

d'ordre : 1422

50376
1987
329

50376
1987
329

MÉMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

EN BIOCHIMIE

par

Patrick BOULENGUER



APPLICATIONS DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE, DU COUPLAGE LC-MS ET DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE SUPERCRITIQUE A L'ETUDE DES DERIVES GLUCIDIQUES

Soutenu le 8 Décembre 1987 devant la Commission d'Examen

Président :	J. MONTREUIL
Rapporteur :	G. STRECKER
Examineurs :	B. FOURNET
	J. PROMÉ

A mes parents

A mon frère

A Monsieur le Professeur J. Montreuil,

Soyez remercié très sincèrement de m'avoir accepté dans votre laboratoire qui est internationalement reconnu pendant ces trois années. Ma formation, votre renommée ainsi que celle du laboratoire seront une aide précieuse dans ma carrière future.

A Monsieur le Professeur B. Fournet,

Vous m'avez accueilli avec beaucoup de gentillesse dès mon entrée en D.E.A., ensuite vous m'avez permis de travailler sur un sujet très technique, enfin vous m'avez donné la possibilité, grâce à des travaux d'intérêts industriels, de trouver un travail immédiatement à la sortie de ma thèse. Soyez en vivement remercié ainsi que de vos conseils pour avoir essayé de mettre un peu de rigueur dans ma façon anarchique de travailler

A Monsieur G. Strecker, Directeur de recherche au C.N.R.S.

J'ai été très heureux de vous avoir dans mon jury de thèse à cause de votre immense culture dont vous savez si bien faire profiter les autres.

A Monsieur J. Promé, Directeur de recherche au C.N.R.S.

J'ai été très impressionné par la pertinence de vos commentaires lors de la soutenance de ma thèse. Je n'ai que le regret de ne pas pouvoir les mettre en pratique, ils seront toutefois utiles pour tous les chercheurs du laboratoire qui s'occupent de spectrométrie de masse.

A Monsieur Y. Leroy,

Je te remercie pour m'avoir appris à manipuler et pour m'avoir fait découvrir les secrets de tous les appareils sur lesquels nous avons travaillé ensemble.

Mes remerciements vont également à

-Monsieur G. Ricart pour son aide constante en spectrométrie de masse

-Madame Celen qui m'a permis de réaliser ce travail

Enfin je remercie le Conseil Régional de la Région Nord Pas-de Calais, le C.N.R.S., le Ministère de la Recherche et de la Technologie, le Ministère de l'éducation, l'I.N.S.E.R.M., l'A.R.C. et le laboratoire Régional Scientifique de la Police pour leur contribution à l'acquisition du spectromètre de masse KRATOS MS-50 RF sans lequel ce travail n'aurait pu être fait.

ABREVIATIONS

CPG (GLC): Chromatographie en phase gazeuse (Gas liquid chromatography)

CLHP (HPLC) :Chromatographie liquide haute performance (high performance liquid chromatography)

HEPT (H): Hauteur équivalente à un plateau théorique

CPS (SFC): chromatographie en phase supercritique (supercritical fluid chromatography)

SFC/MS : Supercritical fluid /mass spectrometry

GLC/MS: gas liquid chromatography mass spectrometry

DP : degré de polymérisation

LC/MS : Liquid chromatography mass spectrometry

EI : Electronic impact

CI (CIMS) : Chemical ionisation (chemical ionisation mass spectrometry)

FI : Field ionisation

FD : Field désorption

DCI : Desorption chemical ionisation

LDMS :laser desorption mass spectrometry

PDMS : plasma desorption mass spectrometry

SIMS : Secondary ion mass spectrometry

FAB/MS : Fast atom bombardment mass spectrometry

AP (PA): affinité protonique (protonic affinity)

NICI : negative ion chemical ionisation

LC/MS : Liquid chromatography /mass spectrometry

IKES : Ion kinetic energy spectrum

MIKES : Mass ion kinetic energy spectrum

DADI : Direct analysed of daughter ions

CID : Collision induced dissociations

PI : potentiel d'ionisation

MS/MS : tandem mass mass

LNT : Lacto-N-tetraose

RIC: reconstucted ion chromatograph

FID : Flam ionisation detector

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

GENERALITES

I) LES TECHNIQUES DE SEPARATION	3
<u>A) La chromatographie en phase gazeuse (CPG)</u>	3
1) Les améliorations	3
a) Les colonnes capillaires	4
b) Les colonnes "wide bore"	6
c) La multidimensionnelle	8
2) Conclusion	10
<u>B) La chromatographie liquide haute performance (CLHP)</u>	11
1) Les améliorations	11
a) Les colonnes capillaires	12
i) Les avantages	12
ii) Les inconvénients	13
b) Les colonnes capillaires remplies	14
2) Conclusion	14
<u>C) La chromatographie en phase supercritique (CPS)</u>	15
1) Propriétés des fluides supercritiques	15
a) Propriétés thermodynamiques	15
b) Propriétés physico-chimiques	15
2) La chromatographie en phase supercritique	18
a) Les gradients d'élution : influence de la pression et de la température	20
b) Influence de la nature du fluide supercritique et des modificateurs polaires	21

3)Conclusion	21
II)LES TECHNIQUES DE COUPLAGE	25
<u>A)Couplages avec la CPG</u>	25
1)Colonnes remplies	25
2)Colonnes capillaires	27
<u>B)Couplages avec l'HPLC</u>	27
1)Colonnes remplies	27
a)Nécessité de méthodes spécifiques à l'HPLC	27
i)A cause de la diversité des éluants	27
ii)A cause de l'importance des débits gazeux à évacuer	27
iii)A cause des caractéristiques des échantillons à analyser	29
b)Les techniques de couplage	29
i)Les méthodes d'enrichissement	29
ii)Les nébulisateurs	26
2)Colonnes capillaires	32
<u>C)Conclusion</u>	34
III)LES MODES D'IONISATION	35
<u>A)L'impact électronique (EI)</u>	35
1)Principe	35
2)La source	36
3)Analyse des sucres	36
<u>B)L'ionisation chimique(CI ou CIMS)</u>	38
1)Principe	38
2)La source	39
3)Les réactions	39

4)Analyse des sucres	44
<u>C)Ionisation de champ (FI) et désorption de champ (FD)</u>	44
1)Principe	44
2)La source	45
3)Analyse des sucres	45
<u>D)Laser désorption (LDMS)</u>	49
1)Principe	49
2)Analyse des sucres	49
<u>E)Plasma désorption (PDMS)</u>	50
1)Principe	50
2)Applications de la PDMS	50
<u>F)Secondary ionisation mass spectrometry (SIMS) et Fast atom bombardment (FAB)</u>	50
1)Principe	50
2)La source	51
3)Analyse des sucres	51
 IV) IONS METASTABLES, COLLISION, TANDEM MASS MASS	55
<u>A)L'analyseur</u>	55
1)Analyseur magnétique	55
2)Analyseur électrostatique	56
<u>B)Les ions métastables</u>	57
1)Détection des ions fragments issus d'ions métastables par variation d'un champ	57
a)Avec un appareil à géométrie normale	59
b)Avec un appareil à géométrie inversée	59
2)Détection des ions fragments issus d'ions métastables par variation de deux champs	60

a) Maintient de B/E constant	61
b) Maintient de B ² /E constant	61
<u>C) Collision induced dissociation CID</u>	62
<u>D) Tandem mass mass (MS/MS)</u>	62
1) Utilisation de la mass-mass pour l'analyse des sucres	63

RESULTATS

I) COMPARAISON DE LA SONDE FAB CONVENTIONNELLE ET DE LA SONDE FAB A DEBIT CONTINU	66
--	----

<u>A) Matériel et méthodes</u>	66
1) Choix de l'oligosaccharide	66
2) Les sondes	66
3) Le spectromètre de masse	69
<u>B) Résultats</u>	69
<u>C) Conclusion</u>	70

II) UTILISATION DE LA SONDE A DEBIT CONTINU COMME INTERFACE	72
---	----

<u>A) Matériel et méthodes</u>	72
1) Choix du mélange d'oligosaccharides	72
2) La sonde	72
3) La colonne	72
4) Le spectromètre de masse	73
<u>B) Résultats</u>	73
<u>C) Discussion</u>	78
1) La colonne	78

2) L'interface	80
<u>D) Conclusion</u>	81
ARTICLE : Continuous flow FAB Mass spectrometry of permethylated oligosaccharides : a comparative study of direct mixture analysis with packed capillary column liquid chromatography FAB mass spectrometry.	
	82
III) LA CHROMATOGRAPHIE SUPERCRITIQUE	89
<u>A) Matériel et méthodes</u>	89
1) Echantillons analysés	89
2) L'appareil de chromatographie en fluide supercritique	89
a) Le solvant	89
b) La pompe	92
c) L'injecteur	92
d) Le diviseur ou splitter	92
e) Les colonnes	93
f) Le restricteur	93
g) Le détecteur	93
h) Le four	94
<u>B) Résultats</u>	95
<u>C) Discussion</u>	95
1) Le détecteur	98
2) Le restricteur	98
3) Les conditions d'analyse	99
<u>D) Conclusion</u>	101

CONCLUSION GENERALE

APPENDICE TECHNIQUE

<u>Préparation des échantillons</u>	105
A) <u>Méthylation par la méthode de Ciucanu et Kerek</u>	105
B) <u>Préparation des oligosaccharides de poule</u>	105
1) Préparation de l'ovomucoïde	105
2) Préparation des glycopeptides	105
3) Préparation des glycopeptides β	107
4) Isolation des oligosaccharides	108
5) Séparation des oligosaccharides alditols par HPLC	109

ANNEXE

<u>Principales valeurs chromatographiques</u>	110
A) <u>N : nombre de plateaux théoriques ou efficacité</u>	110
B) <u>k' : facteur de capacité</u>	110
C) <u>α' : sélectivité</u>	110
D) <u>R : résolution</u>	110
E) <u>H : hauteur équivalente à un plateaux théorique : (HEPT)</u>	112

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

La séparation et la détermination des structures des sucres n'ont jamais été aisées. En effet, les oligosaccharides sont des polymères qui ne varient que par le nombre, la nature et l'enchaînement de leurs monosaccharides constitutifs.

Les progrès réalisés dans les dosages des monosaccharides se sont amorcés avec l'arrivée de la chromatographie en phase gazeuse (GLC). Un renouveau de cette technique est venu avec l'apparition des colonnes capillaires beaucoup plus efficaces. Celles-ci permettent le dosage de micro-quantités.

En 1969, l'apparition de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) a donné un nouvel essor aux techniques séparatives. Elle a permis d'obtenir des résultats très intéressants dans la séparation des monosaccharides et des oligosaccharides.

A l'heure actuelle, cette méthode se révèle avoir des limitations par l'impossibilité d'améliorer les supports chromatographiques et surtout par la faible diffusion moléculaire dans les liquides. Cette stagnation au niveau des performances est en passe d'être résolue par l'apparition de la chromatographie en phase supercritique (SFC).

En même temps que les techniques de séparation progressaient, il apparaissait de nouvelles interfaces permettant le couplage de ces nouvelles techniques de séparation à la spectrométrie de masse.

Le but de nos généralités est de faire le point sur toutes les méthodes de séparation, et sur leurs performances respectives. Ensuite nous décrirons les couplages qu'il est possible de réaliser avec les spectromètres de masse et les différents modes d'ionisation. Enfin nous étudierons les ions métastables, les collisions et la spectrométrie de masse en tandem, cette dernière technique permettant l'utilisation du spectromètre de masse comme appareil de séparation.

Ces travaux s'inscrivent dans le cadre général des recherches sur les glycanes réalisés dans l'Unité Associée au C.N.R.S n° 217. Ils ont fait l'objet des communications et du mémoire suivant :

COMMUNICATIONS

1. P. BOULENGUER, Y. LEROY, J.M. ALONSO, J. MONTREUIL, G. RICART, C. COLBERT, D. DUQUET, C. DEWAELE and B. FOURNET.

"Analyses of permethyl-oligosaccharides by continuous flow FAB-MS and by coupling LC-MS with continuous flow FAB as interface".

Communication par affiche présentée :

au "IX th International Symposium on Glycoconjugates, LILLE, FRANCE. July 6-11, 1987"

et au "International Symposium on Applied Mass Spectrometry in Health Sciences" September 28-30, 1987.

MEMOIRE

1. P. BOULENGUER, Y. LEROY, J.M. ALONSO, J. MONTREUIL, G. RICART, C. COLBERT, D. COLBERT, D. DUQUET, C. DEWAELE and B. FOURNET

"Continuous-Flow Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometry of Permethylated Oligosaccharides : A Comparative Study of Direct Mixture Analysis with Packed Capillary Column Liquid Chromatography-Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometry".

Anal. Biochem. 168 (1988) 000-000.

