.1007/BF01328923)
17. R.F. Wuerker, H. Shelton and R.V. Langmuir, "Electrodynamic containment of charged particles", *J. Appl. Phys.* **30**, 342 (1959). doi: [10.1063/1.1735165](https://doi.org/10.1063/1.1735165)
18. M. Baril, "Etude des propriétés fondamentales de l'équation de Hill pour le dessin de filtre quadrupolaire", *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **35**, 179 (1980). doi: [10.1016/0020-7381\(80\)85039-X](https://doi.org/10.1016/0020-7381(80)85039-X)
19. R.E. March, A.W. McMahon, F.A. Londry, R.L. Alfred, J.F.J. Todd and F. Vedel, "Resonance excitation of ions stored in a quadrupole ion trap. Part 1. A simulation study", *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **95**, 119 (1989). doi: [10.1016/0168-1176\(89\)83037-X](https://doi.org/10.1016/0168-1176(89)83037-X)
20. N. Konenkov, L. Cousins, V. Baranov and M. Sudakov, "Quadrupole mass filter operation with auxiliary quadrupolar excitation: theory and experiment", *Int. J. Mass Spectrom.* **208**, 17 (2001). doi: [10.1016/S1387-3806\(01\)00375-X](https://doi.org/10.1016/S1387-3806(01)00375-X)
21. J. Lemoine, A. Salvador, J. P. Charrier, T. Fortin and P. Dugourd, "Method for detecting molecules through mass spectrometry", Patent No. *Wo* (2011)/0363 78.

C.2 Vacuum Ultraviolet Action Spectroscopy of Polysaccharides¹

L'article reproduit ci-après présente les résultats de l'étude de plusieurs oligosides par spectroscopie d'action dans la gamme 7 – 18 eV (69 nm à 177 nm). La densité d'ions dans un piège ionique étant notoirement insuffisante pour utiliser la spectroscopie d'absorption classique (mesure de l'extinction du faisceau transmis), la spectroscopie d'action utilise la mesure du taux de modifications structurales (via le taux de photo-fragmentation ou le taux de photo-détachement, mesurables par spectrométrie de masse) dues à l'action des photons incidents sur les ions piégés pour remonter au spectre d'absorption de ceux-ci. La spectroscopie d'action permet donc d'obtenir des informations sur la structure électronique des ions, éventuellement en lien avec les calculs effectués sur leur géométrie. Ici cette technique a été appliquée à deux groupes de sucres :

- Le premier groupe est constitué de trois oligosaccharides $\alpha(1 \rightarrow 4)$ de même unité monomérique (du D-glucose) mais de tailles différentes (un diholoside : le maltose, un tétraholoside : le maltotetraose et un hexaholoside : le maltohexaose) ;
- Le second groupe est quant à lui constitué de deux oligosaccharides isomériques (le raffinose et le mélézitose).

L'utilisation de sources de lumières dans l'ultraviolet lointain est rendu nécessaire par le fait que les oligosaccharides n'absorbent pas dans le proche UV. Cette difficulté rendant impossible l'usage de sources LASER conventionnelles, les expérimentations ont été menées sur la ligne DESIRS du synchrotron SOLEIL (Gif-sur-Yvette, France).

Les spectres d'action réalisés sur les sucres du premier groupe (plus précisément sur les anions simplement déprotonés correspondant) ont permis de mettre en évidence un effet de la taille de l'oligosaccharide sur sa réponse optique : à basse énergie (jusqu'à 15 eV) chaque unité monomérique apporte sa contribution au spectre optique indépendamment des autres. En revanche à plus haute énergie des couplages électroniques intramoléculaires diminuent le taux de photo-détachement d'électron et donc la réponse optique des sucres. Ces spectres sont en bon accord avec les spectres obtenus par un calcul théorique en TD-DFT².

L'étude des spectres d'action et des voies de fragmentations des sucres du second groupe (plus précisément de leurs adduits sodiatés) a permis de montrer que l'irradiation à 16 eV permettait de générer des fragments caractéristiques tant de la structure de chaque unité monomérique (glucose, fructose et galactose ici) que des liaisons entre ces unités. Ainsi la spectroscopie d'action dans l'ultraviolet lointain permet une caractérisation structurale des holosides et une différenciation entre espèces isomériques.

¹ Journal of The American Society for Mass Spectrometry : Volume 24, Issue 8 (2013), Pages 1271-1279

² Time-Dependent Density Functional Theory



RESEARCH ARTICLE

Vacuum Ultraviolet Action Spectroscopy of Polysaccharides

Quentin Enjalbert,^{1,2,3} Claire Brunet,^{1,2} Arnaud Vernier,^{1,2,3,4} Abdul-Rahman Allouche,^{1,2} Rodolphe Antoine,^{1,2} Philippe Dugourd,^{1,2} Jérôme Lemoine,^{1,3} Alexandre Giuliani,^{5,6} Laurent Nahon⁵

¹Université Lyon 1-CNRS, Université de Lyon, 69622 Villeurbanne cedex, France

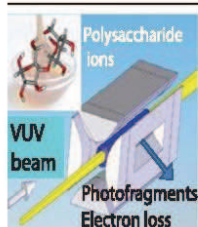
²UMR5306, Institut Lumière Matière, Villeurbanne, France

³UMR5180, Sciences Analytiques, Villeurbanne, France

⁴R&D Proteomique, bioMérieux SA, 69280 Marcy l'Etoile, France

⁵SOLEIL, l'Orme des Merisiers, St Aubin, BP48, 91192 Gif sur Yvette Cedex, France

⁶UARI008, Cepia, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), BP 71627, 44316 Nantes Cedex 3, France



Abstract. We studied the optical properties of gas-phase polysaccharides (maltose, maltotetraose, and maltohexaose) ions by action spectroscopy using the coupling between a quadrupole ion trap and a vacuum ultraviolet (VUV) beamline at the SOLEIL synchrotron radiation facility (France) in the 7 to 18 eV range. The spectra provide unique benchmarks for evaluation of theoretical data on electronic transitions of model carbohydrates in the VUV range. The effects of the nature of the charge held by polysaccharide ions on the relaxation processes were also explored. Finally the effect of isomerization of polysaccharides (with melezitose and raffinose) on their photofragmentation with VUV photons is presented.

Key words: Vacuum ultraviolet, Spectroscopy, Polysaccharides, Gas phase, Fragmentation, Mass spectrometry

Received: 11 March 2013/Revised: 25 April 2013/Accepted: 25 April 2013/Published online: 31 May 2013

Introduction

Plant and bacterial polysaccharides are the most abundant natural biopolymers and are of great commercial interest [1, 2]. Polysaccharides are widely diffused in the biosphere and play essential functions as energy reserve substances, structural elements, signaling molecules, or water-binding elements, and so on. At the molecular level, they display such structural and conformational complexity that the combination of several physico-chemical techniques is usually required for extensive structural characterization [3, 4].

Of the various experimental techniques applicable to the study of polysaccharide conformation, optical spectroscopy

has been limited by the relatively high energy of electronic excitations onsets, the first excitation in unsubstituted saccharides lying in the vacuum ultraviolet (VUV) region. However, the high-flux and tuneable VUV photon sources provided by synchrotron radiation facility have allowed the measurement of ionization energy [5] and the direct observation of chiroptical properties of sugars in the near VUV down to 160 nm (7.75 eV) [6–12]. The information content in the VUV region is important since the VUV circular dichroism (CD) bands strongly depend on the monosaccharides' nature, glycosidic linkages, and anomeric configurations. VUV absorption spectra of several model neutral sugar compounds in the gas phase (alcohols, ethers, complex cyclic compounds) were measured up to 9.9 eV [13]. All spectra showed broad absorption bands in the 6.2 to 8.1 eV energy range. The absorption spectrum of glucose was predicted, though not measured by combining the spectra of individual subunits. In parallel, an elegant laser-based strategy has been developed by Simons and co-workers using gas-phase phenyl-substituted polysaccharides [14], the conformations of which were investigated by

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s13361-013-0657-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Correspondence to: Rodolphe Antoine; e-mail: rodolphe.antoine@univ-lyon1.fr

means of a combination of mass-selected, conformer-specific ultraviolet and infrared double resonance hole-burning spectroscopy experiments, and ab initio quantum chemistry calculations. Characteristic vibrational signatures associated with OH (and NH) stretching modes are particularly informative about molecular structures since they are extremely sensitive to the local hydrogen-bonded environment [15]. Note that in solution, the measurement of spectra in the VUV range is severely limited by the solvent absorption cut-off.

Another interesting feature opened by the use of VUV photons is to induce photofragmentation for structural characterization of sugars. This field was pioneered and thoroughly explored by Reilly and co-workers [16]. Extensive cross-ring fragmentation was observed after irradiation of VUV photons at the fixed wavelength of 157 nm for Girard's T-derivatized maltoheptaose [17] and more complex oligosaccharides at 157 and 193 nm [18–20]. However, lack of vacuum ultraviolet spectroscopic data with a tunable photon source on polysaccharides made it difficult to predict which chromophore might be excited and, therefore, whether photodissociation would provide a wealth of informative fragmentations depending on the nature of the sugar. Recently, action spectroscopy measuring electron photodetachment from biomolecular anions proved to be a powerful tool for measuring optical spectra of entire proteins [21] as well as of acidic sugars [22–24] in the visible and UV ranges. The coupling of ion trap mass spectrometers with synchrotron radiation (SR) allowed us to push the limit of spectroscopy towards the VUV range for radical peptides and proteins anions [25, 26]. In this paper, we investigate the optical properties of unsubstituted polysaccharides in the VUV range by action spectroscopy. In particular, we explore the effects of size, charge, and glycosidic linkage on the photofragmentation spectra of polysaccharides.

Experimental

Oligosaccharides were obtained from Dextra Laboratories (Reading, UK) and dissolved at a concentration of 100 μM in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (50:50, vol/vol). Samples were introduced by electrospray ionization and were infused at a flow rate of 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ using a syringe pump.

The experimental setup consists of a mass spectrometer coupled to a synchrotron radiation (SR) source. A commercial linear quadrupole ion trap mass spectrometer (Thermo Finnigan LTQ XL, San Jose, CA, USA) equipped with an electrospray ionization (ESI) source has been modified [27, 28]. The synchrotron beam was sent directly into the trap from the backside. The set-up was connected to the VUV beamline DESIRS [29] of the SOLEIL storage ring in St. Aubin (France). The photons were emitted by an electromagnetic undulator that provides tunable radiation in the 5 to 40 eV energy range. The wavelength was selected and scanned simultaneously with the undulator peak energy by

a 6.65 m-long normal incidence monochromator equipped with a low dispersion (200 g/mm) grating providing a high photon flux of the order of 10^{12} – 10^{13} photons/s over the scanned energy range (7–18 eV), within a photon bandwidth of typically 12 meV at 10 eV photon energy using a 200 μm exit slit. High harmonics of the undulator that could be transmitted by the grating's diffraction high orders were suppressed owing a gas filter [30] filled with Xenon (7–9.3 eV) or Argon (8–16 eV) insuring an harmonic-free radiation over the whole studied spectral range. A photon beam shutter, able to achieve short (~ 1 ms) and reproducible irradiation duration under high-vacuum conditions, was used to synchronize the SR irradiation with the trapping of the ions [31]. To perform SR irradiation for a given time duration (typically 400 ms), we added in the ion trap rf sequence a MS^n step with activation amplitude of 0 %, during which the shutter located on the SR beam was opened.

In the VUV photodissociation (VUVPD) experiments, precursor ions were first isolated in the trap. After isolation, they were irradiated for 400 ms and the resulting mass spectrum was recorded. An action spectrum is obtained by measuring the yield of fragmentation (σ_f) as a function of the SR photon energy ($\sigma_f = \ln(\text{parent} + \Sigma \text{frag})/\text{parent}/\phi$), where ϕ is the photon flux, "parent" is the intensity of the parent peak and " Σ frag" represents the total intensity of the photofragment peaks. For mono deprotonated oligosaccharides, after VUV irradiation, the ion signal is depleted due to electron detachment from the parent ion, which results in a neutral molecule that is not detected (*vide infra*). We recorded alternatively mass spectra with and without SR irradiation; 50 spectra with and 50 spectra without SR were recorded and summed at each wavelength. For mono deprotonated oligosaccharide, the depletion yield (σ_d) was measured as a function of the SR wavelength ($\sigma_d = \ln(I_0/I)/\phi$), where I_0 and I are the intensities of the parent signal without and with light irradiation, respectively, ϕ stands for the photon flux. Due to signal fluctuation, (I_0/I) ratio lower than ~ 1.1 cannot be measured with our current set-up. The photon flux was measured by an International Radiation Detector (AXUV100) Silicon VUV photodiode, which has been calibrated with respect to an absolute secondary etalon (itself calibrated at the Physikalisch-Technische Bundesanstalt, BESSY, Berlin, Germany versus a primary etalon). The flux calibration error bars are in the 10 % range. Complementary experiments in the UV range (4 to 5.7 eV) were performed in Lyon using a modified linear quadrupole ion trap mass spectrometer (LTQ, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) [32] coupled to a UV tunable optical parametric oscillator (OPO) laser [33, 34]. In this latter case, an irradiation time of 5000 ms (50 laser shots) was used. The activation q value was set to 0.250 for UVPD and VUVPD. The isolation width to select the ion precursors was 3 Da. A total of 50 microscans were averaged to produce a spectrum.