GENERALITES

I) LES TECHNIQUES DE SEPARATION

A) La chromatographie en phase gazeuse (CPG) (1-4)

Apparue déjà depuis de nombreuses années, la GLC est devenue rapidement la méthode d'analyse de routine du laboratoire. La séparation en GLC demande aux produits analysés une certaine volatilité pour pouvoir être élués par le gaz vecteur. Cela limite son utilisation :

- aux produits de faible masse moléculaire.
- aux produits ayant un point d'ébullition assez bas, ou thermiquement stable.

Cet inconvénient est en parti pallié par la dérivation qui abaisse le point d'ébullition. Cependant, il n'est généralement pas possible de volatiliser des structures supérieures à des tétrasaccharides. En effet il faudrait alors chauffer à des températures supérieures à 350°C, ce qui provoquerait des pyrolyses.

La GLC reste malgré tout un excellent moyen d'analyse puisqu'elle permet de séparer et de doser tous les monosaccharides sur des quantités inférieures au microgramme. La GLC est aussi un moyen de détermination structurale grâce à l'analyse des éthers méthyliques obtenus par perméthylation, hydrolyse et peracétylation des composés glucidiques. Cette méthodologie permet de connaître le point de branchement des liaisons glycosidiques.

1) les améliorations

S'il reste impossible d'analyser des produits de masse moléculaire élevée, des progrès ont cependant été accomplis au niveau de la séparation et des quantités détectables, par l'amélioration des colonnes (apparition des colonnes capillaires, des colonnes "wide bore") et des appareils (apparition de la chromatographie multidimensionnelle).

a) les colonnes capillaires

La diffusion moléculaire très intense des gaz a facilité l'utilisation de la colonne capillaire en chromatographie en phase gazeuse. En effet, malgré le très faible volume de phase stationnaire, les échanges de soluté entre phase gazeuse et phase stationnaire restent importants. La très grande longueur qu'il est possible de donner à ces colonnes augmente le nombre de plateaux théoriques, cela permet d'obtenir des pics très fins, où le produit sort très concentré. La détection est donc très sensible. En effet, la concentration maximale d'un pic est inversement proportionnelle au carré du diamètre. Pour une même quantité injectée, diminuer par deux le diamètre d'une colonne équivaut à augmenter la réponse par quatre au niveau du détecteur sans variation de la qualité de séparation.

Nous pouvons quantifier les avantages des colonnes capillaires en analysant l'équation de Van Deemter (5) décrivant la cinétique de la chromatographie. (voir Fig.1 p.5, voir aussi l'annexe)

$$H = A+B/U+CU$$

H est la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT), A est l'anisotropie d'écoulement, B correspond à la diffusion longitudinale, U la vitesse de la phase mobile, et C la résistance aux transferts de masse.

-A : anisotropie d'écoulement

A exprime l'inégalité d'écoulement due aux différents chemins possibles de la phase mobile à travers la silice. Ce facteur est bien sur nul dans le cas des capillaires ce qui diminue la valeur de H.

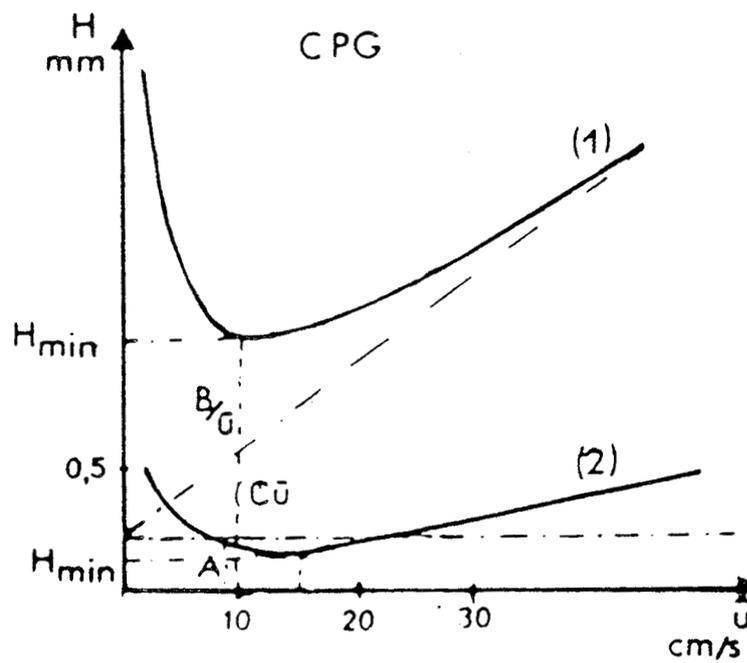


FIGURE 1

Diagramme : hauteur équivalente d'un plateau théorique en millimètre en fonction du débit linéaire du gaz vecteur en cm/s (courbe de Van Deemter).

- 1) pour une colonne remplie (1) (4)
- 2) pour une colonne capillaire (2) (4)

-B : rediffusion des molécules

B exprime la rediffusion des molécules dans la colonne. Il est évident que celle-ci doit être la plus petite possible. C'est en général le cas à cause des débits importants de gaz vecteur, surtout en colonne capillaire.

-C : résistance aux transferts de masse

La chromatographie en colonne capillaire se caractérise par une très faible perte de charge. Le terme C est négligeable. Une colonne travaille à une pression optimum. Si la perte de charge est trop importante, il y a une différence de pression entre l'entrée et la sortie de la colonne. De plus les gaz étant compressibles, la vitesse linéaire du gaz varie tout le long de la colonne. La perte de charge est de l'ordre de 1 bar pour 100 mètres pour les colonnes capillaires, et de 1 bar par mètre pour les colonnes remplies. La vitesse est donc quasi optimale tout le long de la colonne capillaire.

L'efficacité des colonnes s'est nettement améliorée par l'utilisation des colonnes capillaires. Pour s'en convaincre un peu plus il suffit de remarquer que la courbe de Van Deemter (voir Fig.1 p.5) a une pente plus douce pour la colonne capillaire que pour la colonne remplie. Ce qui signifie qu'il est possible de s'écarter du débit optimum sans perdre trop d'efficacité.

b) les colonnes "wide bore" (6)

Ces colonnes se définissent par un diamètre très important (0.5 à 1mm) et des films de phase stationnaire de 2 à 5 μm . Ces colonnes "wide bore" présentent par rapport aux colonnes remplies une inertie chimique plus grande, une durée de vie plus importante, une efficacité accrue

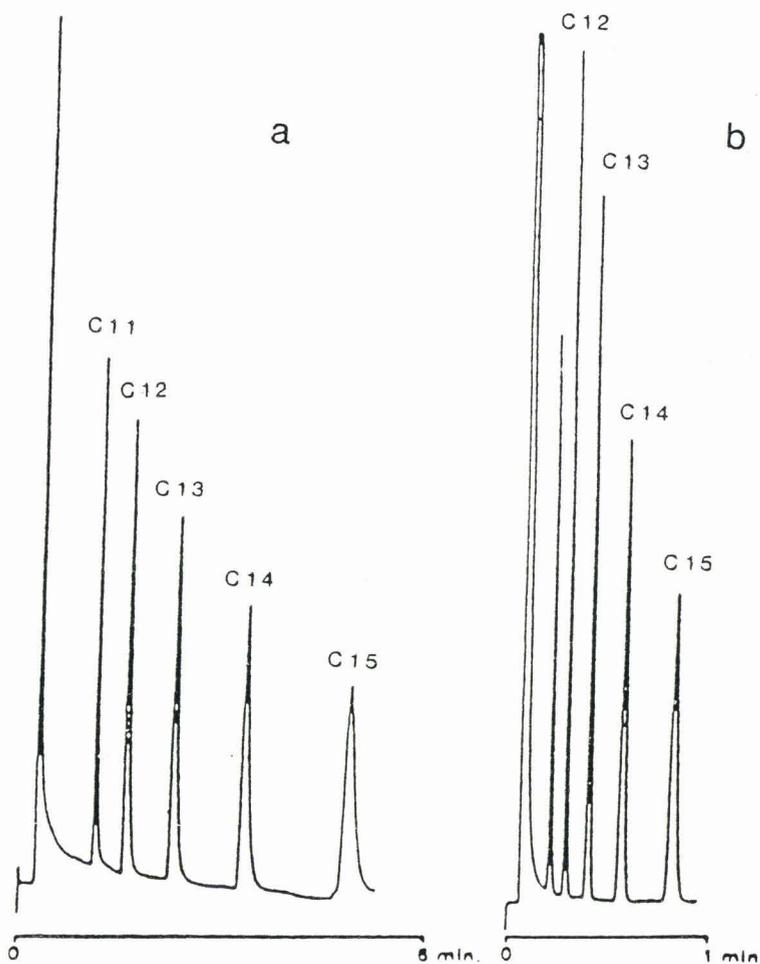


FIGURE 2

Analyse d'acides gras méthyl-esterifiés (C11 à C15)
a) sur colonne remplie (6 x 2mm remplie avec 5% d'OV 101 imprégné de Chromosorb W HP) opérant à 175°C, 22 ml/min (6)
b) sur colonne "wide bore" 10m x 0.53mm en silice fondue dans les mêmes conditions. (6)

(possibilité de faire des colonnes très longues), un très faible bruit de fond, et une rapidité d'analyse importante (3 fois plus rapide en moyenne qu'en colonne remplie). Ces colonnes présentent en outre une capacité plus grande que les colonnes capillaires conventionnelles. (Voir l'exemple de séparation Fig.2 p.7).

c) la chromatographie multidimensionnelle (7-8)

La chromatographie multidimensionnelle est fondée sur l'utilisation d'un chromatographe muni de deux fours indépendants et programmables en température. Une colonne est placée dans chacun de ces fours. Ces colonnes peuvent être soit connectées à un détecteur, soit couplées entre elles grâce à un système de commutation (voir Fig.3 p.9). Ce système permet le couplage : colonne remplie-colonne capillaire ou le couplage colonne capillaire-colonne capillaire. Le premier système sera très intéressant pour l'analyse des sucres trifluoroacétylés (Ces dérivés de sucre présentent de nombreux avantages par rapport aux dérivés triméthylsilylés, notamment la O et N trifluoroacétylation simultanée et l'insensibilité aux sels). Malheureusement, l'anhydride trifluoroacétique détruit en quelques semaines les phases greffées des colonnes capillaires, ce qui interdit leurs utilisations pour l'analyse de ces composés. Le couplage avec une colonne remplie permet de résoudre ce problème. En effet, les colonnes remplies présentent une grande facilité d'entretien, elles ont une phase stationnaire plus stable, facile à remplacer et de faible coût. Le protocole expérimental dans l'analyse des dérivés trifluoroacétylés est donc le suivant : l'échantillon est injecté dans la colonne remplie, l'élimination du solvant est suivie grâce au premier détecteur. Lorsque le solvant est éliminé, la colonne remplie est couplée à la colonne capillaire qui effectue la séparation.

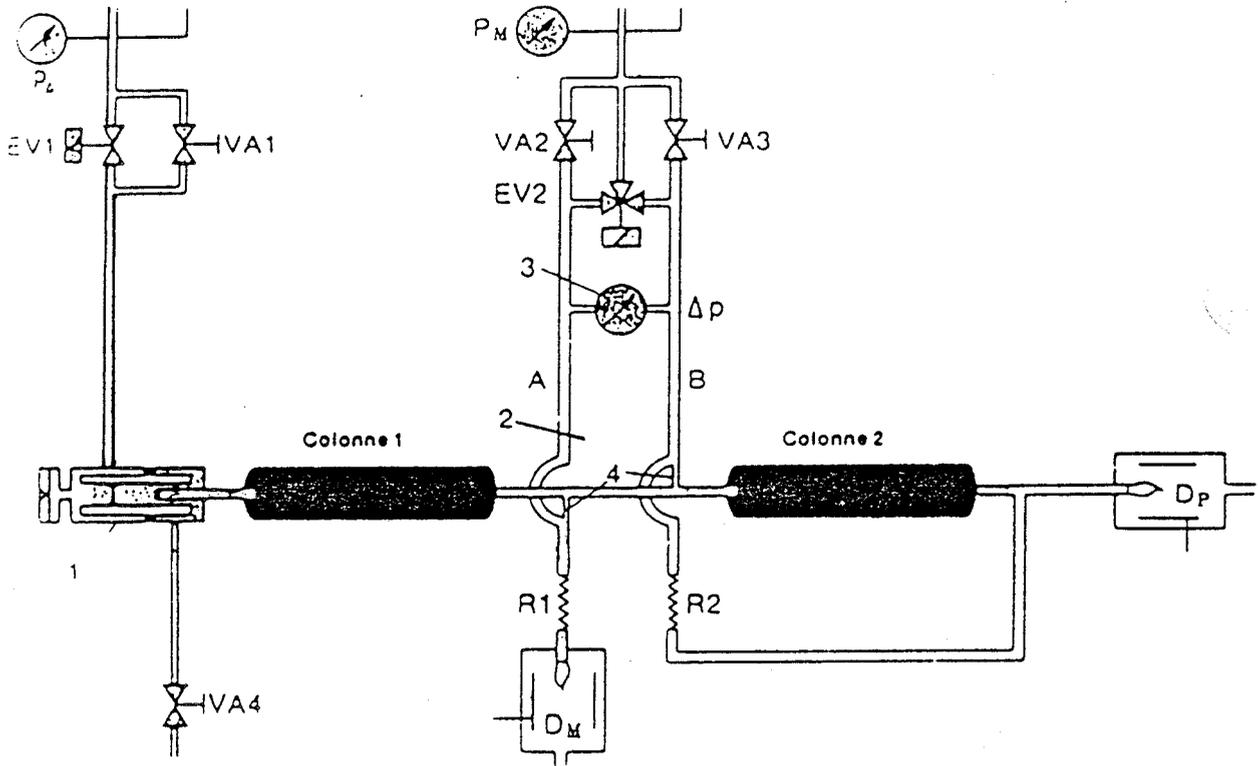


FIGURE 3

Schéma de montage d'un chromatographe multidimensionnel, muni d'une commutation de type "live" (8)

Commutation de colonne "Live"

- 1 Injecteur avec vanne de split et rinçage de septum
- 2 Accouplement "Live"
- 3 Mesure de la pression différentielle
- 4 Fente annulaire

- R Restriction
- D_M Détecteur moniteur
- D_P Détecteur principal
- P_A Pression amont
- P_M Pression milieu
- ΔP Pression différentielle
- A Circuit auxiliaire A
- B Circuit auxiliaire B

- VA Vanne à aiguille
- EV Electrovanne
- RP Régulateur de pression

Le deuxième système consiste à coupler deux colonnes capillaires. Cette technique est utilisée dans les analyses de composés qui présentent des mobilités chromatographiques similaires. Dans ce cas, ces composés sont envoyés dans la seconde colonne de polarité différente qui permet d'effectuer les séparations.

2) Conclusion

La chromatographie en phase gazeuse en colonne remplie et surtout en colonne capillaire permet une excellente séparation des produits volatils à partir de faibles quantités de départ. Dans la série des composés glucidiques qui nous intéresse plus particulièrement, cette technique est utilisée pour l'identification et le dosage des monosaccharides. En outre, elle s'adapte tout à fait au couplage avec les spectromètres de masse permettant de réaliser une meilleure identification des composés. Toutefois les composés de masse moléculaire élevée ne peuvent être analysés par cette technique (au delà du pentasaccharide par exemple). Ceci sera du ressort de la chromatographie en phase liquide et en phase supercritique.

B) La chromatographie liquide haute performance (HPLC) (9-10)

La GLC n'est utilisée que comme moyen d'analyse et d'identification des monosaccharides de part la nécessité de dériver les sucres, et de leur thermolabilité. La séparation des oligosaccharides demande d'autres moyens chromatographiques, notamment l'HPLC. Cette technique ne nécessite aucune dérivation (bien qu'on utilise parfois la benzylation pour augmenter la détection et faciliter la séparation) et permet l'isolement des glycanes de masse moléculaire élevée. Malheureusement, en HPLC, plus la masse moléculaire augmente, plus l'efficacité de la colonne décroît. Ce phénomène est dû au fait que la rapidité des échanges entre la phase mobile et la phase stationnaire est proportionnelle au diamètre des molécules analysées (à leur rayon giratoire). Ainsi, une colonne vendue avec une HEPT = 2 pour la séparation du benzène dans l'hexane n'a qu'une HEPT = 12 pour du lacto-N-tétraose. De plus, la phase mobile est un liquide. Or la diffusion moléculaire dans un liquide est en général 10 000 à 100 000 fois inférieure à celle d'un gaz et la viscosité 100 fois supérieure. Ceci aggrave encore la diminution des transferts de masse. On peut augmenter artificiellement ces transferts de masse par le chauffage, mais on est limité à 80°C (moins pour les produits sialylés à cause de leur thermolabilité). Ainsi malgré les performances des phases stationnaires employées (100 000 plateaux théoriques au mètre), il est impossible de séparer des structures supérieures à 10 ou 12 sucres en tamisage moléculaire avec une bonne résolution.

1) Les améliorations

Tous les types de colonnes ont été utilisés pour séparer les sucres avec plus ou moins de réussite : chromatographie d'échange d'ions, de partage en phase normale ou en phase inverse, chromatographie d'exclusion

d'ions, tamisage moléculaire. Il n'y a donc que peu de progrès à attendre du type de chromatographie. Une seconde limitation est due à la qualité des phases utilisées. Les particules les plus fines actuellement employées sont de 3 μm et il sera difficile d'aller en dessous à cause de l'augmentation de la perte de charge. En effet :

$$\Delta p = \phi n L u / d_p^2 \quad (11)$$

avec ϕ : facteur de résistance à l'écoulement, L : longueur de la colonne, u : la vitesse linéaire, d_p : le diamètre des particules.

La perte de charge est proportionnelle à la viscosité et inversement proportionnelle au carré du diamètre des particules. Cette limitation a donc conduit à l'utilisation de colonnes capillaires comme en CPG. Ce système présente des avantages mais aussi des inconvénients

a) Les colonnes capillaires

i) Les avantages

La colonne capillaire ne renferme pas de support. La phase est greffée, ce qui évite ainsi les problèmes causés par les particules de silice : phénomènes d'adsorption, de charge (la silice est très difficile à désactiver, c'est pourquoi la chromatographie de partage des produits sialylés est si délicate. La répulsion tend en effet à exclure les produits chargés négativement), de tamisage moléculaire des grosses molécules qui empêche leur partition.

La colonne capillaire se caractérise par un nombre de plateaux théoriques importants. Un moyen de comparer colonnes remplies et colonnes capillaires est la mesure de l'impédance de séparation (12)

$$E = H/d^2 \cdot \phi \text{ et } E = \frac{\Delta p \cdot t_m}{N^2 \cdot \eta}$$

H, est la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT), d, le diamètre des particules pour les colonnes remplies ou le diamètre du tube pour les colonnes capillaires, ϕ le facteur de résistance à l'écoulement, Δp est la perte de charge, t_m le temps mort, η la viscosité de la phase mobile et N le nombre de plateaux théoriques.

	H/d opt	ϕ	E
colonne capillaire	0.8	32	20
colonne remplie	2	500	2000

plus E est faible meilleur est le système

Dans les mêmes conditions de perte de charge et de temps, une capillaire génère 10 fois plus de plateaux qu'une colonne remplie. Si nous souhaitons le même nombre de plateaux nous pouvons travailler 100 fois plus vite.

ii) Les inconvénients

Comme nous l'avons vu plus haut, la diffusion moléculaire dans un liquide est peu importante ce qui a pour conséquence de diminuer les interactions entre phase mobile et phase stationnaire. Cette difficulté peut être partiellement contournée par l'utilisation de colonnes de faibles diamètres (<<à 0.1mm), difficiles à réaliser techniquement ou en travaillant avec des petites vitesses linéaires. Ces conditions entraînent des temps d'analyses importants, l'injection de petits volumes (inférieur au microlitre) et la limitation maximale des volumes morts au niveau de l'injecteur et du détecteur

b) Les colonnes capillaires remplies

Pour éviter les problèmes des colonnes capillaires vraies, il est possible d'utiliser les colonnes capillaires remplies. Elles se caractérisent par des diamètres internes compris entre 0.25 et 0.50 mm pour des longueurs ne dépassant pas actuellement une vingtaine de centimètres. Elles sont garnies de particules de 1 à 5µm. La faible perte de charge de ces colonnes permettra dans un proche avenir l'utilisation de colonnes plus longues remplies avec toutes les types de phases. Le débit optimum de ces colonnes est de quelques µl/min. Cela permet de réaliser une chromatographie à l'aide de faibles quantités d'éluant (20 à 50 µl) et ainsi de coupler directement sans interface compliquée la colonne au spectromètre de masse. Pour les autres types de détection comme la fluorescence, l'analyse peut être faite directement à travers le garnissage après avoir dénudé la silice. Ce procédé qui élimine les volumes morts permet l'obtention de pics très fins et par voie de conséquence le dosage au picogramme.

2) Conclusion

Malgré les difficultés décrites ci-dessus, l'HPLC reste une méthode de choix pour séparer les molécules de nature glucidique et ses domaines d'applications restent très vastes grâce au choix important de colonnes existantes (tant au niveau des phases que des tailles de colonnes). Toutefois, il existe des molécules pour lesquelles la séparation ne peut pas être résolu par l'HPLC. C'est pourquoi depuis quelques années les chercheurs se sont tournés vers un nouveau type de chromatographie : la chromatographie en phase supercritique.

C) La chromatographie en phase supercritique (CPS) (13-30)

Nous avons vu que les limitations de l'HPLC tenaient à la faible diffusion moléculaire des solutés dans la phase mobile. La chromatographie en phase supercritique (CPS) ou supercritical fluid chromatography (SFC) a donc essayé de garder la très grande performance des phases stationnaires de l'HPLC et d'avoir une phase mobile aux propriétés proches de celles des gaz.

1) Propriétés des fluides supercritiques

a) propriétés thermodynamiques

L'état thermodynamique d'un composé est déterminé par trois variables : pression P, volume V, température T. Il existe pour toutes substances une relation entre ces trois variables connue sous le nom de relation d'état. (Voir Fig.4 p.16)

Ces diagrammes situent les trois états de la matière. Les courbes (S-L) et (S-V) symbolisent une discontinuité dans la masse volumique. Au delà du point C, Il y a passage de l'état liquide à l'état "gaz comprimé" sans discontinuité dans la masse volumique. Ainsi au delà de C nous avons un état intermédiaire entre l'état liquide et l'état gazeux qui s'appelle "état critique" où si nous nous éloignons de C "état supercritique".

b) Propriétés physico-chimiques

Comme en GLC, l'influence de la nature et de la composition du fluide supercritique sur la qualité d'une séparation est importante. Il est donc essentiel de connaître les propriétés physico-chimiques des fluides supercritiques. Le tableau I p.17 donne des ordres de grandeur pour les liquides, les gaz et les fluides supercritiques des trois paramètres

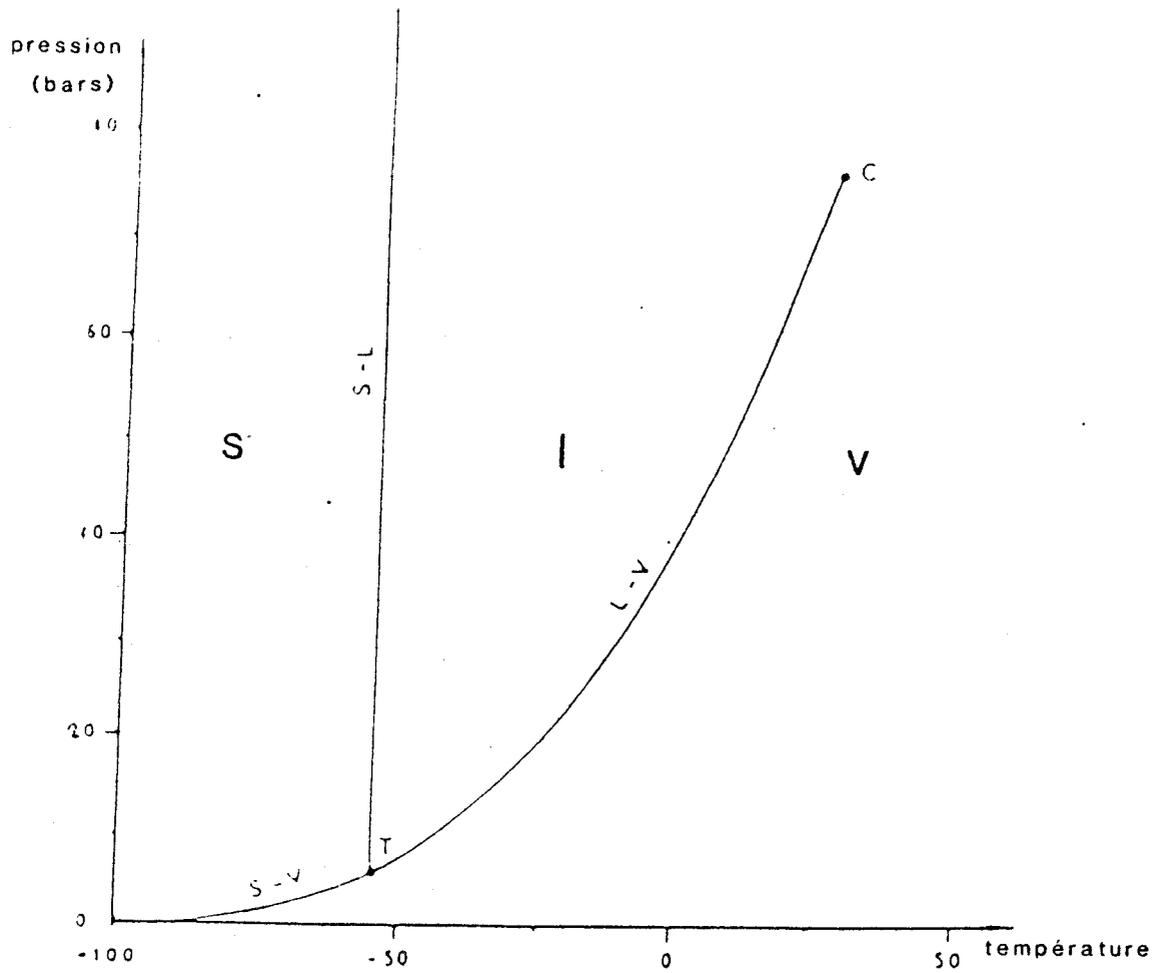


FIGURE 4

Diagramme pression température pour le CO2 .