Theory

Search of Structures

The deprotonated maltose molecule was investigated theoretically, as a model system. The conformational search was done by molecular dynamics calculations using the PM6-DH+ semi-empirical potential, followed by a geometry optimization using the same semi-empirical method. According to pKa values of sugars, the deprotonation site was chosen on the primary alcohol of the reducing-end of glucose. Finally, a density functional theory (DFT) geometry optimization was done. The semi-empirical PM6-DH+ potential [35, 36] was chosen for its good chemical accuracy, especially for hydrogen-bonding interactions. Indeed, the polysaccharides are very rich in OH groups and, at low temperature, hydrogen bonds can be formed to give rise to stabilization of the structure. Molecular dynamics calculation was performed using the Velocity Verlet algorithm [37] and Bussi thermostat starting from an arbitrary locally optimized initial structure [38]. The simulation time was 20 ps (10 ps for equilibrium and 10 ps for the production), the time step was 0.5 fs, and the temperature was 2000 K (the high temperature was chosen to provide an exhaustive exploration of the potential energy surface). We selected 100 geometries at regular time intervals during the production steps of the simulation. At the end of the molecular dynamic simulation, the selected geometries were optimized using the PM6-DH+ semi-empirical method. Similar geometries were removed (two geometries are considered similar if the difference between their energies is less than 0.1 kcal/mol and the difference between their bond lengths less than 0.1 angstrom including non-bonded atoms). After this, the optimized geometries were reoptimized using the B3LYP/6-31+G* and wB97XD/6-31G* levels. Finally all these geometries (about 20 geometries) were optimized using the B3LYP/aug-cc-pvdz [39–43] and wB97XD/aug-cc-pvdz levels [42–44]. The most stable structure predicted by B3LYP functional was found to be close to that predicted by wB97XD method.

Optical Spectra

Absorption spectra were calculated for the most stable geometry, calculated at B3LYP/aug-cc-pvdz level, for the deprotonated maltose molecule from time dependent density functional method (TD-DFT) using LC-wPBE functional [45] with the aug-cc-pvdz basis set [42, 43] (300 states were included in TD-DFT calculation).

Results and Discussion

We investigated the optical properties of unsubstituted polysaccharides in the VUV range by action spectroscopy. This section is divided in three parts and explores the effects of size, charge, and glycosidic linkage on the action spectroscopy of polysaccharides.

Size Effect

Maltose, maltotetraose, and maltohexaose (see Scheme 1), correspond to di-, tetra-, and hexa-linear polymers of glucose unit all linked by alpha 1-4 glycosidic bonds.

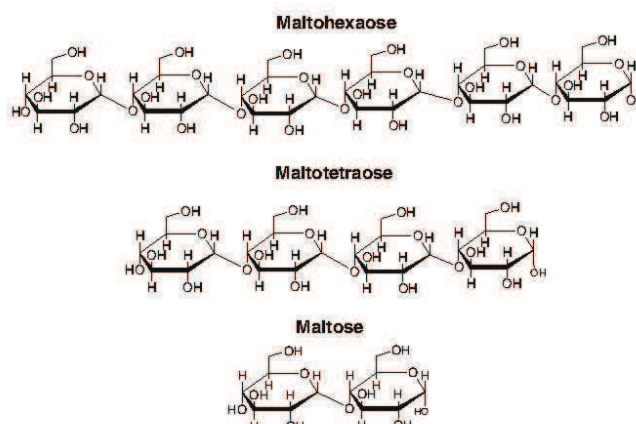
For the three singly negatively charged oligosaccharides, the ion signal is depleted after VUV irradiation. The main relaxation process is an electron photodetachment from the deprotonated $[M-H]^-$ precursor ion, which results in a neutral species that is not detected. Note that the calculated vertical detachment energy for the deprotonated maltose is 4.51 eV (at the B3LYP/aug-cc-pvdz level) and VUV photons have thus higher energy than the electron binding energy. Photofragmentation is not observed here after VUV irradiation. The electron loss is also the main relaxation channel observed for peptides and protein polyanions in the VUV range [34, 46, 47]. Figure 1 compares the electron photodetachment efficiency as a function of the wavelength for the three oligosaccharide mono-anions. As expected, the electron photodetachment efficiency increases with the VUV energy as a consequence of increased density of states. Furthermore, several structured bands of absorption are superimposed along the growing electron detachment curve following increasing VUV energy, in particular for maltohexaose at ~8 eV, 9.5 eV, and 11 eV. The nature of these absorption bands is difficult to analyze since many electronic excitations may contribute to these bands. Vacuum-ultraviolet absorption spectra of several model neutral sugar compounds in the gas phase were measured up to 9.9 eV by Dickinson et al. [13]. All spectra showed absorption bands in the 6.2 to 8.1 eV energy range and were attributed to the presence of the oxygen atom and to $n\sigma^*$ transitions. A spectrum for glucose was predicted from the combination of experimental spectra of individual chromophores and displayed a strong band at 7.6 eV.

The optical properties of maltose were investigated by TD-DFT calculation during the course of this work. The most stable structure of deprotonated maltose disaccharide is shown in Figure S1 in Supplementary Material and is characterized by a π (OC_1OC_4) torsion angle equal to 112° and a ψ ($C_1OC_4C_5$) torsion angle equal to -90° . This conformation is stabilized by three hydrogen bonds: one bond between the secondary alcohol function at C_3 position and the deprotonated primary alcohol of the reducing-end glucose, one bond between the C_6 primary alcohol of the non-reducing end glucose and its counterpart on the reducing end glucose, and one bond between the C_1 secondary alcohol of reducing end glucose and the C_6 primary alcohol of the non-reducing end glucose. The corresponding calculated absorption spectrum is presented in Figure 2b. The 300 states used for the calculated spectrum impose a cut-off at ~10 eV. The first band is calculated at 5.6 eV and a global increase in the absorption is calculated at higher energy. The natural transition orbitals [48] corresponding to the three intense excitation lines are shown in Figure 2c. The first excitation (5.6 eV) is localized on the negatively charged oxygen (excitation from the np orbital) [49]. The two

Author's personal copy

1274

Q. Enjalbert et al.: VUV Spectroscopy of Sugars



Scheme 1. Structures of oligosaccharides used in this work

other excitations which are illustrated also involve excitation of np orbitals localized on an oxygen atom. The excited orbitals are delocalized over the saccharide. In complement to VUV experimental spectra, we recorded spectra between 4 and 5.7 eV in Lyon [33, 34] for $[M - H]^-$ maltose ions. The main experimental features observed in the 4 to 10 eV range for maltose (see Figure 2a) are in agreement with the calculated absorption spectrum shown in Figure 2b. A global increase in the depletion yield as a function of the VUV photon energy and an onset of absorption at ~ 5.3 eV are experimentally observed. However, due to low depletion yield in the VUV range between 7 and 10 eV, it is difficult to go further in the comparison.

The electron photodetachment efficiency increases with the size of the saccharide ions. In a simple picture of non-

interacting ose units, the absorbance $A(\lambda)$ of the oligosaccharide would be defined by:

$$A(\lambda) = n \varepsilon_{ose}(\lambda) \quad (1)$$

In this equation, n is the number of monosaccharide units ($n=2, 4$, and 6 for maltose, maltotetraose, and maltohexaose, respectively) and $\varepsilon_{ose}(\lambda)$ is the extinction coefficient of the monosaccharide unit at a given wavelength. Thus, we may globally predict from this formula a 2- and 3-fold increase of photodetachment yield for maltotetraose and maltohexaose with respect to maltose. By examining the action spectra displayed in Figure 1, it appears that the measured photodetachment yields increase by a factor ~ 1.8 and ~ 3.5 (at 7 eV) for $n=4$ and 6 compared with maltose ($n=2$). The relative experimental yields for oligosaccharides are thus in relative good agreement with those expected using Equation 1. At higher energy (15 eV), the measured photodetachment yields only increase by a factor ~ 1.5 and ~ 2.2 for maltotetraose and maltohexaose compared with the photodetachment yield of maltose. Here the experimental relative yields for oligosaccharides are lower than those expected using Equation 1. Note that electron detachment following the absorption of a VUV photon may proceed either directly through a transition of an electron to a continuum state or indirectly through a two-step process. The direct process is an electronic transition connecting an electronically bound state to an electronically unbound state. In the indirect process, photon absorption induces a bound-bound electronic transition, then relaxation leads to auto-ionization, possibly through interatomic Coulombic decay (ICD) [21, 50, 51]. At high photon energy, we expect coexistence of both processes [52]. The coupling between bound-bound electronic transitions and auto-ionization states through conical intersections may become less efficient in long sugars, resulting in a lower quantum yield of

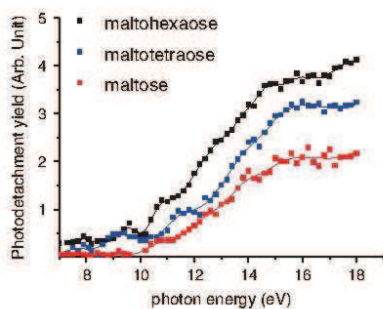


Figure 1. VUV action spectra of singly deprotonated $[M - H]^-$ oligosaccharide anions. The action spectrum was recorded with the linear ion trap LTQ XL mass spectrometer coupled to the DESIRS beamline of the SOLEIL synchrotron center

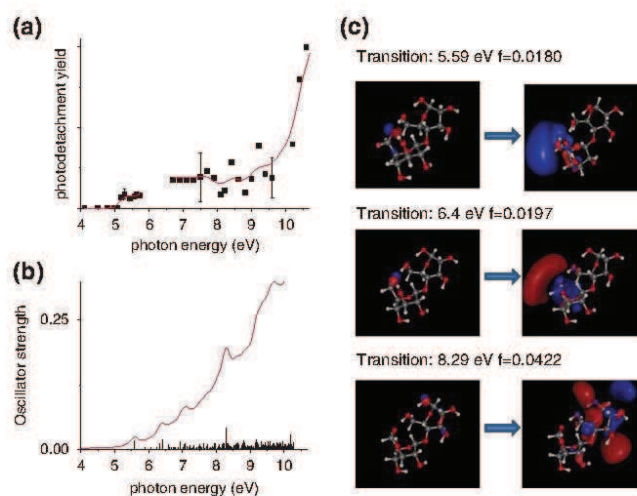


Figure 2. (a) VUV photodetachment yield of singly deprotonated $[M - H]^-$ maltose anions as a function of the photon energy. The action spectrum was recorded with the linear ion trap LTQ XL mass spectrometer coupled to the DESIRS beamline of the SOLEIL synchrotron center between 6.7 and 10.5 eV, and with the LTQ quadrupole linear ion trap coupled to a UV tunable laser OPO in Lyon between 4 and 5.7 eV. Solid lines are simple guides to the eye. (b) Absorption spectrum calculated for the most stable geometry, for the deprotonated maltose molecule from time-dependent density functional method (TD-DFT) using LC-wPBE functional with the aug-cc-pvdz basis set (300 states were included in TD-DFT calculation). The broadening of the calculated lines is simulated by a Lorentzian function with a width of 12 nm. (c) The natural transition orbitals corresponding to the three intense excitation lines. Isovalues are 0.1 and 0.02 au for starting and final orbitals, respectively

detachment after excitation. In particular, electron emission may involve a structural reorganization of the oligosaccharide to couple electronic orbitals located on two different parts of the molecule. Finally, possible electron delocalization over several saccharide units may explain the apparent red-shift of the onset of photodetachment yield as the number of ose unit increases.