L : phase liquide ; V : phase Vapeur ; S Phase solide ; T point triple ;
C Point critique. (28)

TABLEAU I

Ordre de grandeur de la masse volumique ρ , de la viscosité η et du coefficient d'autodiffusion D pour les gaz, les liquides et les fluides supercritiques (28)

	ρ (g.cm ⁻³)	η (cP)	D (m ² .s ⁻¹)
Gaz 1 atm, 15-30 °C	(0,6-2)10 ⁻³	(1-3)10 ⁻²	(0,1-0,4)10 ⁻⁴
Fluides supercritiques T _c , P _c T _c , 4P _c	0,2-0,5	(1-3)10 ⁻²	0,7 10 ⁻⁷
	0,4-0,9	(3-9)10 ⁻²	0,2 10 ⁻⁷
Liquides (solvants organiques, eau) (1 atm, 15 à 30 °C)	0,6-1,6	0,2-3	(0,2-2)10 ⁻⁹

suyvants : masse volumique, viscosité, coefficient d'autodiffusion (diffusion du CO₂ dans lui même).

La masse volumique d'un fluide supercritique, bien que dépendant de la pression, est beaucoup plus proche de la masse volumique d'un liquide que de celle d'un gaz.

La viscosité prend des valeurs légèrement supérieures à celle d'un gaz mais 10 à 100 fois inférieures à celle des liquides. Ceci est important, car la viscosité est responsable de la perte de charge. Il est donc possible d'utiliser des colonnes très longues.

Le coefficient de diffusion est très important, car il régit les processus de transfert de masse. Nous remarquerons que le coefficient d'autodiffusion d'un fluide supercritique est intermédiaire entre celui d'un liquide et celui d'un gaz.

Toutes les propriétés précédentes varient avec la température et la pression. En conséquence nous pouvons faire varier ces deux paramètres pour optimiser la chromatographie en fluide supercritique. La masse volumique et la viscosité d'un fluide supercritique augmentent avec la pression et diminuent avec la température. Il est à noter que dans le cas des gaz une augmentation de température provoque une augmentation de viscosité. La diffusion moléculaire augmente avec la température et diminue avec la pression .

2) Chromatographie en phase supercritique

La SFC a été utilisée pour la première fois en 1962 par Klesper et al. (31) pour la séparation de porphyrines non volatiles. Comme le laisse entrevoir les propriétés des fluides supercritiques, la SFC se situe entre la chromatographie en phase liquide et gazeuse. La SFC en effet combine la sélectivité de l'HPLC et la grande efficacité par unité de temps de la GLC.



TABLEAU II

Propriétés de solvants susceptibles d'être utilisés en chromatographie en phase supercritique (28)

Composé	Température d'ébullition (°C) (latm)	Données au point critique		
		T _c (°C)	P _c (atm)	(g/cm ³)
Protoxyde d'azote	- 89	36,5	71,4	0,457
Dioxyde de carbone	- 78,5*	31,0	73,8	0,448
Dioxyde soufre	- 10	157,5	77,6	0,524
Hexafluorure de soufre	- 63,8*	45,6	37,1	0,752
Ammoniac	- 33,4	132,3	111,3	0,24
Eau	100	374,4	226,8	0,344
Méthanol	64,7	240,5	78,9	0,272
Ethanol	78,4	243,4	63,0	0,276
Isopropanol	82,5	235,3	47,0	0,273
Ethane	- 88	32,4	48,3	0,203
n-Propane	- 44,5	96,8	42,0	0,220
n-Butane	- 0,5	152,0	37,5	0,228
n-Pentane	36,3	196,6	33,3	0,232
n-Hexane	69,0	234,2	29,6	0,234
n-Heptane	98,4	267,0	27,0	0,235
Diméthyl-2,3 butane	58,0	226,8	31,0	0,241
Benzène	80,1	288,9	48,3	0,302
Ether éthylique	34,6	193,6	36,3	0,267
Méthyléthyléther	7,6	164,7	43,4	0,272
Dichlorodifluorométhane	- 29,8	111,7	39,4	0,558
Dichlorofluorométhane	8,9	178,5	51,0	0,522
Trichlorofluorométhane	23,7	196,6	41,7	0,554
Dichlorotétrafluoroéthane	3,5	146,1	35,5	0,582

* température de sublimation

Les principaux fluides utilisés en SFC sont recensés dans le tableau II p.19. Il résume les propriétés (température d'ébullition, température et pression critique ainsi que la masse volumique) au point critique de ces solvants. La lecture de ce tableau nous permet de constater que la plupart des composés possèdent des propriétés incompatibles avec la stabilité de certaines molécules organiques, en particulier les hydrates de carbone (température critique trop élevée). Parmi les solvants les plus utilisés se trouve le CO₂, ceci pour plusieurs raisons : faible température et faible pression critique (31.3°C et 72.9 atm), de plus il n'est ni toxique ni inflammable. Il n'absorbe pas jusqu'à 200 nm. Enfin la récupération des solutés dans le cas d'une chromatographie préparative est aisée, le CO₂ étant gazeux aux températures et pressions ambiantes.

alles gradients d'élution : Influence de la pression et de la température

L'augmentation de la solubilité du soluté dans la phase mobile avec la masse volumique a permis de développer une technique similaire à la programmation en température en CPG, ou de solvant en HPLC. En augmentant progressivement la masse volumique de l'éluant, la solubilité des solutés s'accroît. L'augmentation de la masse volumique de l'éluant peut être réalisée soit en élevant la pression, soit en diminuant la température. En pratique seul le gradient de pression est utilisé, les gradients négatifs de température étant difficile à réaliser. La chromatographie en phase supercritique est donc une technique fondée sur la solubilité et non sur la volatilité de l'échantillon comme la chromatographie en phase gazeuse des molécules apolaires.

b) Influence de la nature du fluide supercritique et des modificateurs polaires.

Comme nous l'avons vu plus haut, le CO₂ semble le solvant le plus apte à être utilisé compte-tenu de ses propriétés au point critique. Le pouvoir solvant d'un fluide supercritique dépend de son état physique. Il est décrit par sa pression, sa température et sa masse volumique. c'est ce qu'on appelle "l'effet d'état". Il dépend également de la nature chimique du fluide, c'est à dire de sa polarité, de ses propriétés acide-base, de sa tendance à former des liaisons hydrogènes, etc. C'est ce que l'on peut appeler "l'effet chimique". A l'état liquide, le CO₂ (masse volumique 1.23 g/cm³) a une polarité voisine de celle de la pyridine. A l'état supercritique (masse volumique comprise entre 0.6 et 0.7 g/cm³) sa polarité varie entre celle du pentane et du toluène. En conséquence, le CO₂ supercritique est un fluide apolaire qui pourra difficilement solubiliser des molécules polaires comme les sucres. Pour lever partiellement ce handicap, il est possible d'ajouter au fluide supercritique de faibles quantités (1 à 3 %) de solvants polaires, (méthanol, eau) ,ou bien de substituer les hydrates de carbones par triméthylsilylation, acétylation, ou méthylation.

3) Conclusion

La chromatographie en fluide supercritique présente un certain nombre d'avantages qui sont la conséquence des propriétés particulières de ces fluides : faible viscosité (25 fois plus faible que celle de l'eau) et Coefficient de diffusion moléculaire plus élevée que dans les liquides (10 à 100 fois). Cependant comme nous l'avons déjà vu la solubilité des solutés est en général plus faible que dans les liquides.

En ce qui concerne la détection des solutés en sortie de colonne, elle pourra s'effectuer par UV, le gaz carbonique n'absorbant pas jusqu'à

200nm, mais elle nécessitera la mise en oeuvre de cellules résistant à des pressions de plusieurs centaines de bars. La détection des molécules éluées est aussi possible par ionisation de flamme comme en CPG, le CO₂ étant ininflammable. Lors de la mise en pression ordinaire le CO₂ supercritique passe à l'état gazeux. Ceci est important dans le couplage SFC/MS, les conditions se rapprochant de celles de la GLC/MS.

Les premières applications de cette nouvelle technique chromatographique concernent la séparation de stéroïdes, d'ubiquinones, de vitamines, d'hydrocarbures aromatiques (32). La séparation de polystyrènes (voir Fig.5 p.23) atteignant des masses moléculaires de 3000 constitue un résultat important. En ce qui concerne l'utilisation de cette technique à la séparation de dérivés glucidiques, nous n'avons à ce jour relevé que les travaux de Chester et Innis (33-34) sur la chromatographie en phase supercritique de sirops de glucose triméthylsilylés. Ces auteurs obtiennent des séparations intéressantes jusqu'à des DP 18 (voir Fig.6 p.24). Il est à noter la très faible sensibilité obtenue par détection des oligosaccharides en FID. Comme nous le verrons plus tard dans le chapitre travaux personnels, nous avons observé les mêmes difficultés.

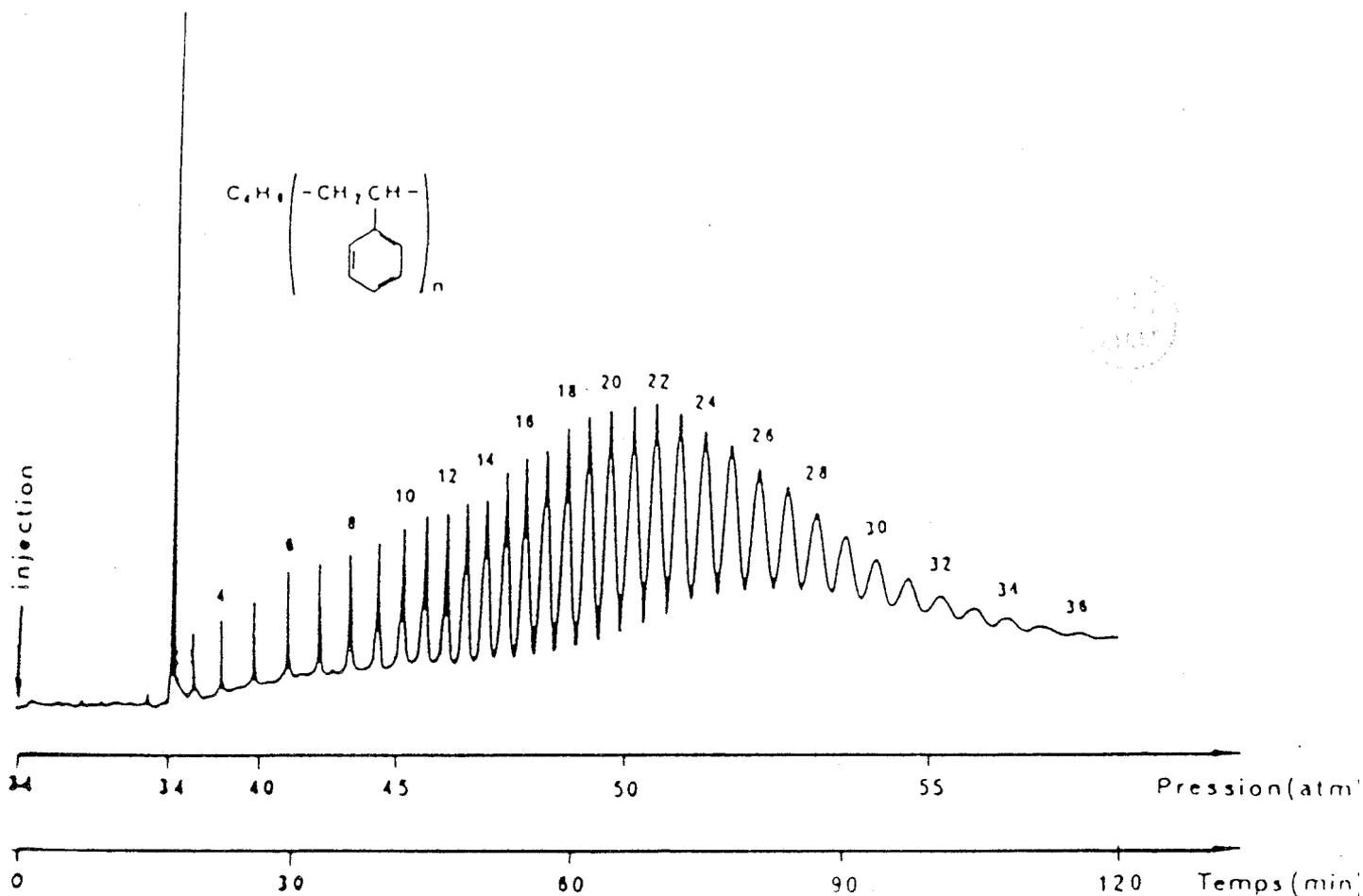


FIGURE 5

Analyse de polystyrènes en pentane supercritique sur DB5 (100µm x 9m) à 210°C (35)

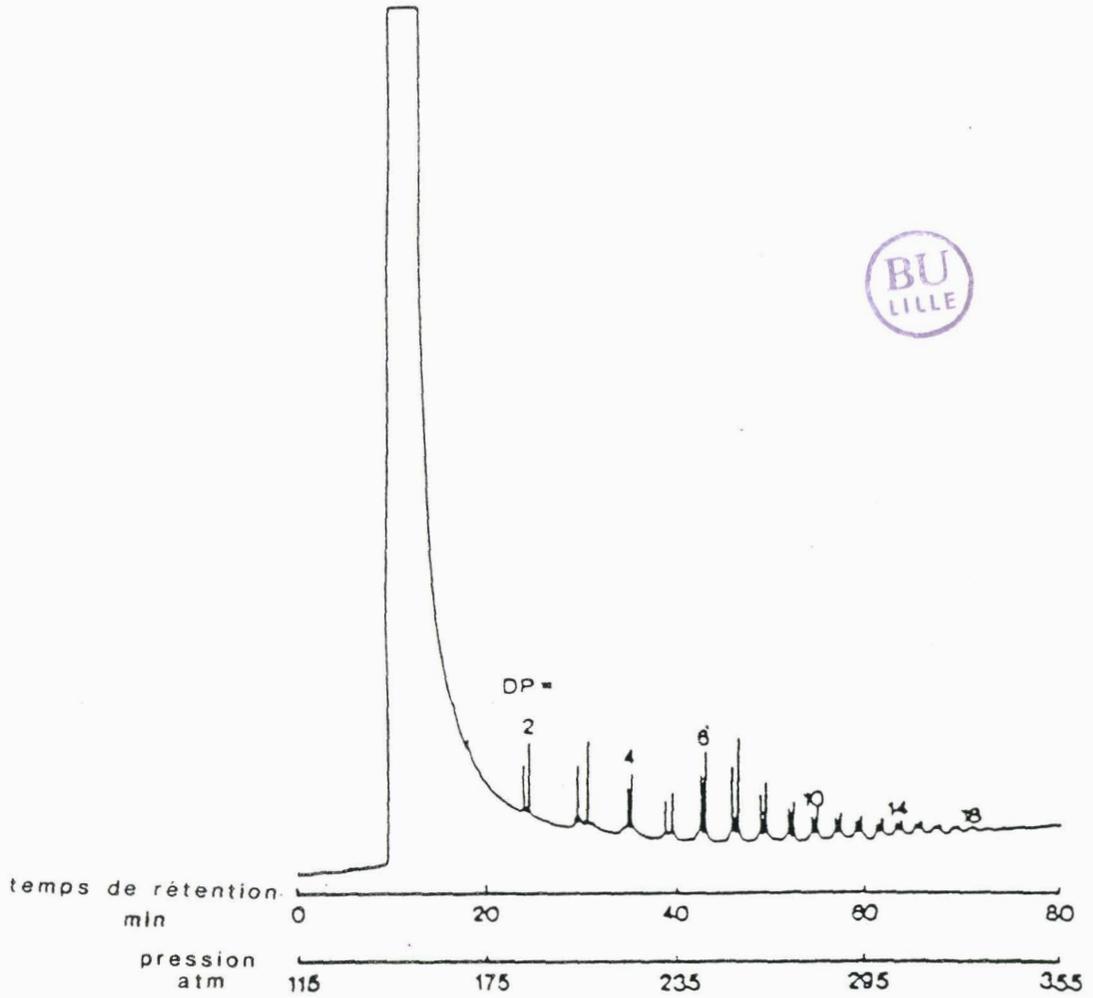


FIGURE 6

Exemple de séparation en chromatographie en CO_2 supercritique d'oligomères du maltose silylés sur DB1 ($50\mu\text{m} \times 10\text{m}$) à 80°C splittage au 1/5ème restricteur intégral (DP = degré de polymérisation) (34)

II) LES TECHNIQUES DE COUPLAGE (4)

L'analyse des molécules en sortie de colonne par spectrométrie de masse nécessite l'emploi d'interfaces dont la nature sera fonction du type de chromatographie utilisée. Ces couplages sont délicats. En effet, les colonnes travaillent sous une certaine pression, alors que la source du spectromètre de masse est sous un vide poussé. De plus, l'élution des produits nécessite des éluants qui peuvent polluer la source et créer un bruit de fond.

A) Couplage avec la GLC

1) Les colonnes remplies

Les débits des colonnes remplies sont assez élevés. Il est nécessaire d'enrichir l'échantillon par diverses interfaces dont la plus connue est le jet separator (voir fig.7 p.26). Cette interface a été mise au point par Ryhage (36). Les molécules de l'échantillon ont à la sortie du jet des trajectoires rectilignes à cause de leurs masses moléculaires élevées. En revanche, les molécules de gaz vecteur très légères ont des mouvements très rapides. Elles seront éliminées dans l'espace qui sépare le jet separator du capillaire par le système de pompage. Ceci explique qu'environ 50 % des molécules d'échantillons et seulement 5% de l'hélium passent dans l'appareil. Cette interface permet d'avoir des débits très importants, mais présente deux inconvénients :

- Premièrement, 50 % des molécules seront perdues, il faut donc avoir un échantillon en quantité suffisante.
- Deuxièmement, il y a sélection des molécules en fonction de leurs masses moléculaires. La perte d'échantillons légers est plus importante que celle d'échantillons lourds.

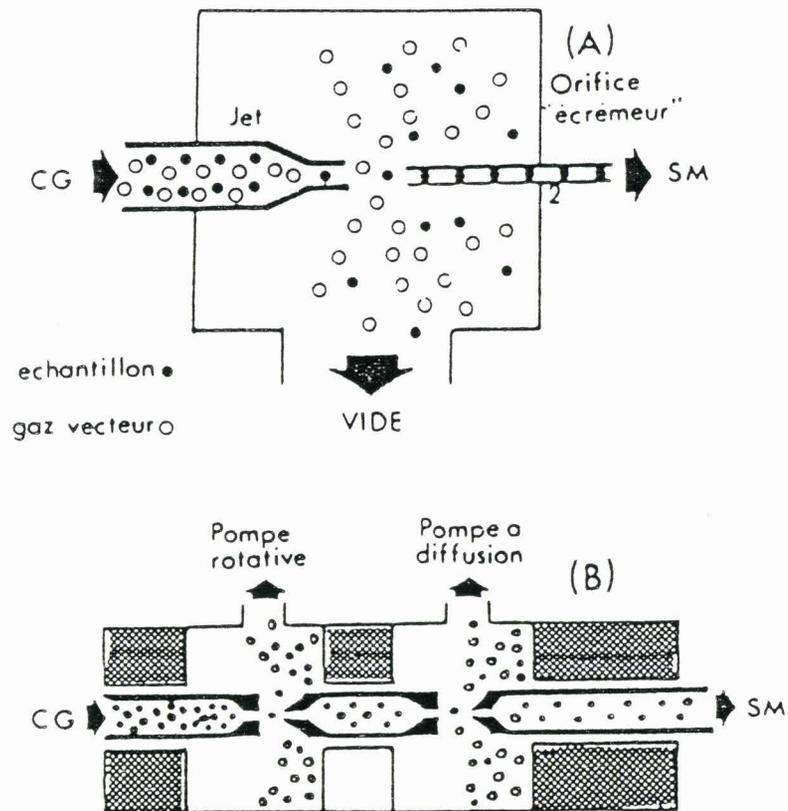


FIGURE 7

Schéma d'un "jet separator". à simple ou double étage (4)

2) les colonnes capillaires

La chromatographie en colonnes capillaires se caractérise par l'emploi de faibles débits de gaz vecteur. Ceci permet l'analyse sans séparation préalable des solutés en présence de l'éluant. Dans ce cas la colonne pourra arriver directement dans la source du spectromètre de masse. Il faut savoir toutefois que le vide poussé de la source perturbe la chromatographie (10 % de l'efficacité de la colonne sont généralement perdus).

B) Couplages avec l'HPLC

1) colonnes remplies

a) Nécessité de méthodes spécifiques à l'HPLC

i) A cause de la diversité des éluants.

Le solvant d'éluion n'est pas de nature chimique unique. Il varie selon le type de chromatographie, et suivant le mode opératoire. En conséquence, l'utilisation d'un séparateur sélectif unique comme le "jet separator" est impossible.

ii) A cause de l'importance des débits gazeux à évacuer.

Les solvants introduits dans la source du spectromètre de masse se vaporisent instantanément grâce au vide qui y régné. Les débits de vapeur obtenus sont extrêmement importants. C'est ainsi qu'une éluion à 1 ml/min fournit des débits de vapeur 10 à 10 000 fois plus élevés qu'en GLC. Ces débits de vapeur dépassent les capacités des pompes du spectromètre de masse. Cette hypothèque sera levée en enrichissant

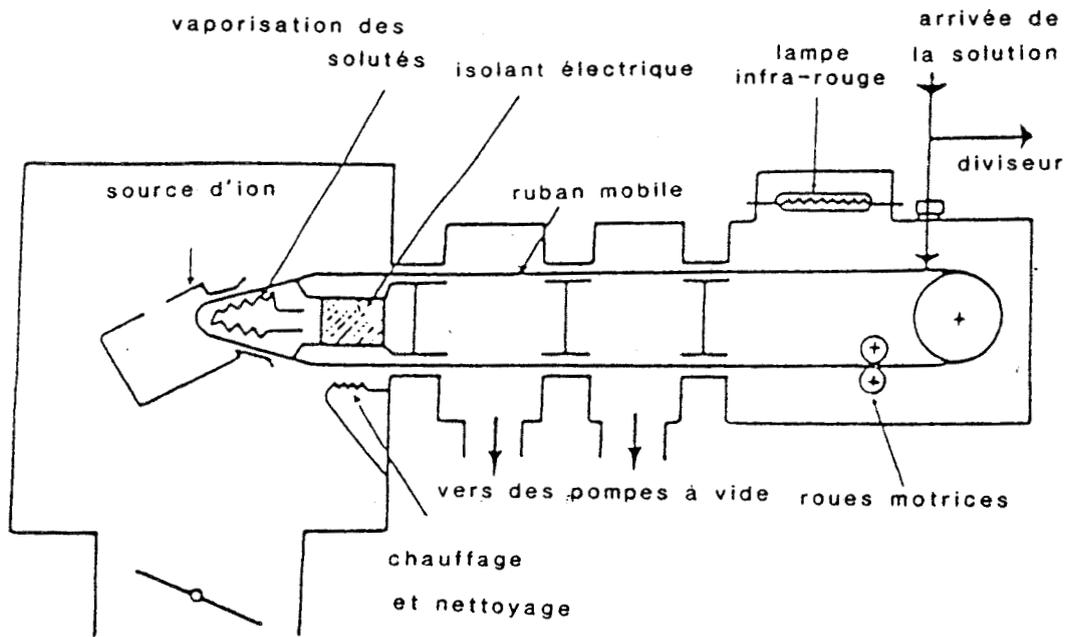


FIGURE 8

Schéma d'un séparateur à ruban mobile (37)

l'échantillon, ou en réduisant le débit de l'éluant à quelques $\mu\text{l}/\text{min}$ par l'utilisation d'un diviseur ou de colonnes capillaires.

iii) A cause des caractéristiques des échantillons à analyser L'HPLC n'offre de réels intérêts que pour des échantillons non volatils, instables à la chaleur, non séparables en GLC. De tels substrats ne sont pas faciles à analyser en spectrométrie de masse. L'impact électronique et l'ionisation chimique nécessitent en effet des échantillons volatils. Au contraire d'autres méthodes telles que la désorption de champ, l'ionisation chimique directe, le "fast atom bombardment" s'appliquent à des substances introduites à l'état solide peu compatibles avec l'élution en continu de l'effluent liquide d'un chromatographe.

b) Les techniques de couplage

deux types de méthodes sont préférentiellement utilisées : les méthodes d'enrichissement et les nébulisateurs

1) Les méthodes d'enrichissement

La méthode la plus utilisée est la "moving belt" (38). Le principe est de déposer l'éluant sur un ruban de polyimide. La solution est alors transportée à travers des sas où le solvant est évaporé. Le ruban arrive ensuite dans la source où l'échantillon est désorbé thermiquement et ionisé. Enfin, le ruban est nettoyé et réutilisé (voir Fig.8 p.28). Cette technique est assez performante pour les solvants peu polaires. Par contre l'eau est difficile à extraire et interdit des débits supérieurs à $0.1 \text{ ml}/\text{min}$. De plus, l'échantillon doit être volatil et facilement désorbable. En conséquence la vitesse de déroulement du ruban doit être réglé pour chaque échantillon. Un des défauts de cette