Charge Effect

Another interesting aspect concerns the influence of the nature of the charge on both the optical properties but also the fragmentation pathways observed following VUV absorption. These gas-phase behaviors were investigated on the single $[M - H]^-$ and doubly charged $[M - 2H]^{2-}$ anions as well as on the cationized form $[M + Na]^+$ of maltohexaose. The corresponding action spectra are displayed in Figure 3. As already discussed in the previous paragraph, electron photodetachment is the only relaxation channel observed for deprotonated ($[M - H]^-$) maltohexaose species in the VUV range. In contrast, the addition of a sodium cation leads to massive fragmentation (both cleavage of glycosidic bonds and cross-ring fragmentation) following VUV irradiation (see Figure S2 in Supplemental Material). These drastically different relaxation channels in VUV range depending on the sign of the charge state was already

reported for peptides [16, 26]. Electron binding energy for anions is usually lower than ionization potential for cations.

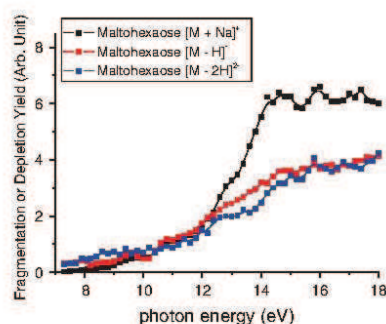


Figure 3. VUV action spectra of singly deprotonated $[M - H]^-$, doubly deprotonated $[M - 2H]^{2-}$, and sodiated $[M + Na]^+$ maltohexaose ions. For photofragmentation ($[M - 2H]^{2-}$ and $[M + Na]^+$), the yield of fragmentation is defined as $\sigma_f = \ln((parent + \Sigma frag)/parent)/\phi$, where ϕ is the photon flux, "parent" is the intensity of the parent peak, and " $\Sigma frag$ " represents the total intensity of all the photofragment peaks. For depletion ($[M - H]^-$), the depletion yield is defined as $\sigma_d = \ln(I_0/I)/\phi$, where I_0 and I are the intensities of the parent signal without and with SR irradiation, respectively. Solid lines are simple guides to the eye

Because the onset for photodetachment (anion) is below the onset of photoionization (for cation), there are more channels opened for emission of electron, which seems to favor electron emission compared with internal conversion followed by dissociation. Interestingly, the doubly deprotonated form of maltohexaose ($[M - 2H]^{2-}$) undergoes unimolecular decay via both electron loss and ionic fragmentation (as displayed in Figure 4a). The photofragmentation is, however, the main decay channel, and the branching ratio between electron loss and fragmentation is independent of the VUV energy (see Figure 4a). Such competition was already observed for heparin-derived oligosaccharide polyanions following a UV irradiation [23]. Thus, the addition of a second negative charge on the sugar may lower the binding energy for the cleavage of covalent bonds and introduce competitive processes to the low energy channel corresponding to electron loss. Note that this competition is also observed even for short irradiation times, which strongly suggests that fragmentation of the oxidized species ($[M - 2H]^-$) in a sequential process is likely to contribute only to a minor part to the fragment ion intensities. Moreover, Figure 4c represents the MS/MS mass spectrum of the maltohexaose irradiated at 16 eV, while Figure 4b shows the MS/MS mass spectrum of the maltohexaose fragmented by CID. Similar glycosidic cleavages (i.e., C_2/Y_2 and C_4/Y_4) are detected in both mass spectra. However, no fragmentation within the six-membered ring is detected in CID, while there is some with VUV irradiation (i.e., A_5 CH_2OH-H_2O fragment). This fragment is more informative than glycosidic ones for structural analysis.

Concerning the action spectra, the single and doubly deprotonated forms of maltohexaose present similar fragmentation yield curves. This result is unexpected because the addition of a second negative charge may influence relaxation processes with additional weakly bound electrons and a weakening of chemical bonds. Interestingly, the addition of a sodium cation leads to an enhanced photofragmentation efficiency from 12 to 18 eV compared with negative species. In this case, the combination of the reactivity of the sodium ion for bond cleavage and the excess of internal energy provided to the ions following photoabsorption above 12 eV may explain such enhancement. Indeed, it has been shown in previous studies that collision induced dissociation spectra of the $[M + Na]^+$ oligosaccharide ions contained more diagnostic fragments than those of the $[M + H]^+$ ions [53, 54].

VUV Fragmentation of Isomeric Trisaccharides

Finally, since sodiated oligosaccharides present an intense fragmentation pattern following a VUV irradiation, we further explored the ability to discriminate sugar isomers by the VUV synchrotron radiation. Recently, photodissociation using F_2 lasers at 157 nm (7.9 eV) has been shown to induce not only cleavages at the glycosidic bonds but also intense cross-ring fragmentations [17 19, 55]. Cross-ring fragmentations are especially informative regarding the type of glycosidic linkage and allow easy discrimination between, for instance, the trisaccharide melezitose and raffinose.

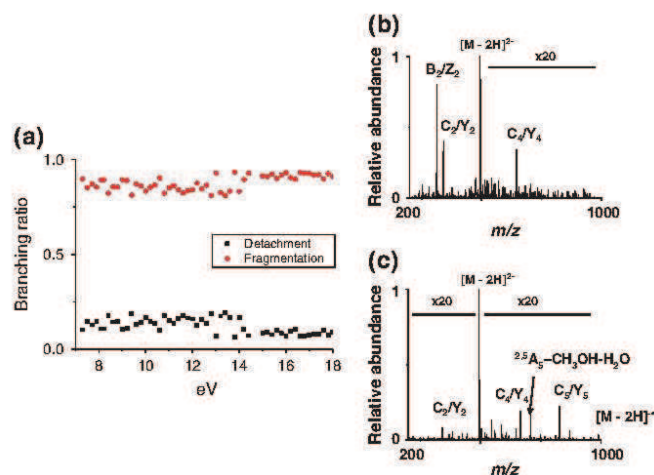


Figure 4. (a) Branching ratios of photofragmentation and photodetachment ($Br_{\text{electron loss}} = |[M - 2H]^-| / (|[M - 2H]^-| + \sum \text{frag})$ and $Br_{\text{fragmentation}} = \sum \text{frag} / (|[M - 2H]^-| + \sum \text{frag})$) defined as a function of the VUV photon energy for doubly deprotonated $[M - 2H]^{2-}$ maltohexaose anions. (b) Collision induced dissociation spectrum recorded for doubly deprotonated $[M - 2H]^{2-}$ maltohexaose anions with 15 % collision energy and 30 ms of activation time. (c) VUV photodissociation spectrum recorded for doubly deprotonated $[M - 2H]^{2-}$ maltohexaose anions for photon energy of 16 eV

Figure 5 shows the VUV PD spectra recorded at 16 eV for $[M + Na]^+$ ions of melizitose and raffinose. As noticed in a previous studies [55], substantially more fragment ions are formed by photodissociation than by CID (see Figure S3 in Supplemental Material). Many fragment ions are common to both species because the two isomers share the same three hexose monosaccharides, i.e., ions at m/z 347, 365, and 393 ($^{1,3}A_3$ for melizitose and $^{1,5}X_2$ for raffinose). These fragments can be attributed to fragmentation of one of the six-membered rings and cleavages between glucose monomers. The most interesting fragments are those that depend on the branching of the different subunits. Photodissociation of the $[M + Na]^+$ melizitose precursor ion results in a fragment ion peak at m/z 333. This is the most intense

product ion for melizitose although it is not detected in the photofragmentation spectra of raffinose. A structure has been proposed for this fragment ion in Figure 5a, which is consistent with the previous analysis reported by Zucker et al. [55]. Similarly, the fragment ion with m/z value 364 is observed in the photodissociation spectrum of the $[M + Na]^+$ raffinose ion but not in the spectrum for melizitose precursor ion. Fragment ion with the m/z value of 364 was reported as Y_2 -H fragment and considered as a diagnostic fragment [55]. In conclusion, VUV fragmentation at 16 eV of the two isomers results in specific fragmentation spectra similar to those reported with photons at 7.9 eV [55]. A possible explanation for these differences in fragmentation pathways between the two isomers may be related to the position of sodium cation on the precursor ions, which affects electronic transitions, binding energies, and positions of the charge on the fragment ions. Such differences were already observed by Reilly and coworkers [55, 56] on isomeric saccharides and confirm the power of VUV activation for distinguishing carbohydrate precursor ions.

Conclusion

In this article, we explored the optical properties in the VUV range (7.2 to 18 eV) of oligosaccharides by action spectroscopy using an ion trap coupled to a VUV synchrotron beamline. Particular attention was paid to probe the effect of the size, the nature of the charge, and the structural isomerization on the VUV optical properties of oligosaccharides.

The main conclusions of this work are:

- (1) The electron photodetachment is the main decay channel observed after a VUV irradiation of oligosaccharide monoanions. The efficiency increases with the photon energy. Superimposed to this global increase in electron detachment yield, several bands are observed in particular for maltohexaose at ~8, 9.5, and 11 eV. These spectra provide unique benchmarks of model carbohydrates for evaluation of theoretical data in the VUV range.
- (2) The electron photodetachment efficiency increases with the size of the saccharide. However, for photons energy >10 eV, the experimental relative yields for oligosaccharides are lower than those expected using a simple additive model of independent ose units.
- (3) The nature of the charge has an effect on the unimolecular decay observed after a VUV irradiation but also on its efficiency. Electron photodetachment for negative species and photofragmentation for positive species are observed, which may be due to difference in ionization energies between anions and cations. Also, some of the observed effects may be due to the presence of the sodium cation.
- (4) VUV photodissociation in the 7.2 to 18 eV range appears to be an efficient tool to produce distinct

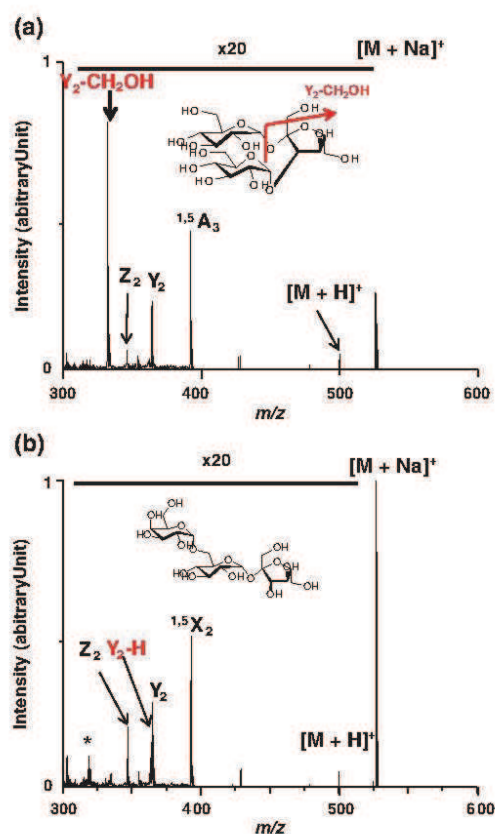


Figure 5. VUV PD spectra of (a) melizitose and (b) raffinose $[M + Na]^+$ ions for a photon energy of 16 eV. Schematic representations of the two isomers displaying several fragmentation schemes are shown as insets. Major fragment ions are assigned with diagnostic fragments shown in red. The peak marked with an asterisk is a background pollutant

photofragments of structural sugar isomers as already demonstrated with VUV photodissociation using F₂ lasers (157 nm).

Acknowledgments

The authors thank the Pôle Scientifique de Modélisation Numérique (PSMN) at Lyon, France, for generous computational facilities. SOLEIL support is acknowledged under project #20110002. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche Scientifique, France, under the project ANR-08-BLAN-0065. The authors also thank the general technical staff of SOLEIL for running the facility. They thank J.-F. Gil for his help in the alignment of the ion trap with respect to the beamline. They thank Stéphane Chambert, Sébastien Redon, and Francis Canon for helpful discussion.