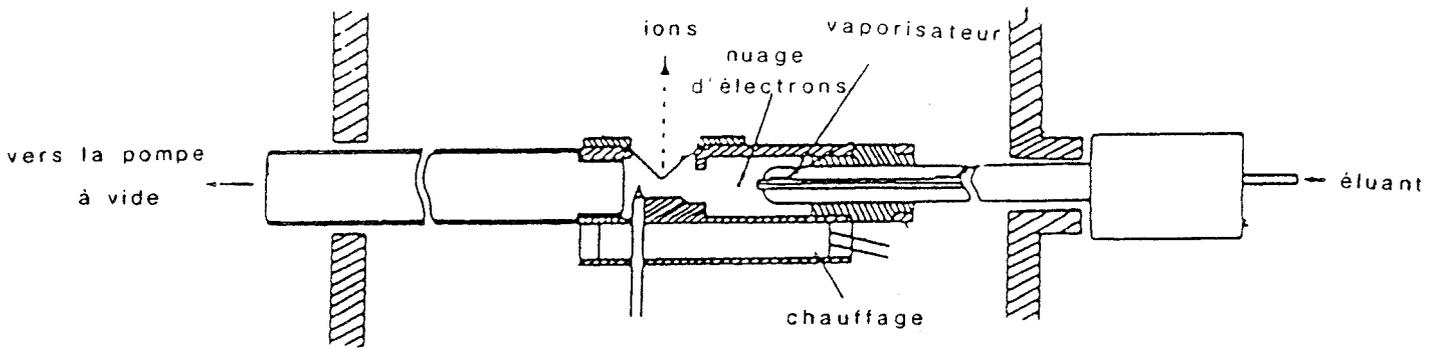


FIGURE 9

Schéma d'un thermospray (41)

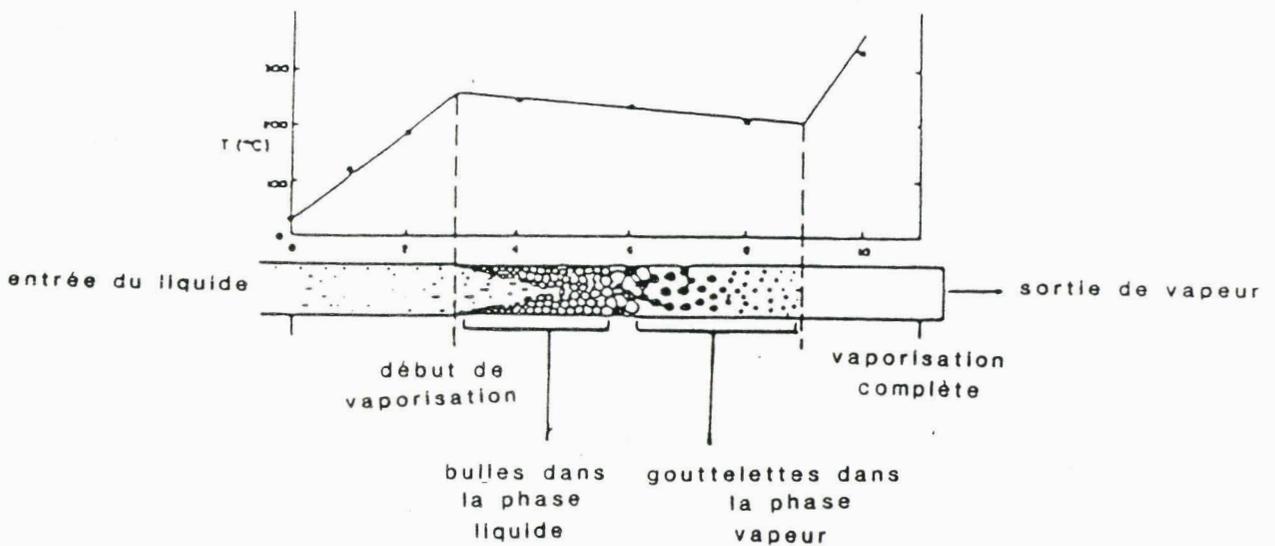


FIGURE 10

Profil de température produit par un chauffage direct du capillaire (0.15 mm I.D.) élué avec de l'eau à 0.7 ml/min et schématisation du processus d'évaporation dans le capillaire (41)

technique est dû à la perturbation des spectres par les ions provenant du polyimide.

ii) Les nébulisateurs

Ces couplages ne cherchent pas à éliminer les solvants. Le plus courant est le nébulisateur thermique ou thermospray (39-40). Le schéma de cette interface est donnée dans la figure 9 p.30. Le but est de créer une vaporisation de l'éluant en le faisant passer à travers un capillaire très chaud. Il en résulte un jet supersonique de vapeur contenant un brouillard de fines particules et de gouttelettes.

Un exemple de ce qui se passe dans le capillaire est donné dans la figure 10 p.31. Au cours de la progression de l'éluant dans le capillaire, la température est presque constante jusqu'à ce que la vaporisation soit complète, Néanmoins il existe une légère baisse de température due à l'augmentation du vide. La température de l'éluant croît ensuite très rapidement. L'optimum de sensibilité est obtenu quand la température de sortie provoque une vaporisation presque complète. Si la température de sortie est trop élevée nous obtenons une vapeur surchauffée où se produit une pyrolyse de l'échantillon. Par contre dans le cas d'une température trop basse le produit sera insuffisamment vaporisé ce qui provoquera un faible rendement d'ionisation.

Malgré ces avantages, le thermospray présente l'inconvénient d'être limité au niveau des modes d'ionisation. Seule l'ionisation chimique est possible ainsi qu'un mode d'ionisation spécifique au thermospray.

L'ionisation chimique.

Un filament en irridium produit un nuage d'électrons qui ionise la phase mobile. Celle-ci sert alors de gaz réactif comme l'ammoniac ou le méthane en ionisation chimique classique.

l'ionisation par thermospray.

Sous certaines conditions de débit, de température, et de phase mobile, des ions sont générés sans aucun moyen extérieur. L'ionisation obtenue est très douce et permet d'obtenir l'ion moléculaire. Quand le liquide est désorganisé par le bullage (voir Fig.10 p.31), les gouttelettes produites sont généralement électrisées. Leur charge nous est donnée par la relation

$$q = \sqrt{4VN/\pi} \quad (41)$$

V est le volume des gouttelettes, N le nombre d'ions par unité de volume.

Par exemple, pour une solution 0.1 M en acétate d'ammonium, les gouttelettes ont au départ 1 μm ou moins. Le champ obtenu est à peu près de 10^7 V/m. Ce champ augmente quand la gouttelette s'évapore ce qui suffit à ioniser les particules. Un exemple d'utilisation du thermospray comme interface est donnée par Hsu *et al.* (42) pour la séparation et l'analyse de microquantités d'oligosaccharides sur HPLC de phase reverse couplée à la spectrométrie de masse.

2) Colonnes capillaires

Actuellement se développe avec l'essor des colonnes capillaires en HPLC toute une série d'interface permettant le couplage direct dans la source. Certains auteurs ont simplement amené la colonne dans la source (43), d'autres ont utilisé des interfaces un peu plus compliquées qui provoquent la nébulisation de l'échantillon (44). Ces types d'interface sont utilisés pour une ionisation par impact électronique ou par ionisation chimique. Pour les analyses en FAB des auteurs utilisent un fritté au bout de la colonne capillaire (45) ou une sonde FAB "à débit continu" (46).

C) Conclusion

La conception d'une interface fait donc intervenir de nombreux paramètres ce qui rend impossible la mise sur le marché d'une interface universelle. Celle-ci dépendra du type de chromatographie, du type de colonne, du type de solvant et du mode d'ionisation. Ces interfaces représentent une part importante des recherches actuelles car de leur qualité dépend la sensibilité du spectromètre de masse et de l'utilisation de celui-ci comme détecteur universel.

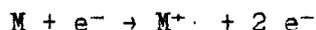
III) LES MODES D'IONISATION (47-52)

La spectrométrie de masse est fondée sur la séparation en masse de molécules chargées. Un point fondamental concerne l'ionisation des molécules que nous venons d'introduire dans le spectromètre de masse. Suivant les modes d'ionisation, nous observerons soit une cassure et une ionisation des molécules (fragmentation), soit une ionisation des molécules avec une faible fragmentation. Dans le premier cas, l'analyse des fragments permettra d'accéder à la connaissance de la structure des molécules, dans le second cas à sa masse moléculaire. L'ionisation pourra s'effectuer par des électrons (impact électronique (EI) et (EI "in beam")), des ions (ionisation chimique (CI) et désorption chemical ionisation (DCI)), des champs électriques (field ionisation (FI) et field désorption (FD)), des photons (laser désorption mass spectrometry (LDMS)), des ions lourds obtenus par fission nucléaire (^{252}Cf Plasma Désorption (PDMS)), des ions secondaires (SIMS), et des atomes (fast atom bombardment (FAB)).

A) l'impact électronique (EI)

1) principe

C'est l'interaction d'un électron avec une molécule qui provoque l'apparition d'un ion.



un électron a une onde associée de longueur égale à $\lambda = h/mv$ où h est la constante de Planck, m la masse et v la vitesse. Pour un électron, cette formule devient $\lambda = 150/v$ avec v en électron volt. On peut calculer

que pour un électron accéléré à 20 eV, l'onde associée a une longueur de 2,7 Å. Elle est de 1,4 Å pour un électron accéléré à 70 eV. Ces longueurs d'onde sont de l'ordre de grandeur des molécules organiques. L'onde peut alors être perturbée par la traversée d'une molécule et transformée en une onde complexe dont une des composantes peut se trouver en phase avec celle d'un électron de la molécule et amener l'excitation ou l'expulsion de ce dernier.

2) la source

L'ionisation des molécules se fait dans la source du spectromètre de masse (voir Fig.16 p.52). Il s'agit d'une chambre en acier de l'ordre du centimètre placée sous un vide d'environ 10^{-6} Torr. L'analyse nécessite des produits gazeux au voisinage d'un faisceau d'électrons. Ceux ci sont émis par un filament de tungstène à 2000°C et accélérés par une différence de potentiel : C'est le courant d'ionisation. Les molécules ainsi ionisées sont accélérées par une différence de potentiel qui permet de les amener dans l'analyseur.

3) analyse des sucres

L'EI est la plus ancienne et la plus utilisée des techniques d'ionisation. Elle est surtout utilisée pour l'analyse des mono-, di- et trisaccharides sortant d'une CPG (53-55), les produits étant alors méthylés ou triméthylsilylés. Dans ces conditions l'énergie utilisée est de 70 eV. La figure 11 p.37 nous donne un exemple des renseignements obtenus lors de l'analyse EI du perméthyl glucose. L'étude des voies de fragmentation permet d'assigner sans ambiguïté la place des groupements méthyles sur la chaîne hydrocarbonée.

En 1958 Reed (56) a montré qu'un échantillon solide placé sur une sonde près de la source d'électrons, peut subir une désorption même si le

produit n'est pas volatil. A cet endroit la densité électronique est très élevée c'est pourquoi on appelle cette technique "in beam". Un avantage de celle-ci est due à la proximité des sites d'évaporation et d'ionisation ce qui minimise les dégradations thermiques. Cette méthode a été particulièrement bien décrite par Dell et al. (58) en 1975 pour l'analyse d'antibiotique. On utilise alors pour avoir une fragmentation la plus faible possible, une énergie d'ionisation de 20 eV. Cette diminution de l'énergie se fait au détriment de la sensibilité, ce qui oblige à utiliser des quantités de substrats assez importantes, de l'ordre de 100 à 200 µg. L'EI reste malgré tout une méthode "dure" qui donne énormément de fragments de faible masse moléculaire et peu d'ions lourds (on ne trouve pas en général l'ion moléculaire).

Cette technique a été utilisée avec succès sur des monosaccharides et des oligosaccharides aminés (59), sur des oligosaccharides de groupe sanguin (60-67) sur des oligosaccharides isolés de l'urine de patient atteint de mannosidose (68) et de l'ovomucoïde de poule (69) sur les glycopeptides de la prothrombine (70) et de la transferrine humaine (71), enfin sur des glycolipides (72-74).

B) L'ionisation chimique (CI ou CIMS)

1) principe

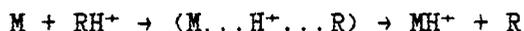
Field (75) et Munson (76) en 1965 découvrent l'ionisation chimique. Cette méthode consiste à volatiliser une petite quantité de produit à analyser au sein d'un plasma d'ions obtenu par bombardement électronique d'un gaz dit gaz réactif. La substance est ionisée par réaction avec les ions de ce plasma.

2) la source

Alors que l'EI nécessite un vide très poussé 10^{-6} Torr l'ionisation chimique nécessite une source à "haute pression" (1 torr). En effet, en EI, les ions ne doivent pas subir de collision pendant la microseconde que dure leur séjour dans la source. Chaque ion conserve donc l'énergie interne acquise au moment de sa formation jusqu'à sa fragmentation éventuelle. Cette dernière est donc une réaction unimoléculaire : Chaque ion constitue un système isolé. En CI au contraire le séjour des ions dure de 10 à 100 microsecondes, temps pendant lequel il est nécessaire d'éviter l'ionisation par impact électronique et où il faut rechercher les interactions avec le plasma d'ions du gaz réactif.