References

- Heinze, T. (ed.): Polysaccharides I: Structure, Characterization, and Use. In: *Advances in Polymer Science*, vol. 186; Springer: Heidelberg, 2005, pp. 1–254.
- Lapasin, R., Priel, S.: *Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications*; Springer: Dordrecht, 1995, pp. 1–620.
- Dumitriu, S. (ed.): *Polysaccharides. Structural Diversity and Functional Versatility*, 2nd ed.; Marcel Dekker: New York, 2004.
- Bubb, W.A.: NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity. *Concepts Magn. Reson. Part A* **19A**, 1–19 (2003).
- Ghosh, D., Golan, A., Takahashi, L.K., Krylov, A.I., Ahmed, M.: A VUV photoionization and ab initio determination of the ionization energy of a gas-phase sugar (deoxyribose). *J. Phys. Chem. Lett.* **3**, 97–101 (2012).
- Arnold, E.R., Stevens, E.S.: VUV CD of simple saccharides. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 7849–7853 (1993).
- Johnson Jr., W.C.: CD spectroscopy and the VUV region. *Ann. Rev. Phys. Chem.* **29**, 93–114 (1978).
- Matsuo, K., Namatame, H., Taniguchi, M., Gekko, K.: VUV CD analysis of glycosaminoglycans by SR spectroscopy. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 557–561 (2009).
- Nelson, R.G., Johnson Jr., W.C.: Optical properties of sugars. I. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 3343–3345 (1972).
- Nielsen, S.B., Chakraborty, T., Hoffmann, S.V.: SRCD spectroscopy of ribose and deoxyribose sugars, adenosine, AMP and dAMP nucleotides. *Chem., Phys., Chem.* **6**, 2619–2624 (2005).
- Gekko, K., Yonehara, R., Sakurada, Y., Matsuo, K.: Structure analyses of biomolecules using a SR CD spectrophotometer. *J. Electron. Spectrosc.* **144/147**, 295–297 (2005).
- Matsuo, K., Gekko, K.: Vacuum-ultraviolet circular dichroism study of saccharides by synchrotron radiation spectrophotometry. *Carbohydr. Res.* **339**, 591–597 (2004).
- Dickinson, H.R., Johnson Jr., W.C.: Optical spectroscopy of sugars. II. *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 5050–5054 (1974).
- Simons, J.P., Jockusch, R.A., Carcabal, P., Hung, I., Kroemer, R.T., Macleod, N.A., Snoek, L.C.: Sugars in the gas phase. Spectroscopy, conformation, hydration, cooperativity and selectivity. *Int. Rev. Phys. Chem.* **24**, 489–531 (2005).
- Carcabal, P., Jockusch, R.A., Hunig, I., Snoek, L.C., Kroemer, R.T., Davis, B.G., Gambelin, D.P., Compagnon, I., Oomens, J., Simons, J.P.: Hydrogen bonding and cooperativity in isolated and hydrated sugars: Mannose, galactose, glucose, and lactose. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 11414–11425 (2005).
- Reilly, J.P.: Ultraviolet photofragmentation of biomolecular ions. *Mass Spectrom. Rev.* **28**, 425–447 (2009).
- Devakumar, A., Thompson, M.S., Reilly, J.P.: Fragmentation of oligosaccharide ions with 157 nm vacuum ultraviolet light. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 2313–2320 (2005).
- Devakumar, A., Mechref, Y., Kang, P., Novotny, M.V., Reilly, J.P.: Identification of isomeric N-glycan structures by mass spectrometry with 157 nm laser-induced photofragmentation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **19**, 1027–1040 (2008).
- Devakumar, A., Mechref, Y., Kang, P., Novotny, M.V., Reilly, J.P.: Laser-induced photofragmentation of neutral and acidic glycans inside an ion-trap mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**, 1452–1460 (2007).
- Ko, B.J., Brodbelt, J.S.: 193 nm Ultraviolet Photodissociation of Deprotonated Sialylated Oligosaccharides. *Anal. Chem.* **83**, 8192–8200 (2011).
- Antoine, R., Dugourd, P.: Visible and ultraviolet spectroscopy of gas phase protein ions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 16494–16509 (2011).
- Racaud, A., Allouche, A.R., Antoine, R., Lemoine, J., Dugourd, P.: UV electronic excitations in acidic sugars. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **960**, 51–56 (2010).
- Racaud, A., Antoine, R., Dugourd, P., Lemoine, J.: Photoinduced dissociation of heparin-derived oligosaccharides controlled by charge location. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **21**, 2077–2084 (2010).
- Racaud, A., Antoine, R., Joly, L., Mesplet, N., Dugourd, P., Lemoine, J.: Wavelength-tunable ultraviolet photodissociation (UVPD) of heparin-derived disaccharides in a linear ion trap. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **20**, 1645–1651 (2009).
- Brunet, C., Antoine, R., Allouche, A.R., Dugourd, P., Canon, F., Giuliani, A., Nahon, L.: Gas phase photo-formation and vacuum UV photofragmentation spectroscopy of tryptophan and tyrosine radical-containing peptides. *J. Phys. Chem. A* **115**, 8933–8939 (2011).
- Brunet, C., Antoine, R., Dugourd, P., Canon, F., Giuliani, A., Nahon, L.: Formation and fragmentation of radical peptide anions: Insights from vacuum ultra violet spectroscopy. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **23**, 274–281 (2012).
- Milosavljevic, A.R., Nicolas, C., Gil, J.F., Canon, F., Refregiers, M., Nahon, L., Giuliani, A.: VUV synchrotron radiation: A new activation technique for tandem mass spectrometry. *J. Synchrotron Radiat.* **19**, 174–178 (2012).
- Milosavljevic, A.R., Nicolas, C., Lemaire, J., Dehon, C., Thissen, R., Bizau, J.M., Refregiers, M., Nahon, L., Giuliani, A.: Photoionization of a protein isolated in vacuo. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 15432–15436 (2011).
- Nahon, L., de Oliveira, N., Garcia, G.A., Gil, J.F., Pilette, B., Marcouille, O., Lagarde, B., Polack, F.: DESIRS: A state-of-the-art VUV beamline featuring high resolution and variable polarization for spectroscopy and dichroism at SOLEIL. *J. Synchrotron Radiat.* **19**, 50–520 (2012).
- Mercier, B., Compin, M., Prevost, C., Bellec, G., Thissen, R., Dutuit, O., Nahon, L.: Experimental and theoretical study of a differentially pumped absorption gas cell used as a low energy-pass filter in the vacuum ultraviolet photon energy range. *J. Vac. Sci. Technol. A Vac. Surf. Films* **18**, 2533–2541 (2000).
- Milosavljevic, A.R., Nicolas, C., Gil, J.F., Canon, F., Refregiers, M., Nahon, L., Giuliani, A.: Fast in vacuo photon shutter for synchrotron radiation quadrupole ion trap tandem mass spectrometry. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. Atoms* **279**, 34–36 (2012).
- Larraillet, V., Antoine, R., Dugourd, P., Lemoine, J.: Activated-electron photodetachment dissociation for the structural characterization of protein polyanions. *Anal. Chem.* **81**, 8410–8416 (2009).
- Talbot, F.O., Tabarin, T., Antoine, R., Broyer, M., Dugourd, P.: Photo-Dissociation spectroscopy of trapped protonated tryptophan. *J. Chem. Phys.* **122**, 074310 (2005).
- Joly, L., Antoine, R., Allouche, A.R., Broyer, M., Lemoine, J., Dugourd, P.: Ultraviolet spectroscopy of peptide and protein polyanions in vacuo: Signature of the ionization state of tyrosine. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 8428–8429 (2007).

35. Korth, M., Pitonak, M., Rezac, J., Hobza, P.: A transferable H-bonding correction for semiempirical quantum-chemical methods. *J. Chem. Theory Comput.* **6**, 344–352 (2009)
36. Stewart, J.J.P.: Optimization of parameters for semiempirical methods. V. Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J. Mol. Model.* **13**, 1173–1213 (2007)
37. Swope, W.C., Andersen, H.C., Berens, P.H., Wilson, K.R.: A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules: Application to small water clusters. *J. Chem. Phys.* **76**, 637–649 (1982)
38. Bussi, G., Parrinello, M.: Stochastic thermostats: Comparison of local and global schemes. *Comput. Phys. Commun.* **179**, 26–29 (2008)
39. Becke, A.D.: Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A* **38**, 3098–3100 (1988)
40. Becke, A.D.: Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **98**, 5648–5652 (1993)
41. Lee, C., Yang, W., Parr, R.: Development of the Colle-Salvetti Correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **37**, 785–789 (1988)
42. Dunning Jr., T.H.: Rates of convergence and error estimation formulas for the Rayleigh-Ritz variational method. *J. Chem. Phys.* **90**, 1007–1023 (1989)
43. Kendall, R.A., Dunning Jr., T.H., Harrison, R.J.: Electron affinities of the first-row atoms revisited. Systematic basis sets and wave functions. *J. Chem. Phys.* **96**, 6796–6806 (1992)
44. Chai, J.-D., Head-Gordon, M.: Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**, 6615–6620 (2008)
45. Tawada, Y., Tsuneda, T., Yanagisawa, S., Yanai, T., Hirao, K.: A long-range-corrected time-dependent density functional theory. *J. Chem. Phys.* **120**, 8425–8433 (2004)
46. Antoine, R., Joly, L., Tabarin, T., Broyer, M., Dugourd, P., Lemoine, J.: Photo-induced formation of radical anion peptides. Electron photodetachment dissociation experiments. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**, 265–268 (2007)
47. Joly, L., Antoine, R., Broyer, M., Lemoine, J., Dugourd, P.: Electron photodetachment from gas phase peptide dianions. Relation with optical absorption properties. *J. Phys. Chem. A* **112**, 898–903 (2008)
48. Martin, R.L.: Natural transition orbitals. *J. Chem. Phys.* **118**, 4775–4777 (2003)
49. Robin, M.B.: Higher excited states of polyatomic molecules, vol. III. Academic Press, Orlando (1985)
50. Cederbaum, L.S., Zobeley, J., Tarantelli, F.: Giant intermolecular decay and fragmentation of clusters. *Phys. Rev. Lett.* **79**, 4778–4781 (1997)
51. Simons, J.: Molecular anions. *J. Phys. Chem. A* **112**, 6401–6511 (2008)
52. Matheis, K., Joly, L., Antoine, R., Lepine, F., Bordas, C., Ehrler, O.T., Allouche, A.-R., Kappes, M.M., Dugourd, P.: Photoelectron spectroscopy of gramicidin polyanions: Competition between delayed and direct emission. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 15903–15906 (2008)
53. Harvey, D.J.: Collision-induced fragmentation of underivatized N-linked carbohydrates ionized by electrospray. *J. Mass Spectrom.* **35**, 1178–1190 (2000)
54. Lemoine, J., Fournet, B., Despeyroux, D., Jennings, K.R., Rosenberg, R., Dehoffmann, E.: Collision-induced dissociation of alkali-metal cationized and permethylated oligosaccharides. Influence of the collision energy and of the collision gas for the assignment of linkage position. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **4**, 197–203 (1993)
55. Zucker, S., Lee, S., Webber, N., Valentine, S.J., Reilly, J.P., Clemmer, D.E.: An ion mobility/ion trap/photodissociation instrument for characterization of ion structure. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **22**, 1477–1485 (2011)
56. Lee, S., Valentine, S.J., Reilly, J.P., Clemmer, D.E.: Analyzing a mixture of disaccharides by IMS-VUVPD-MS. *Int. J. Mass Spectrom.* **309**, 161–167 (2012)

C.3 *Multi electron capture and deprotonation processes observed in Xe⁸⁺ - Cytochrome C^{q+} (q=15-19) collisions¹*

L'étude des interactions entre des ions pseudomoléculaires faiblement chargés, en particulier issus du domaine biologique (oligonucléotides, sucres, oligopeptides, groupes prosthétiques, etc.) et des ions hautement chargés a fait l'objet de nombreux articles ces dernières années. Ces travaux, en particulier appliqués à des peptides, ont montrés l'existence de deux types d'interaction :

- Le premier type consiste en la capture à grande distance par l'espèce multichargée d'un électron de l'ion peptidique, modifiant l'état de charge de celui-ci ;
- Le second type consiste en la collision entre l'ion multichargé et l'ion peptidique, conduisant à la fragmentation de celui-ci.

L'article annexé ci-après présente les résultats de l'étude des interactions entre un faisceau d'ions multichargés (du Xe⁸⁺) et l'ion pseudomoléculaire d'une protéine elle aussi hautement chargée (du cytochrome-C multiprotoné, d'état de charge variant entre 15+ et 19+). Afin de générer un faisceau d'ions Xe⁸⁺ les expériences ont été conduites au cyclotron du Kernfysisch Versneller Instituut (Gröningen – Pays-Bas). Du fait de l'état de charge de l'ion protéique et de sa masse, un nouveau processus d'interaction a été mis au jour.

De fait, les résultats de cette étude montrent que 80 % des protéines ayant interagies se fragmentent et que parmi les 20 % restant intactes, trois voies de modification sont possibles. La première consiste en la perte d'un électron de la protéine au profit de l'ion xénon ; la seconde en la perte de deux électrons. Ces deux voies sont connues et décrites dans la littérature. La troisième et dernière voie consiste en la perte d'un proton par la protéine lors de son interaction avec l'ion xénon. Alors que les branching ratios des deux premières voies ne dépend que très peu de l'état de charge de l'ion protéique, la troisième, quant à elle, devient majoritaire à l'état de charge 19+ alors qu'elle était quasi inexistante à l'état de charge 15+.

¹ Soumis pour publication au journal Physical Review A

Electron capture and deprotonation processes observed in collisions between Xe^{8+} and multiply protonated cytochrome-C

S. Martin,^{1,*} C. Ortega,¹ L. Chen,¹ R. Brédy,¹ A. Vernier,¹ P. Dugourd,¹ R. Antoine,¹ J. Bernard,¹ G. Reitsma,² O. Gonzalez-Magaña,² R. Hoekstra,² and T. Schlathöler²

¹*Institut Lumière Matière, UMR5306 Université Lyon 1-CNRS, Université de Lyon, 69622 Villeurbanne cedex, France*

²*KVI Atomic and Molecular Physics, University of Groningen, Zernikelaan 25, NL-9747 AA Groningen, The Netherlands*

(Received 2 July 2013; revised manuscript received 19 December 2013; published 13 January 2014)

Electron-transfer processes in interaction between highly charged ions and multiply protonated proteins have been studied. Collisions between Xe^{8+} at 96 keV and protonated cytochrome-C at selected charge state (q from 15+ to 19+) result in mass spectra composed mainly of intact molecular ions. From the spectra, single and double electron capture processes by Xe^{8+} from the protonated molecular ions were identified and the relative cross sections were measured. An unexpected process, the deprotonation process, was also observed. It is tentatively attributed to the loss of a proton induced by the strong electric field carried by the projectile ion in long-distance collisions. Upon charge variation of the molecular target from 15 to 19, the single and double electron capture cross sections remain nearly constant, while the relative cross section of the deprotonation process increases dramatically from 0.8% ($\pm 0.1\%$) to 17% ($\pm 1\%$). This strong charge dependency is explained by the decrease of the proton affinities with the charge. This proton removal process has not been observed previously. It seems to be specific to the long-distance Coulomb interactions between protons bound along the protein chain and the highly charged atomic ions.

DOI: 10.1103/PhysRevA.89.012707

PACS number(s): 34.50.-s, 36.40.Qv, 34.10.+x, 36.40.Wa

I. INTRODUCTION

For many decades, collision dynamics between highly charged ions (HCIs) and atomic or molecular targets in the gas phase have been investigated [1]. Most works on ion-neutral target collisions were performed in crossed beam configurations while a number of more recent studies have employed merged beam techniques [2,3]. Ion-molecular target collisions have been investigated intensively during recent years in order to gain structural information of (eventually multiply) charged molecules and to study their stability and fragmentation dynamics. In these experiments, the electron transfer from the target molecule to the HCI is the main interaction mechanism leading to ionization, excitation, and the subsequent dissociation of the molecules. Most of the molecules investigated so far could be easily brought into the gas phase by evaporation using a simple oven [4–8]. An entire class of molecules of biological interest, including DNA bases, sugars, small amino acids, porphyrins, etc. [9–13], has been studied in collisions with HCIs. To bring larger and generally more fragile biomolecules into the gas phase, more sophisticated molecular source techniques such as electrospray ionization (ESI) have to be employed. Recently, an experimental setup combining an ESI, a radiofrequency (RF) ion trap device, and a HCI source has been built at the Zernike-LEIF facility at the Kernfysisch Versneller Instituut (KVI), University of Groningen. This experimental investigation of collisions between HCIs and stored small protonated peptides (Leucineenkephaline, bradykinin...) [14] has revealed two main classes of interaction processes: (i) electron capture processes at long collision distance leading to little excitation of the target and even formation of intact peptide dications; (ii) collisions at closer distance leading to higher energy

deposition and extensive fragmentation of the peptide. This pioneering work has opened the way for exploring a new research field on interactions between HCIs and larger biomolecules such as proteins.

Electron transfer in ion-ion collisions at much lower interaction energies (a few eV) has already been studied intensively using ion trap mass spectrometry. Experimental techniques such as electron-transfer dissociation (ETD) and negative ETD are now routinely used for analytical purposes [15–20]. Gas phase charge transfer processes involving protonated peptides or proteins are directly related to the proton or electron binding energies of such species [21,22]. To measure these binding energies, photoionization (e.g., using synchrotron radiation) and electron impact ionization techniques have been employed [21–24]. As expected, for a given protonated protein the ionization potential (I_p) and electron affinity (EA) were found to depend sensitively on the charge q , i.e., the number of protons bound to the protein. For example, for a series of small proteins with mass between 1000 and 3500 amu (insulin, melittin), the I_p follows a simple linear law with q , I_p (eV) = $9.8 + 1.1q$ [25]. For larger proteins such as cytochrome-C (denoted as cyt-C hereafter) ($m \approx 12 \times 10^3$ amu), the charge effect on the I_p is weaker and the linear q -dependent term is approximately $0.2q$ (eV) [23]. Besides the roughly linear variation feature of I_p as a function of q , Giuliani *et al.* [26] observed a small plateau in the $I_p(q)$ curve for protonated cyt-C, corresponding to structural modifications of the protein as demonstrated by Clemmer and Jarrold using ion mobility spectrometry [27].

In this paper, we study collisions between HCI Xe^{8+} at 96 keV and a multiply protonated biomolecule, the protein cyt-C, with charge state or the number of protons ranging from $q = 15+$ to $19+$. The goal of this study is to address the electron transfer and relaxation mechanisms occurring in fast interactions involving two highly charged species. Single and double electron transfer from the highly charged

*Corresponding author: smartin@univ-lyon1.fr

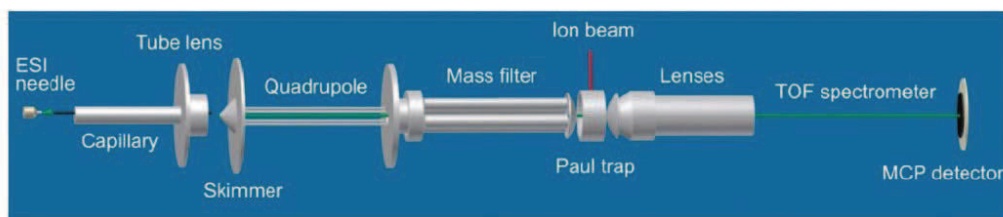


FIG. 1. (Color online) Experimental setup.

protein to a point-charge projectile ion was observed. The total electron-transfer cross section was calculated with the classical over-the-barrier model under the assumption of a simple linear molecular conformation. An unexpected process, the deprotonation process, was also observed. The charge dependency of its measured cross section was found strongly correlated to the proton affinity (the minimum energy to remove a proton from the molecule) of the protonated cyt-C.

II. EXPERIMENT

The experimental setup (Fig. 1) has been described in detail elsewhere [28] and only a short description is presented here. A homemade ESI source was used to produce the protonated molecules. A 30- μM methanol solution with typically 1% acetic acid contained bovine cyt-C molecules, denoted M , of mass 12229 amu (Sigma-Aldrich). It was dispersed by electrospray into fine aerosols through a capillary heated to 100 $^{\circ}\text{C}$. After solvent evaporation in vacuum, protonated molecular ions, denoted $[M + q\text{H}]^{q+}$ with q ranging from 12+ to 20+, were formed with the attachment of q protons on the basic residues of the cyt-C. The density of free protons available in the solution could be controlled by varying slightly the density of the acetic acid. The higher the acid amount, the higher the proton density and therefore the higher the charge state q attained by the protonated molecules from the ESI source. The ions were guided by a first quadrupole and selected in charge state through a second quadrupole which served as a mass filter. The selected ions cyt-C $[M + q\text{H}]^{q+}$ were then accumulated during about 500 ms in a Paul trap where a He buffer gas was injected in order to trap and cool the ions (pressure up to 10^{-3} mbar). A time diagram of the sequence of the experiment is presented in Fig. 2. At the end of the accumulation phase, the incident molecular ion jet was blocked by applying a voltage of 25 V to the einzel lens located between the mass filter and the trap, and the He gas injection valve was closed. With the buffer gas off, the pressure in the trap dropped quickly to approximately 10^{-6} mbar in less than 0.5 s of storage time. An ion beam of Xe^{8+} (10 nA)

extracted from an electron cyclotron resonance (ECR) source and accelerated to 96 keV was sent into the trap to collide with the stored molecular ions. It was collimated and guided to the center of the trap through a pair of 2.4-mm apertures drilled in two opposite sides of the ring electrode. The number of protonated cyt-C ions stored in the trap was estimated to be on the order of 10^3 ions. Good vacuum condition was therefore necessary to maintain low relative collision cross section (1%) between the Xe^{8+} beam and the background gas composed of residual He gas and neutrals coming from the ESI source. A typical irradiation time of 1.4 s was necessary to deplete about 20% of the stored parent ion population via collision induced charge exchange or dissociation. After the irradiation phase, a pulse of He buffer gas was injected during 0.1 s in order to cool down the energetic dissociation products and quench further dissociation processes. After the whole sequence of accumulation-storage-irradiation-cooling, $\pm 200\text{-V}$ bias voltages were applied to the endcaps of the Paul trap. The stored ions, including intact molecular ions and fragments, were extracted and sent into a time-of-flight (TOF) mass spectrometer of resolution $M/\Delta M \approx 200$. A postacceleration voltage of 5 kV was applied in front of the multichannel plate detector in order to improve the detection efficiency. The detector signal was recorded with a 1-GHz digitizer over 65 μs of TOF range. The typical duration to record a spectrum was about 1 h. In a raw TOF spectrum, peaks due to collisions of Xe^{8+} with the background gas were observed mainly in the low mass-over-charge range below 100 amu. Their contribution to the mass spectra was corrected by the subtraction of a background spectrum obtained without protein accumulation in the trap (see Ref. [28] for details).

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. Spectrum analyses

Figure 3 shows the mass spectra obtained with or without Xe^{8+} irradiation in experiments using fast Xe^{8+} ions (96 keV) and trapped protonated protein ions cyt-C $[M+18\text{H}]^{18+}$. Figure 4 shows the mass spectra obtained in collisions between Xe^{8+} and cyt-C $[M + q\text{H}]^{q+}$ ($q = 15-19$). In the large mass-over-charge range (500–900 amu), the spectra exhibit only a few peaks showing similar features as the spectra obtained for multiply protonated proteins in ETD experiments [29]. For example, in Fig. 4(a) corresponding to collisions with $[M+15\text{H}]^{15+}$ ions, three main peaks are observed. The dominant peak is assigned to the parent ions $[M+15\text{H}]^{15+}$ and two other peaks at lower mass-over-charge ratio are assigned to

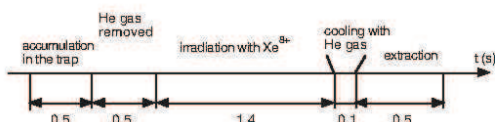


FIG. 2. Time diagram of the experiment.

012707-2

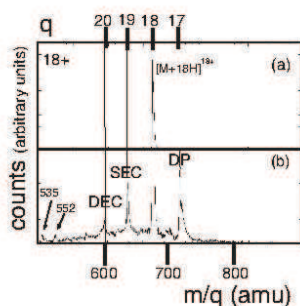


FIG. 3. Mass spectra of trapped protonated cyt-C $[M+18H]^{18+}$ without (a) and with Xe^{8+} ion irradiation (b). SEC, DEC, and DP stand for single electron capture, double electron capture, and deprotonation, respectively. The upper scale indicates the charge of intact molecular ions.