3) Les réactions

La réaction la plus importante est le transfert de proton selon le mécanisme suivant



l'ion du gaz réactif agit ici comme un acide de Bronsted. La formation de MH^+ exige que l'affinité protonique (AP) de la molécule soit supérieure à celle du gaz réactif. La différence d'AP est libérée sous forme d'exothermicité. Celle ci s'ajoute à l'énergie interne des molécules ce qui provoque les fragmentations et les réarrangements. En général cette différence d'AP est suffisamment faible pour permettre de retrouver l'ion moléculaire. L'AP des gaz réactifs les plus utilisés est donnée dans le tableau III p.37. De nombreuses réactions secondaires peuvent se réaliser dans la source. Un exemple de ces réactions concernant le méthane est donné dans la figure 12 p.38. La présence de ces ions secondaires a souvent tendance à surcharger les spectres

TABLEAU III

Principaux gaz chimiques utilisés en ionisation chimique positive et négative avec leur affinité protonique (77)

Gaz	Acide conjugué P_iH	Ion réactif basique P_i^-	AP(P_i) k cal/mole	$\Delta H_f(X^-)$ k cal/mole
H_2	-	H^-	400	
NH_3	-	NH_2^-	400	+ 24
H_2O ; $N_2O + H_2$; $N_2O + CH_4$	H_2O	OH^-	390	- 32,8
$N_2O + C_6H_{14}$				
N_2O ; O_2	OH^*	O^-	381	+ 25,2
CH_3ONO	CH_3OH	CH_2O^-	377	- 36
$CH_4 + CH_3ONO + C_2H_2$	C_2H_2	C_2H^-	373	
CHF_3 ; $C_2F_3Cl_3$	HF	F^-	370	- 60
$CH_4 + CH_3ONO + H_2S$	H_2S	SH^-	351	
$N_2 + N_2O$; O_2	*O_2H	O_2^-	350	- 10,1
$CH_4 + CH_3ONO + CH_3COOH$	CH_3COOH	CH_2COO^-	345	
$CH_4 + CH_3ONO + C_6H_5COOH$	C_6H_5COOH	$C_6H_4COO^-$	336	
CH_3Cl ; CH_2Cl_2	HCl	Cl^-	332	- 56,6

Gaz utilisé	Formule G	Base conjuguée P_j	Ion réactif acide P_jH^+	Affinité protonique AP(P_j) k cal/mole
Hydrogène	H_2	-	H_2^+	100
Méthane	CH_4	-	CH_3^+	127
Éthylène	C_2H_4	-	$C_2H_3^+$	160
Eau	H_2O	-	H_3O^+	165
Propane	C_3H_8	C_3H_6	$(CH_3)_2CH^+$	179
Méthanol	CH_3OH	-	$CH_2OH_2^+$	182
Acétone	C_3H_6O	-	$C_3H_5OH_2^+$	188
Isobutane	C_4H_{10}	C_4H_8	$C_3H_7^+$	195
Ammoniac	NH_3	-	NH_4^+	207
Méthylamine	CH_3NH_2	-	$CH_3NH_3^+$	211

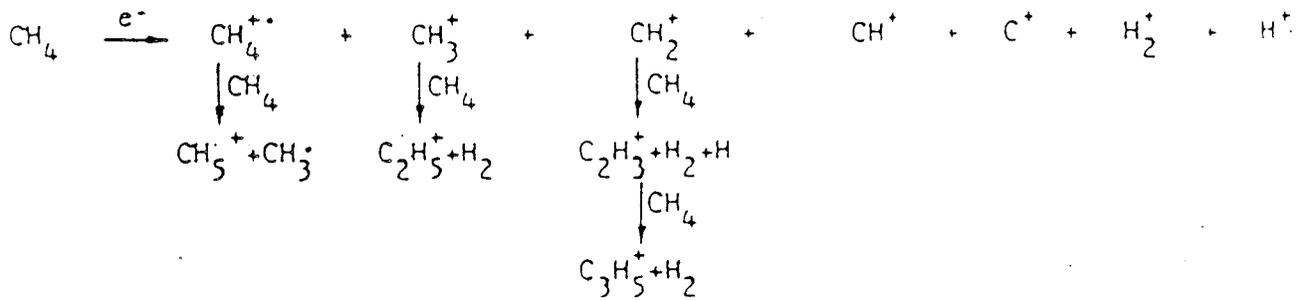
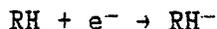


FIGURE 12

Principaux ions secondaires produits par le méthane pendant l'ionisation chimique. (50)

obtenus par ionisation chimique.

Le gaz réactant n'est pas forcément protoné, il peut parfois réagir avec les électrons de la façon suivante



les ions RH^- et R^- se comportent alors avec les molécules neutres à analyser comme des bases de Bronsted



Les ions produits par ce mécanisme sont négatifs (ionisation chimique négative : NICI). (les ions négatifs ne sont pas analysés en EI car ils sont présents en trop faible quantité (de l'ordre de 1 pour 1000), alors qu'ils peuvent être majoritaires en CI). Les principaux gaz réactifs en NICI sont décrits dans le tableau III p.40 avec leur affinité protonique. C'est Baldwin et Mc Lafferty (78) qui ont décrit les premiers l'introduction d'une sonde au coeur d'un plasma d'ions (CI "in beam"). D'autres améliorations ont été ensuite effectuées dans le but de diminuer les interactions échantillon-échantillon et échantillon-surface, notamment le chauffage rapide de l'échantillon. Il y a en effet sur la sonde compétition entre les phénomènes de décomposition et de vaporisation de l'échantillon ; les premiers ayant lieu à basse température, les seconds à haute température. Hunt (79) a utilisé par la suite des cannes d'introduction de field désorption qui peuvent être chauffées très rapidement et dont la surface très grande permet une dispersion rapide de l'échantillon dans le plasma. Cette technique

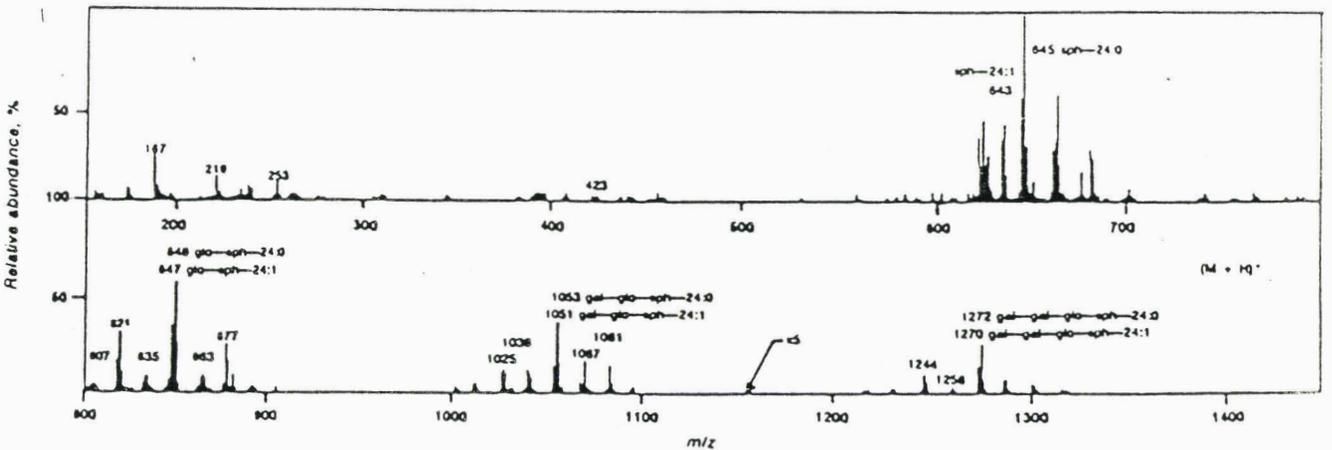
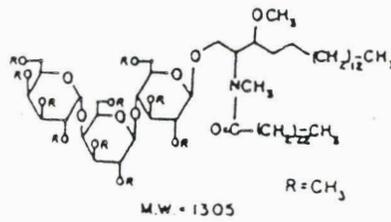
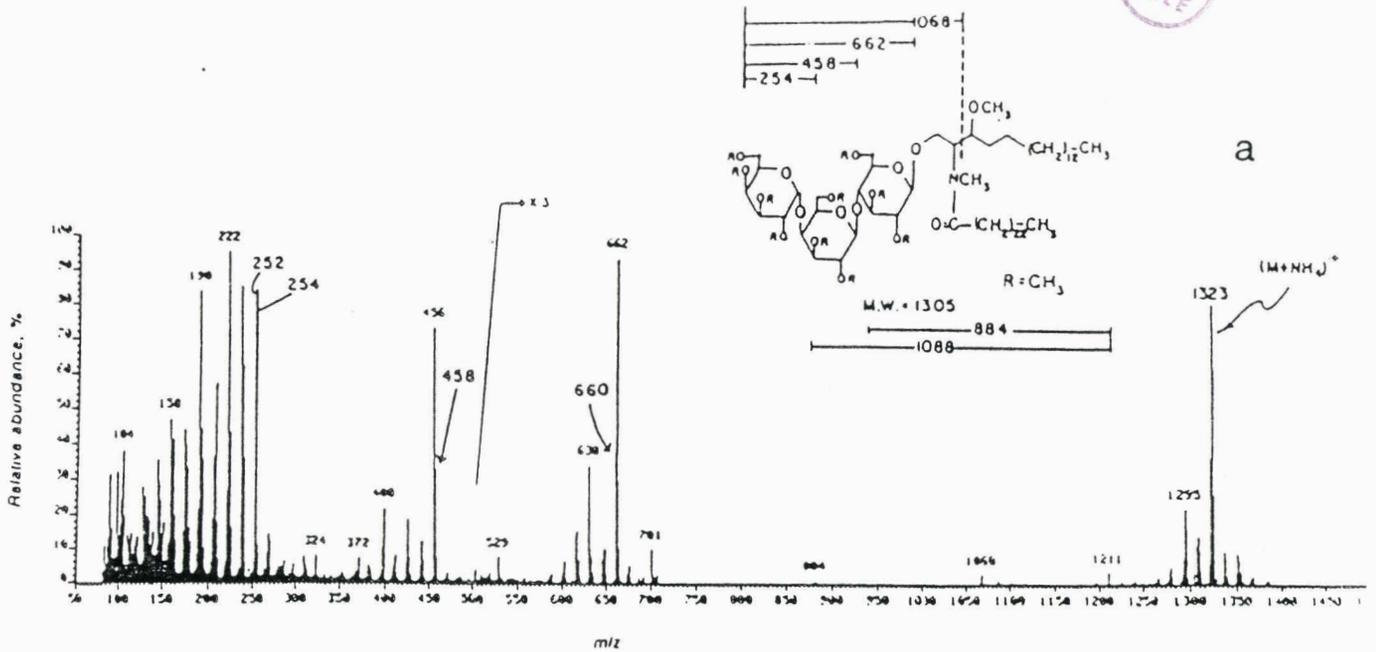


FIGURE 13

Spectres de masse d'un glycolipide obtenu en présence d'ammoniac
 a) "désorption chemical ionisation" (DCI) 2µg injecté à 125°C, Voltage d'accélération : 3 kV (83)
 b) par ionisation chimique classique avec une source à 225°C une énergie des électrons de 500 eV et un voltage d'accélération de 1.75 keV (84)

s'appelle désorption chemical ionisation (DCI). La figure 13 p.43 illustre la différence de spectre obtenue par DCI d'un glycolipide (Fig.13a) et par ionisation chimique classique du même glycolipide (Fig.13b), le gaz réactant étant l'ammoniac dans les deux cas. Nous constatons dans le premier cas la formation de l'ion (M^+NH_4) à m/z 1323 et des coupures récurrentes permettant de construire la séquence. Dans le cas d'une ionisation chimique classique, nous observons très mal cet ion moléculaire.

4)Analyse des sucres

Il n'y a pas de technique universelle en CI chacun utilisant ses conditions expérimentales propres : nature du gaz réactif, pression du gaz dans la source, mode d'introduction. En conséquence, il est impossible de tirer des lois générales d'ionisation et de fragmentation des sucres par CI. Ce mode d'ionisation a fait l'objet d'applications à l'étude de glycolipides (80-82), d'oligosaccharides (83), ainsi que la détection des produits d'hydrolyse partielle de polysaccharides analysés par couplage LC-MS (86-88).