$[M+15H]^{16+}$ and $[M+15H]^{17+}$. Molecular ions undergoing dissociation with the loss of a small neutral fragment could have contributed to the broadening of the observed main peaks. However, in the case of cyt-C, it is expected that dissociation occurs mainly along the backbone leading to the loss of a - b type or c - z type fragments [18] with a typical mass large enough to allow the remaining charged fragment to be resolved from the parent ion peak. On the other hand, dissociation of the molecular ions into two or more charged fragments could

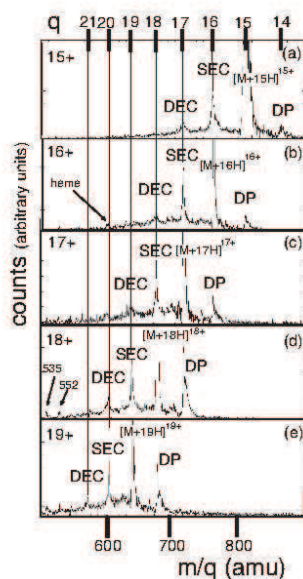


FIG. 4. Mass spectra (a)-(e) in collisions between Xe^{8+} and protonated cyt-C, $[M+qH]^{q+}$ ($q = 15-19$). The upper scale indicates the charge of intact molecular ions.

lead to the production of fragments with mass-over-charge ratio in the domain of our mass spectrum. However, due to the large size of the molecular chain, hundreds of scission sites are possible leading to the broad unresolved background of the spectrum. Therefore, contribution of fragments with the same mass-over-charge ratio as the main peaks is mixed in the background. These arguments allow us to confirm the assignment of the peaks to intact molecules. In all spectra obtained with cyt-C $[M+qH]^{q+}$ [$16 \leq q \leq 19$; Fig. 4(b)-4(e)], peaks assigned to intact parent ions $[M+qH]^{q+}$ and intact up-charged ions $[M+qH]^{(q+1)+}$ and $[M+qH]^{(q+2)+}$ are observed. We attribute $[M+qH]^{(q+1)+}$ and $[M+qH]^{(q+2)+}$ to single electron capture (SEC) and double electron capture (DEC) processes by Xe^{8+} from the parent molecular ions. Three small fragment peaks can be identified and tentatively assigned. Among these peaks, one corresponds most probably to the monocharged heme molecular ion ($m = 617$ amu) and two others to small monocharged fragments ($m = 535, 552$ amu). To identify precisely all fragment peaks in the background, a mass spectrometer with high mass resolution up to 20000 would be needed.

Similar as the example shown in Fig. 3(a), mass spectra of the other stored $[M+qH]^{q+}$ ($q = 15-19$) ions have been also measured without Xe^{8+} irradiation. From the spectra normalized to the same experimental conditions, i.e., the same number of trapped ions, the total counts N_{pi} and N_p , of the parent ions $[M+qH]^{q+}$ measured with and without irradiation, have been obtained from the integral of the peaks (Table I). A population depletion ratio of the stored parent ions due to Xe^{8+} irradiation was calculated using $\rho = (N_p - N_{pi})/N_p$ and was found to be $\rho = 17\%, 19\%, 20\%, 23\%$, and 24% ($\pm 1\%$) for $15 \leq q \leq 19$, respectively. This parameter is related tightly to the total interaction cross section in collisions between Xe^{8+} and $[M+qH]^{q+}$. Typically, higher cross section should lead to larger depletion ratio. The dependency of the measured depletion ratio ρ on q suggests that the total cross section increases slightly with the charge of the protonated molecular ions. From Fig. 4, the counts N_{SEC} and N_{DEC} for the SEC and DEC processes leading to intact molecular ions were measured, respectively, from the integral of the peaks $[M+qH]^{(q+1)+}$ and $[M+qH]^{(q+2)+}$ (Table I). The relative cross section of these processes σ'_{SEC} or σ'_{DEC} was estimated from the ratio of N_{SEC} or N_{DEC} versus the total parent ion population depletion ($N_p - N_{pi}$), $\sigma'_{SEC} = N_{SEC}/(N_p - N_{pi})$ and

TABLE I. Count (integrated area) of each peak after normalization of the spectra. N_p : Parent ion peak $[M+qH]^{q+}$ without irradiation; N_{pi} : Parent ion peak $[M+qH]^{q+}$ with irradiation; N_{SEC} , N_{DEC} , N_{DP} : peaks corresponding, respectively, to single electron capture $[M+qH]^{(q+1)+}$, double electron capture $[M+qH]^{(q+2)+}$, and deprotonation $[M+(q-1)H]^{(q-1)+}$ processes.

q	N_p	N_{pi}	$(N_p - N_{pi})/N_p$	N_{SEC}	N_{DEC}	N_{DP}
15	1216000	1010000	0.17	29000	10000	1600
16	1216000	985000	0.19	23000	6500	11000
17	1216000	973000	0.20	28000	11500	18000
18	1216000	936000	0.23	30000	12500	36000
19	1216000	924000	0.24	28000	10500	49000

$\sigma'_{\text{DEC}} = N_{\text{DEC}}/(N_p - N_{pi})$. σ'_{SEC} was found to vary from 14% to 9% ($\pm 1\%$) with increasing charge q of the protonated molecules $[M + qH]^{q+}$ while σ'_{DEC} varied slightly with q from 5.0% to 4.0% ($\pm 0.5\%$).

Another intense peak can be observed in the mass spectra of Fig. 4. For instance, in Fig. 4(d) which depicts the results for collisions with $[M + 18H]^{18+}$, a peak is observed at the nominal mass over charge, 720 amu. This is close to the value expected for the intact molecular ions with a lowered charge, $q = 17+$. Similarly, in spectra obtained with other trapped parent ions $[M + qH]^{q+}$, a peak at mass-over-charge ratio around that of the intact molecular ion with a charge $q-1$ can be also noticed. The calibration of the mass spectra leads to an uncertainty in the mass determination of approximately two to three hydrogen atoms. Furthermore, due to the asymmetric shape of the peak, determination of the mass of the molecular ions with a precision up to the mass of hydrogen is impossible. Nevertheless, in the following, we tentatively attribute these peaks to the quasi-intact parent ions with the loss of one proton, $[M + (q-1)H]^{(q-1)+}$. This process is labeled DP in Fig. 4 for “deprotonation”. This attribution will be discussed in more detail in a following section. From the measured counts N_{DP} (Table I), we have estimated the relative cross section of this process, $\sigma_{\text{DP}} = N_{\text{DP}}/(N_p - N_{pi})$. It increases strongly with the charge of the target ions, from about 0.8% ($\pm 0.1\%$) for $q = 15$ to 17% ($\pm 1\%$) for $q = 19$.

The measured SEC, DEC, and DP processes leading to intact or quasi-intact molecules corresponding to about 20% ($\pm 2\%$) to 30% ($\pm 2\%$) ($\sigma'_{\text{SEC}} + \sigma'_{\text{DEC}} + \sigma'_{\text{DP}}$) of the depleted cyt-C $[M + qH]^{q+}$ population with increasing charge q . Therefore, a major part of the depleted molecular ions undergoes fragmentation after interaction with Xe^{8+} . A part of the fragmented population contributes to the broad background of the mass spectra and another part may have escaped from the trap. The corresponding relative cross section could be also estimated using $1 - \sigma'_{\text{SEC}} - \sigma'_{\text{DEC}} - \sigma_{\text{DP}}$. It was found to vary from 80% ($\pm 2\%$) to 70% ($\pm 2\%$) with increasing charge q .

B. Calculation of the electron capture distances and total cross sections

In HCl-atom collisions, the electron capture process can be described using the classical over-the-barrier model (COBM) [30] for two approaching point charges. The capture distance estimated with the COBM depends on the charge state of the projectile, the target ionization potential I_p , and the charge state of the target. The COBM has been modified and applied to larger systems such as C_{60} [4] and polycyclic aromatic hydrocarbons [31]. Electron capture dynamics involving biomolecules such as cyt-C are even more complex. Unlike atomic targets or C_{60} , protonated cyt-C targets do not have a spherical symmetry and their conformation depends on the charge state of the molecule. Two examples of conformations are shown in Fig. 5. For high charge states (15+ to 19+), the molecule is expected to exist in a linear extended configuration [Fig. 5(b)], with the length estimated to be $L_p = 20.5 \text{ nm} = 388 \text{ a.u.}$ In order to estimate the one-electron capture distance and to roughly estimate the total electron capture cross sections using COBM, we considered a simple model called in the following “model total cross section” in which the target

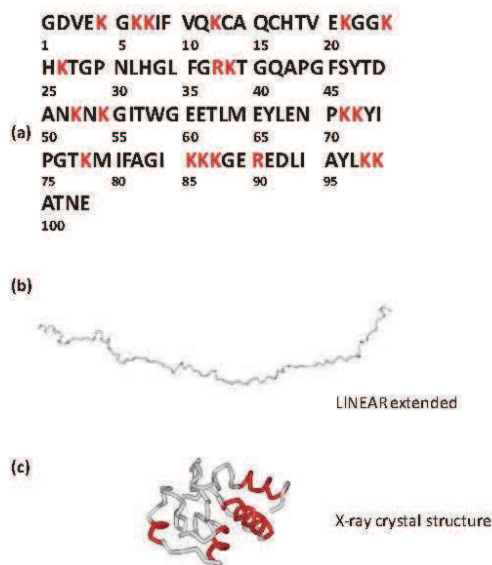


FIG. 5. (Color online) (a) One-letter sequence of bovine cytochrome-C. Alanine (A), arginine (R), asparagine (N), aspartic acid (D), cysteine (C), glutamic acid (E), glutamine (Q), glycine (G), histidine (H), isoleucine (I), leucine (L), lysine (K), methionine (M), phenylalanine (F), proline (P), serine (S), threonine (T), tryptophan (W), tyrosine (Y), valine (V). Arginine (R) and lysine (K) basic residues are labeled in red. The numbers indicate the position of residues on the backbone of cyt-C protein from the N terminus. (b) Model structures of cytochrome-C for extended structure assuming dihedral angles of 180° for each peptide bond, followed by structural relaxation using the Assisted Model Building with Energy Refinement force field. (c) Native structure as obtained from x-ray diffraction, taken from the protein database pdb (1CYC).

molecular ion was represented by a linear segment of length L_p along which q positive point charges are distributed at equal distances. For a given collision geometry, we have calculated the electrostatic potential energy curve of an electron escaping from cyt-C $[M + qH]^{q+}$ to Xe^{8+} for variable impact parameters. Interactions of the electron with the charge ($8+$) of the projectile, the charges ($q+$) distributed along the molecule, and the charge ($1+$) of the site left by the electron were taken into account. The so-called one-electron capture distance is obtained at a critical impact parameter where the binding energy of the electron in the electrostatic field of the projectile reaches the top of the potential curve. For collisions at shorter distance, the electron transfer from cyt-C $[M + qH]^{q+}$ to the approaching Xe^{8+} ion can occur over the potential barrier.

In the following, the center of a molecular target is defined as the origin (O) of a coordinate system (Fig. 6). The z axis is defined by the direction of Xe^{8+} projectile ion beam. We consider in the first step collision geometries [Fig. 6(a)] where the molecule is aligned along the x axis, hence perpendicular

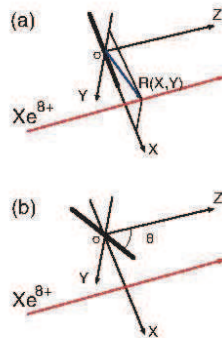


FIG. 6. (Color online) Scheme of geometrical collision configuration.

to the projectile trajectory. For this configuration, the impact parameter is given by $\vec{R} = (X, Y)$. We analyze first the cases where the electron transfer takes place near one of the ends of the molecule. To illustrate the method, we present a particular collision geometry, where the trajectory of the projectile is in the plane Oxz and the impact parameter is given by $(X, 0)$ with $X > R_p$. $R_p = L_p/2$ corresponds to the distance between the center and the end of the molecule (194 a.u.). The potential energy curve of the escaping electron along the x axis between one of the ends of the molecule $(R_p, 0)$ and the projectile $(X, 0)$ was expressed as

$$V(x) = - \sum_i \frac{1}{|x - R_i|} - \frac{8}{|X - x|} - \frac{1}{|x - R_p|}, \quad (1)$$

where R_i stand for the coordinates of protons along the molecular chain. The barrier of the potential energy curve $V(x)$ was estimated for each impact parameter X . It was compared with the binding energy of the electron attached to the end of the molecule in the electrostatic field of the projectile, $-[I_p(q) + 8/|X - R_p|]$. The ionization potential $I_p(q)$ for protonated cyt-C was approximated using a linear relation, $I_p(q) = 11.5 + 0.2q$ eV, obtained by extrapolation of the measurement of Giuliani *et al.* [26]. The capture distance X_c using target molecules with q varying from 15+ to 19+ has been calculated to be 214.6, 214.8, 215.0, 215.2, and 215.4 a.u. corresponding to distances with respect to the end of the molecule $X'_c = 17.6, 17.8, 18.0, 18.2,$ and 18.4 a.u., respectively. For other near-end collisions with impact parameters (X, Y) , $X > R_p$, and $Y \neq 0$, comparable distances from the end of the molecules were found. Therefore, the geometrical cross section for the capture of an electron from one end of the molecule is given approximately by $\pi/2X_c^2$. Considering the two ends of the molecules, the total cross section for electron capture in near-end collisions is given by $S_1 = \pi X_c^2$.

For collision geometries shown in Fig. 6(a), the projectiles pass most probably near the molecular chain with impact parameters $|X| < R_p$, $Y \neq 0$. In such cases, the capture takes place preferentially from the closest amino acid. Along the cyt-C chain, the I_p to remove an electron is not constant. It

depends on the specific amino acid from which the electron originates and its distance from the nearby protonated sites. We recall here that the protons are attached preferentially to the basic residues as arginine (R) and lysine (K). Although the tryptophan amino acid has the lowest I_p [32] (letter code W, $I_p = 7.44$ eV) of all amino acid constituents of cyt-C, it is not necessarily easier to remove an electron from the W site of a highly protonated molecule. Indeed, the W amino acid is close to the neighboring protonated sites and the electron binding energy from this W site could be larger than from some other amino acids. Williams *et al.* [21] have calculated the proton distribution versus the number of protons on cyt-C $[M + qH]^{q+}$. From that work, one can notice that the amino acid sites with low I_p are those far away from the protonated sites, notably, around residue numbers 32, 45, and 63 [see Fig. 5(a)]. It can be expected that in collisions near these sites, the electron transfer may take place more easily leading to larger capture distance. In collisions close to other sites with slightly larger I_p , the electron transfer is expected to occur at shorter distance. In the present crude model, the above features were not taken into account. The linear relation $I_p(q) = 11.5 + 0.2q$ eV was used as an averaged value without discerning the amino acid or proton sites. The COBM was applied to the case where the projectile passes in the perpendicular bisecting plane between the two most central protons at impact parameter around $(0, Y)$. The electron transfer was estimated to occur at $(0, Y_c)$ at the capture distance $Y_c(0) = 28.4, 29.2, 30.2, 31.0,$ and 31.8 a.u. for the charge q varying from 15+ to 19+, respectively. In order to estimate the electron-transfer cross section, the capture distance $Y_c(X)$ should be estimated for other impact parameters, (X, Y) , $-R_p < X < R_p$. As a rough approximation, it was considered as constant along the molecular chain $Y_c(X) = Y_c(0)$, noted as Y_c . Taking into account collisions at both sides of the molecule, the electron capture cross section S_{ch} along the chain was approximated as the surface area of a rectangle of width L_p (length of the molecule) and height $2Y_c$; $S_{ch} = 2Y_c L_p$.

In the second step, we consider collision geometries as shown in Fig. 6(b). A random orientation of the molecular chain in the space is characterized by the angle θ with respect to the z axis. The cross section for collisions along the molecular chain is reduced to $S_{ch} \sin \theta$ while that for near-end collisions S_1 can be considered as constant. Making the average over the 4π solid angle, the mean value $\langle S_{ch} \rangle$ is calculated by the integral, $\frac{1}{4\pi} \int_0^\pi S_{ch} \sin \theta \sin \theta d\theta \int_0^{2\pi} d\phi = \frac{\pi}{4} S_{ch}$. The total cross section σ_{total} including $\langle S_{ch} \rangle$ and S_1 was estimated by $\sigma_{total} = \pi/4 S_{ch} + S_1$. It slightly increases from 35×10^{-14} cm² to 40×10^{-14} cm² with the charge of protonated cyt-C varying from 15+ to 19+. The increase in the electron capture cross section with the charge of the molecule seems to be counterintuitive. Indeed, due to the Coulomb attraction from protons, it is obviously more difficult to remove an electron from a system with increasing positive charge. This is consistent with the linear increasing dependency of I_p on q . However, this effect is counteracted by the presence of the HCl in the vicinity. In fact, the positive charges along the molecule reduces the potential barrier encountered by the escaping electron and furthermore, the higher the charge of the molecule, the lower the potential barrier. Therefore,

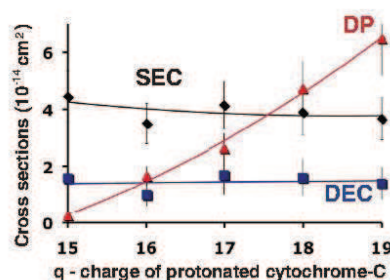


FIG. 7. (Color online) Cross sections for the single (diamonds) and double (squares) capture and deprotonation (triangle) processes versus the charge of protonated cyt-C, $[M + qH]^{q+}$. The lines are to guide the eye.

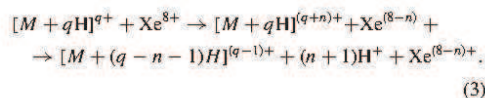
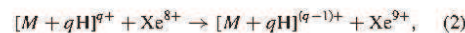
in the end, the electrostatic field of the highly protonated molecule makes the electron-transfer process a bit easier. This leads to the increase of the over-the-barrier transfer distance with increasing target charge q as evidenced in each of the above impact conditions. Comparing the two analyzed typical cases in impact geometries of Fig. 6(a) with $\vec{R} = (X, 0)$ and $\vec{R} = (0, Y)$, at the same collision distance ($X' = X - R_p = Y$) for the same charge q , the potential barrier was found lower for the second case. Indeed, the electrostatic field due to the q protons is stronger along the charged molecular chain than at the end of it. This results in the increase of the capture distance in collisions along the molecular chain leading to $Y_c > X'_c$ for the given q . The variation tendency of the model total cross section σ_{total} with q is in qualitative agreement with the measured increase in the parent ion depletion ratio ρ from 17% ($\pm 1\%$) to 24% ($\pm 1\%$) for q varying from 15+ to 19+.

Using the model total cross section σ_{total} , the absolute cross sections for SEC and DEC processes were estimated using the measured relative cross sections, $\sigma_{\text{SEC}} = \sigma_{\text{total}} \sigma'_{\text{SEC}}$ and $\sigma_{\text{DEC}} = \sigma_{\text{total}} \sigma'_{\text{DEC}}$. In Fig. 7, we have plotted σ_{SEC} and σ_{DEC} versus the charge of cyt-C $[M + qH]^{q+}$. Both SEC and DEC cross sections are nearly constant as a function of the charge of the protein.

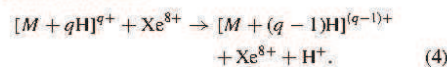
C. Deprotonation

In Fig. 4, the DP peaks observed at the nominal mass over charge close to the values expected for the intact molecular ions with a lowered charge, $q-1$, are attributed to the deprotonation process, i.e., the loss of a proton leading to $[M + (q-1)H]^{(q-1)+}$. The relative cross section of the DP peaks σ'_{DP} were found to depend strongly on the initial charge of cyt-C $[M + qH]^{q+}$. Using the model total cross section σ_{total} , the absolute DP process cross section versus the initial charge q has been estimated from the measured relative cross sections, $\sigma_{\text{DP}} = \sigma_{\text{total}} \sigma'_{\text{DP}}$ (see Fig. 7). To confirm the attribution of the DP peak to the deprotonation process, other possible mechanisms that may result in a decrease of the precursory parent ion charge

state are considered and discussed below:



The first reaction (2) corresponds to single electron transfer from the projectile to the highly protonated protein. Similar charge-decrease process via the capture of an electron by protonated proteins has been observed in collisions with anions [29]. However, in the present case, due to the large ionization potential of about 171 eV for Xe^{8+} , the transfer of a strongly bound electron from Xe^{8+} to $[M + qH]^{q+}$ is highly improbable. Therefore this mechanism is eliminated in the interpretation of the DP peak. The second reaction (3) consists of two steps, i.e., the capture of n ($n = 1$ or 2) electrons by the projectile, corresponding to SEC or DEC processes, followed by the loss of $n+1$ protons from the protein. Similar asymmetrical dissociation processes have been observed in collisions between highly charged ions and neutral targets as fullerenes [33–35] or clusters [36]. In the latter cases, multiple electron transfer may lead to the simultaneous excitation of the targets, which is followed by the statistical thermal emission of one or several small charged fragments. The asymmetrical fission of fullerene C_{60} has been observed in collisions with Xe^{8+} projectiles at 80 keV. However, comparing to the intact singly or multiply charged C_{60} , the fission yield amounted to only several percent of the total electron capture cross section. It was attributed to collisions at short impact parameters where a large amount of energy necessary to induce the fragmentation was deposited in the fullerene. Analogous to C_{60} , the loss of $n+1$ protons from $[M + qH]^{(q+n)+}$ should occur in closer collisions with much smaller cross sections than that of intact molecules. If the peak DP was the result of SEC [$n = 1$ in the reaction (3)] followed by the loss of $2H^+$, its yield should be expected much smaller than that of the peak SEC. The measured values show, however, the contrary. In Fig. 7 one can see that the cross section σ_{DP} is on the same order of magnitude as σ_{SEC} and at $q = 18$ and 19 , σ_{DP} is even larger than σ_{SEC} . This very different charge variation tendency of σ_{DP} from σ_{SEC} is in favor of excluding the contribution of reaction (3) to the DP peak, although the fragmentation mechanism after a SEC process and its charge dependency is still unknown. Here, we attribute tentatively the DP peaks observed in Fig. 4 to the deprotonation process,



The deprotonation process is tentatively interpreted as fast ejection of a proton during the collision. Fast ejection of atomic ions has been also observed with significant yield in collisions between Ar^+ at 7 keV and C_{60} [37]. It was interpreted as due to the momentum transfer at short distance between the heavy incident Ar^+ and one of the carbon atoms in head-on collisions. The variation tendency of the measured C^+ yield with the projectile mass and velocity was in good agreement

with the so-called nuclear stopping in collisions with matter. Nevertheless, such direct atomic knock-out type interaction is not in consistence with the observation in the present work. Indeed, short-distance interactions between the projectile ion and randomly one of the atoms of the target should be able to provoke prompt loss of other constituents leading to fragments such as $[M + q\text{H-C}]^{q+}$ or $[M + q\text{H-N}]^{q+}$. Obviously, these peaks are not observed in the mass spectra (Fig. 4). Additionally, the cross section for short-distance head-on collisions should be much smaller than that for the long-distance electron-transfer process and it should be sensitive to the kinetic energy of the collision rather than the charge of the collision partners. In the present experiment, we have observed the contrary. The measured DP cross section increases strongly with the charge of the molecular target and becomes even larger than the SEC cross section for $q = 18$ and 19 (Fig. 7). In order to analyze the role of the projectile charge, we have performed an experiment using Xe^{5+} at 80 keV colliding on trapped cyt-C $[M + 16\text{H}]^{16+}$. Although the kinetic energy of the projectile ion beam is equivalent, the yield of the DP peak was found to be significantly reduced in comparison to that obtained in collisions with Xe^{8+} . Hence, the DP peak is characterized by a large cross section and a strong dependency on both the charge of the target molecule and the charge of the projectile. These features suggest that the observed charge sensitive DP process seems to be driven by the long-distance Coulomb interaction between the multicharged incident ion and the protons and it occurs in long-distance collisions rather than in short-distance head-on collisions.

To remove a H^+ from a protonated molecule, the minimum energy cost is given by the apparent proton affinity (A_p^{app}) i.e., the apparent binding energy of the proton. For multiply protonated ions, the apparent binding energy of the proton at site t is specified by $(A_p)_t^{\text{app}}$. Williams and co-workers [21] have proposed the following relation,

$$(A_p)_t^{\text{app}} = (A_p)_{\text{intrinsic},t} - \sum_{i=1, i \neq t}^q \frac{1}{R_{i,t}}, \quad (5)$$

where the first term $(A_p)_{\text{intrinsic},t}$ is the proton affinity of a molecule protonated at site t (the A_p of the basic site in the absence of other charges) and the second term corresponds to the decrease of the binding energy of this proton due to its interaction with the protons at all other sites. We estimated $(A_p)_t^{\text{app}}$ for two extreme conformational cases of a model cyt-C: a native structure (ICYC) based on the x-ray diffraction analysis taken from the protein data base pdb [38] and an extended structure built by setting the two dihedral angles on both sides of each peptide bond to 180° . Views of both obtained structures are shown in Fig. 5. As the peptide sequence of bovine cyt-C contains 20 basic functional groups (see Fig. 5) that can be readily protonated, i.e., 18 lysine (K) and two arginine (R) residues, these groups were considered as the most likely sites for positive charge localization. The distribution of the q charges among these 20 possible sites ($2+ \leq q \leq 20+$) was then determined for each structure by minimizing the Coulomb energy, $\sum_{i=1}^q \sum_{j>i}^q \frac{1}{R_{i,j}}$, under the assumption that each proton from a basic residue carried a full $+1$ charge. For the minimized distribution, $(A_p)_t^{\text{app}}$ of protons at all occupied sites was calculated with Eq. (5) using

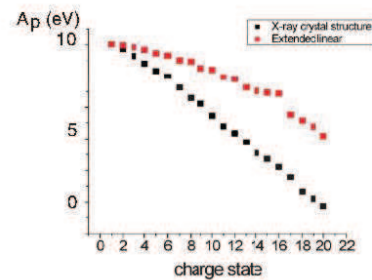


FIG. 8. (Color online) Calculated apparent proton affinity as a function of the charge of protonated cyt-C, $[M + q\text{H}]^{q+}$.

a constant value $(A_p)_{\text{intrinsic},t} = 10.4$ eV, corresponding to the proton affinity of lysine residues [21]. The minimum value of $(A_p)_t^{\text{app}}$ was defined as the apparent proton affinity of the molecule, A_p^{app} .

The calculated value of A_p^{app} is plotted in Fig. 8 as a function of q for the two conformations. As expected, the extended linear conformation leads to higher A_p^{app} . The difference between A_p^{app} of native and linear conformations increases from 0.2 to 4.7 eV as the charge q increases from 2+ to 20+. For the native structure, on average, each additional charge lowers A_p^{app} by ~ 0.6 eV. A negative A_p^{app} value is reached for $q > 19$, which corresponds therefore to the maximum charge of this structure. For the extended structure, the decrease of A_p^{app} with q is less important and the value of A_p^{app} remains positive over the whole charge range investigated. These modeled values are in good agreement with those reported by Williams and co-workers [21] using a similar point-charge approach. For the extended configuration, we note also an abrupt decrease of A_p^{app} at charge 16+ and a larger slope in the high charge range. In fact, for $q \geq 16$, extra sites unoccupied at low charge state are involved in the protonation process, for example, the C terminal (103), the P residue (75) and some K residues (12, 54, and 86) (Fig. 5). Some of these sites are located very close to other adjacent protonation sites already filled. Interaction between protons at shorter distance leads to the decrease of $(A_p)_t^{\text{app}}$ of the engaged protonation sites. This explains the fast variation of A_p^{app} with q from 16+ to 19+.

The decrease of A_p^{app} with increasing q is in qualitative agreement with the measured variation tendency of σ_{DP} . Indeed, for molecules in higher charge states, less energy is needed to remove a proton. As a consequence, the proton loss can occur at larger collision distances leading to a larger DP cross section. The underlying mechanism for proton loss, however, is still unclear. A plausible explanation is the following: During the approach of the multicharged projectile, the electronic cloud of the target molecule, which ensures the binding of the nearest H^+ , is most strongly polarized. This may lead to a temporary suppression of the binding "barrier" of the proton. As long as the duration for the barrier suppression is comparable to the period of H^+ oscillation, the proton might escape from the parent molecule during the collision.

IV. CONCLUSION

In summary, in collisions between Xe^{8+} and cyt-C $[M+q\text{H}]^{q+}$ at 96 keV, for charge state from $q = 15$ to $19+$, the single and double electron capture (SEC and DEC) processes dominate and leave the protein intact. The cross sections for these processes remain nearly constant with the charge of the protonated cyt-C. The measured population depletion ratio due to ion impact increases with the charge of the molecule showing the same tendency as the electron capture cross section estimated with the over-the-barrier model. Unexpected peaks, $[M+(q-1)\text{H}]^{q-1+}$, are observed with increasing cross section for q varying from $15+$ to $19+$. These peaks are

attributed to the deprotonation process, DP, i.e., the loss of a proton from the parents $[M+q\text{H}]^{q+}$. The variation of the measured cross section σ_{DP} as a function of q is in good accordance with the calculated proton affinities of cyt-C $[M+q\text{H}]^{q+}$ showing a monotonic decrease with increasing charge q . This DP process is tentatively interpreted as due to the temporary barrier suppression for the binding of a H^+ in long-distance interactions between the multicharged projectile and the binding electronic cloud. More experiments using projectile ions at different velocities and charge states would be needed in order to confirm the attribution of the deprotonation process and get more insight on the proton loss dynamics.

- [1] M. Barat and P. Roncin, *J. Phys. B* **25**, 2205 (1992).
- [2] H. Bruhns, H. Kreckel, K. A. Miller, X. Urbain, and D. W. Savin, *Phys. Rev. A* **82**, 042708 (2010).
- [3] C. C. Havener, E. Galutschek, R. Rejoub, and D. G. Seely, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* **261**, 129 (2007).
- [4] H. Cederquist, A. Fardi, K. Haghghat, A. Langereis, H. T. Schmidt, S. H. Schwartz, J. C. Levin, I. A. Sellin, H. Lebius, B. Huber, M. O. Larsson, and P. Hvelplund, *Phys. Rev. A* **61**, 022712 (2000).
- [5] L. Chen, S. Martin, J. Bernard, and R. Brédy, *Phys. Rev. Lett.* **98**, 193401 (2007).
- [6] T. Majima, Y. Nakai, T. Mizuno, H. Tsuchida, and A. Itoh, *Phys. Rev. A* **74**, 033201 (2006).
- [7] B. Manil, L. Maunoury, B. A. Huber, J. Jensen, H. T. Schmidt, H. Zettergren, H. Cederquist, S. Tomita, and P. Hvelplund, *Phys. Rev. Lett.* **91**, 215504 (2003).
- [8] L. Chen, J. Bernard, A. Denis, S. Martin, and J. Désesquelles, *Phys. Scr.*, **T 80**, 52 (1999).
- [9] J. de Vries, R. Hoekstra, R. Morgenstern, and T. Schlathöler, *Phys. Rev. Lett.* **91**, 053401 (2003).
- [10] P. Moretto-Capelle and A. Le Padellec, *Phys. Rev. A* **74**, 062705 (2006).
- [11] R. Brédy, J. Bernard, L. Chen, G. Montagne, B. Li, and S. Martin, *J. Chem. Phys.* **130**, 114305 (2009).
- [12] F. Alvarado, J. Bernard, B. Li, R. Brédy, L. Chen, R. Hoekstra, S. Martin, and T. Schlathöler, *ChemPhysChem* **9**, 1254 (2008).
- [13] V. Bernigaud, B. Manil, L. Maunoury, J. Rangama, and B. A. Huber, *Eur. Phys. J. D* **51**, 125 (2009).
- [14] S. Bari, R. Hoekstra, and T. Schlathöler, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 3376 (2010).
- [15] S. A. McLuckey and T.-Y. Huang, *Anal. Chem.* **81**, 8669 (2009).
- [16] J. A. Madsen, M. W. Gardner, S. I. Smith, A. R. Ledvina, J. J. Coon, J. C. Schwartz, G. C. Stafford, and J. S. Brodbelt, *Anal. Chem.* **81**, 8677 (2009).
- [17] J. J. Coon, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, and J. E. P. Syka, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **16**, 880 (2005).
- [18] J. J. Coon, B. Ueberheide, J. E. P. Syka, D. D. Dryhurst, J. Ausio, J. Shabanowitz, and D. F. Hunt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 9463 (2005).
- [19] W. Herron, D. Goeringer, and S. McLuckey, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 11555 (1995).
- [20] M.-S. Kim and A. Pandey, *Proteomics* **12**, 530 (2012).
- [21] P. D. Schnier, D. S. Gross, and E. R. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 6747 (1995).
- [22] W. Herron, D. Goeringer, and S. McLuckey, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **6**, 529 (1995).
- [23] A. R. Milosavljevic, C. Nicolas, J. Lemaire, C. Dehon, R. Thissen, J.-M. Bizau, M. Refregiers, L. Nahon, and A. Giuliani, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 15432 (2011).
- [24] M. Vonderach, O. T. Ehrler, K. Matheis, T. Karpuschkin, E. Papalazarou, C. Brunet, R. Antoine, P. Weis, O. Hampe, M. M. Kappes, and P. Dugourd, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 15554 (2011).
- [25] B. A. Budnik, Y. O. Tsybin, P. Hakansson, and R. A. Zubarev, *J. Mass Spectrom.* **37**, 1141 (2002).
- [26] A. Giuliani, A. R. Milosavljevic, K. Hinsen, F. Canon, C. Nicolas, M. Refregiers, and L. Nahon, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **51**, 9552 (2012).
- [27] D. E. Clemmer and M. F. Jarrold, *J. Mass Spectrom.* **32**, 577 (1997).
- [28] S. Bari, R. Hoekstra, and T. Schlathöler, *Int. J. Mass Spectrom.* **299**, 64 (2011).
- [29] G. C. McAlister, W. T. Berggren, J. Griep-Raming, S. Horning, A. Makarov, D. Phanstiel, G. Stafford, D. L. Swaney, J. E. P. Syka, V. Zaboloskov, and J. J. Coon, *J. Proteome Res.* **7**, 3127 (2008).
- [30] A. Niehaus, *J. Phys. B* **19**, 2925 (1986).
- [31] B. O. Forsberg, J. D. Alexander, T. Chen, A. T. Pettersson, M. Gatchell, H. Cederquist, and H. Zettergren, *J. Chem. Phys.* **138**, 054306 (2013).
- [32] F. Gaie-Levrel, G. A. Garcia, M. Schwell, and L. Nahon, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 7024 (2011).
- [33] S. Martin, L. Chen, A. Denis, and J. Désesquelles, *Phys. Rev. A* **59**, R1734 (1999).
- [34] S. Martin, L. Chen, A. Salmoun, B. Li, J. Bernard, and R. Brédy, *Phys. Rev. A* **77**, 043201 (2008).
- [35] S. Martin, L. Chen, A. Denis, R. Brédy, J. Bernard, and J. Désesquelles, *Phys. Rev. A* **62**, 022707 (2000).
- [36] F. Chandezon, T. Bergen, A. Brenac, C. Guet, B. A. Huber, H. Lebius, and A. Pesnelle, *Phys. Rev. A* **63**, 051201 (2001).
- [37] L. Chen, B. Wei, J. Bernard, R. Brédy, and S. Martin, *Phys. Rev. A* **71**, 043201 (2005).
- [38] <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>.

Développement instrumental en spectrométrie de masse pour le diagnostic in vitro en microbiologie clinique

La spectrométrie de masse, en particulier le couplage HPLC/MRM³, est un outil bien adapté au diagnostic in vitro, particulièrement en microbiologie clinique. L'utilisation en routine de cette technologie est cependant tributaire de sa sensibilité et de sa spécificité.

Ce travail de thèse a pour objectif d'étudier la possibilité d'éjecter et de détecter simultanément et de façon sélective des ions de ratio masse/charge donnés, ceux-ci étant confinés dans un piège ionique quadrupolaire.

Cette approche permet de supprimer les étapes de balayage en masse et d'intégration mathématique du signal en mode MRM³ ce qui permet de gagner à la fois en sensibilité et en spécificité (en diminuant le temps de cycle et en diminuant le rapport signal sur bruit).

Cet objectif a été poursuivi premièrement par une étude théorique approfondie des équations du mouvement des ions dans un piège radiofréquence ; deuxièmement par une étude numérique de la stabilité de ces équations et enfin troisièmement par une validation expérimentale de ces résultats théoriques. La présentation de ces trois approches fait l'objet du présent mémoire.

Mots clés

Spectrométrie de masse, Équations de Mathieu, Diagrammes de stabilité, Résonance paramétrique, Éjection simultanée

Instrumental development in mass spectrometry for in vitro diagnostic in clinical microbiology

Mass spectrometry, and more specifically HPLC/MRM³, is a very suitable tool for in vitro diagnostic. Nevertheless high sensitivity and specificity has to be reached for one to use mass spectrometry as a routine technique in clinical microbiology.

The objective of this work is to study the possibility of ejecting, and thus detecting, simultaneously ions of several desired m/z ratio stored in a quadrupolar ion trap. This approach allows suppressing altogether the mass scan and mathematical integration stages, leading to an improvement of the signal-to-noise ratio and a decrease of the cycle time which increase both sensitivity and specificity.

This objective was carried out by an extensive mathematical and numerical study of the stability of the ions' motion equation comforted by experimental data.

Discipline

Physique instrumentale

Institut Lumière Matière (UMR5306)

Cité Lyonnaise de l'Environnement et de l'Analyse

5, rue de la Doua

69100 Villeurbanne, France