C)Ionisation de champ(FI) et désorption de champ (FD)

1)principe(89-91)

En FI et en FD, les atomes et les molécules sont ionisés dans un champ électrique de 10^7 à 10^8 V/cm. Ainsi soumis à une différence de potentiel, les électrons de l'échantillon ont une probabilité non nulle de passer dans l'émetteur malgré la barrière de potentiel créée par la fine épaisseur de vide. Ceci n'est explicable que par la mécanique quantique (effet tunnel) puisque en mécanique classique les électrons ne pourraient passer le vide. Par cette technique les molécules ionisées

acquièrent une très faible énergie électronique, moins de 0.1 eV. L'énergie demandée pour la désorption est beaucoup plus faible que l'énergie d'évaporation. Ceci signifie que la désorption s'accompagne d'un faible choc thermique qui ne provoque qu'une fragmentation limitée. FI et FD ne diffèrent que par le mode d'approche de l'émetteur.

2) la source

La FD demande une source différente de celle de l'EI (voir Fig.16 p.52). Elle nécessite deux modifications : d'abord une plaque qui permet de générer un champ électrique et surtout une sonde modifiée que l'on préfère appeler un émetteur. Celui-ci est couvert d'aiguilles et peut être chauffé. Quand on applique une forte différence de potentiel à la plaque (2 à 6 kV) un champ électrique se crée à la pointe des aiguilles (entre 10^7 et 10^8 V/cm) ce qui provoque l'ionisation et la désorption des molécules de l'échantillon.

Pour les composés très polaires, la formation de l'ion peut être très éphémère. De larges fluctuations du courant ionique se produisent souvent, ce qui oblige à accumuler les balayages.

3) analyse des sucres

L'ion moléculaire est souvent présent en FD ($(M+H)^+$ et $(M+H-H_2O)^+$). Pour des courants supérieurs à 12-15 mA on obtient des fragmentations qui ressemblent à celles obtenues par une hydrolyse acide des polymères glucidiques en solution aqueuse (voir Fig.14 p.46). En FD la présence de sel est nécessaire. Dans des solvants tels que le méthanol ou le poly(vinyl alcool) des auteurs (92-93) ont analysé des oligomères de 3-O-methyl mannose jusqu'à 14 unités monosaccharidiques. L'ion majeur est alors $(M+Na)^+$ et $(M+2Na)^+$. D'autres auteurs ont réalisé les spectres de polymères de 6-O-methylglucose extrait de mycobacterium smegmatis.

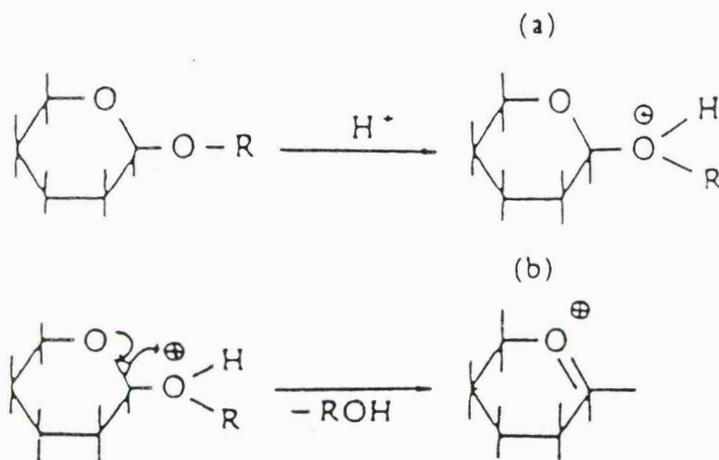


FIGURE 14

Description des mécanismes de fragmentation en Field Désorption (FD) pour les oligosaccharides natifs (97)

contenant 20 unités monosaccharidiques (94). Il est possible d'obtenir de tels résultats grâce à l'augmentation de volatilité et à la stabilisation due au groupement méthyl. Un autre groupe de composés analysés par FD est constitué par les glycolipides (95). Une analyse de ce type de composé ne nécessite que 5 à 15 µg. La fragmentation des glycolipides est représentée sur la figure 15 p.48 la coupure "a" s'effectue au niveau de la sphingosine entre les carbones alcooliques secondaires et le carbone portant la fonction amide, les coupures "b" et "c" donnent des informations sur la nature des acides gras, les coupures "d" et "e" déterminent la partie glucidique. Les glycolipides peuvent être analysés sous une forme dérivée. Ils désorbent alors plus doucement et à des températures plus basses ce qui permet de faire des analyses sur des quantités inférieures à 1 µg. La FD a notamment servi pour l'analyse des structures de groupes sanguins de type Lewis (62) et des groupes I et B des membranes erythrocytaires de lapin (96). La FD est maintenant largement supplantée par l'ionisation à l'aide d'atomes neutres accélérés (FAB).

D) Laser désorption (LDMS)

1) principe

Cette technique ne s'est développée que récemment (Posthumus et al. (99)). En effet le laser produit un nuage de photons ultra-chauds pendant des périodes très courtes. Son utilisation sur des molécules thermolabiles aurait dû causer leur thermolyse. En fait il se produit comme en DCI une compétition entre décomposition et évaporation, qui permet d'obtenir l'ion quasimoléculaire. La LDMS est une méthode très simple à utiliser qui ne nécessite aucune matrice, par contre l'analyse de l'échantillon doit s'effectuer en présence de sels. En effet, il a été démontré que la cationisation est le phénomène majeur (100). Le défaut de ce type de technique est dû au fait que les ions ne persistent que très peu de temps après chaque impulsion du laser. IL vaut donc mieux utiliser un analyseur de type "à temps de vol" qui mesure le temps mis par les ions pour parcourir une distance donnée, ce temps étant fonction de la masse de l'ion.

2) analyse des sucres en LDMS

L'attachement de cations métalliques alcalins est le processus dominant en LDMS des sucres ce qui fait que l'on trouve assez peu de fragments et de molécules protonnées. Cette technique en est encore à ses débuts. Des auteurs ont cependant décrit l'analyse de stachyose (101-102) de malto-oligosaccharides (103-104) et d'oligosaccharides extraits de lipopolysaccharides bactériens (105).

E) Plasma désorption mass spectrométrie (PDMS)

1) Principe

En 1974 Mac Farlane et al. (106-109) a mis au point une nouvelle technique utilisant la fission nucléaire pour désorber les molécules. Pour cela il utilise du californium 252. Cet élément a une période de 2.6 années, Il émet des particules α . et libère du barium 142 et du technetium 106 avec des énergies cinétiques respectivement de 79 et 104 Mev. Pour obtenir un spectre, l'échantillon est déposé sur une feuille de nickel de 1 μ m d'épaisseur et aligné avec le ^{252}Cf . Les particules émises passent à travers l'échantillon et l'ionisent (autant d'ions positifs que de négatifs sont produits). L'ion quasimoléculaire est largement prédominant.

2) Applications de la PDMS

Bien que cette technique permette d'analyser des masses importantes et d'obtenir l'ion moléculaire, elle n'a pas encore été utilisée pour l'analyse des sucres. Des études effectuées par le groupe de Mac Farlane (110) ont montré qu'il était possible d'analyser des protéines jusqu'à 23000 de masse moléculaire. Cette technique est aussi souvent utilisée avec un appareil "à temps de vol".

F) Secondary ionisation mass spectrométry (SIMS) et fast atom bombardment (FAB)

1) principe

En SIMS un nuage d'ions primaires d'argon ou de xénon (2 à 10kV) est envoyé sur l'échantillon ce qui induit sa désorption et la formation d'ions positifs et négatifs, ces ions secondaires sont ensuite analysés.

Le FAB qui a été décrit par Barber et al. (111-112) en 1981 ne diffère du SIMS que par deux points

-l'échantillon est dissous dans une matrice telle que le glycérol

-le nuage primaire est constitué d'atomes plutôt que d'ions. La formation de ce nuage d'atomes est réalisée par collision entre des ions d'argon accélérés et des atomes d'argon à qui ils transfèrent leur énergie cinétique par simple conservation de la quantité de mouvement.

En SIMS, le pourcentage d'ions secondaires décroît rapidement à cause des dommages causés à l'échantillon. La matrice du FAB évite ce problème. Seule la surface de la matrice subit le bombardement ce qui a pour effet par simple désorption, de renouveler l'échantillon neuf à la surface de la matrice. Un des intérêts de cette technique est qu'elle permet de produire pendant des temps assez longs des ions qui peuvent être analysés par des appareils classiques.

2) la source

La source FAB est schématisée figure 16 p.52. Le mécanisme mis en oeuvre pour la désorption des molécules n'est pas bien connu. Il est possible en changeant de matrice d'obtenir préférenciellement des ions négatifs ou des ions positifs ce qui fait que les conditions expérimentales ont une grande importance. Il est à noter que la matrice donne des ions caractéristiques qui peuvent surcharger les spectres.

3) Analyse des sucres en FAB et en SIMS

Un exemple de spectre FAB et de spectre SIMS effectués sur du stachyose est décrit sur la figure 17 p.53. En SIMS, il se produit des interactions entre l'échantillon et le support qui le reçoit. Lorsque celui ci est en argent, un doublet correspondant aux deux isotopes stables de masse 107 et 109 apparaît pour chaque ion. En FAB il n'y a

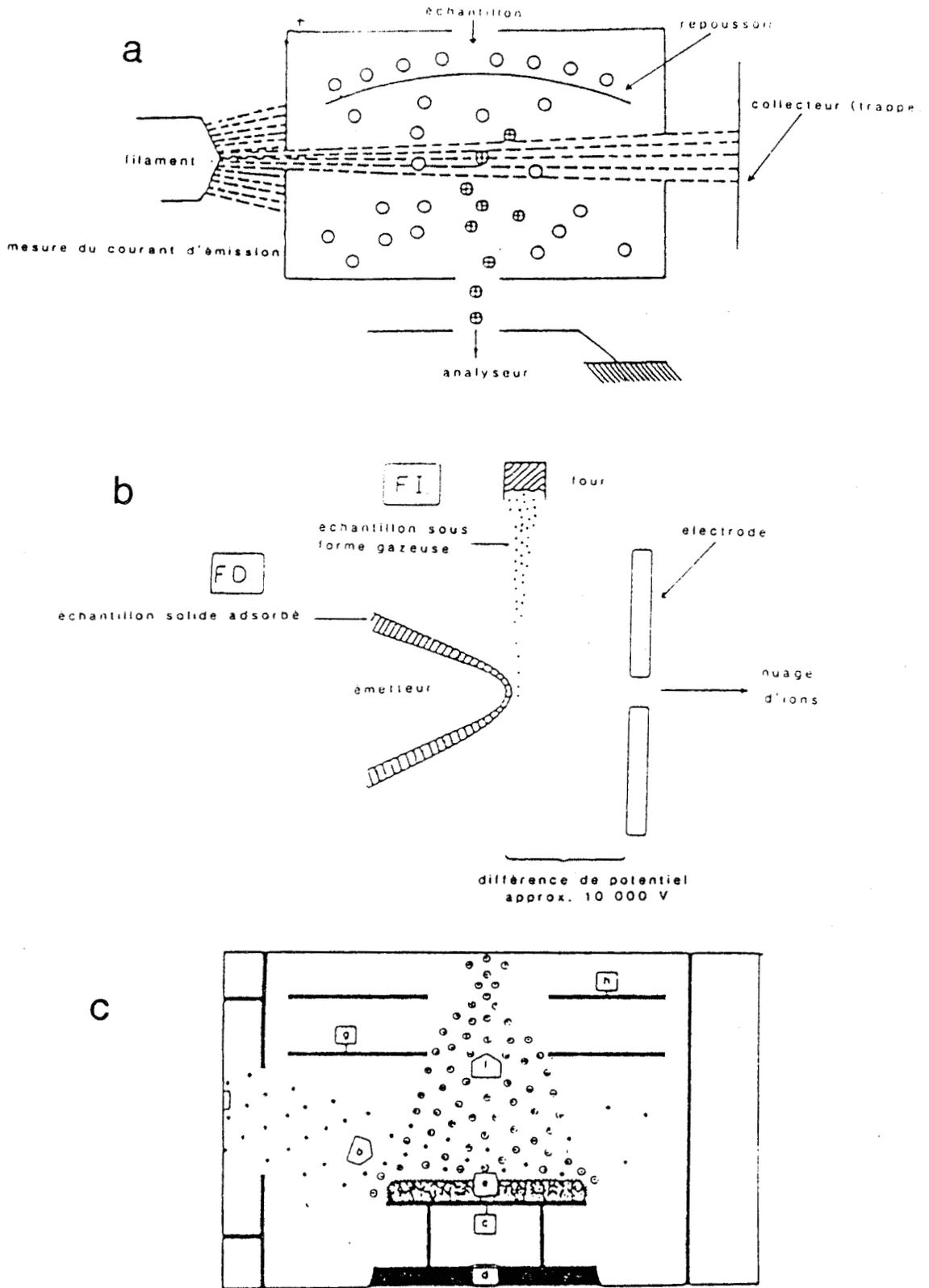


FIGURE 16

Représentation schématique des sources d'un spectromètre de masse
a) source d'impact électronique ou d'ionisation chimique (50)
b) source de field désorption et de field ionisation (89)
c) source FAB (111)

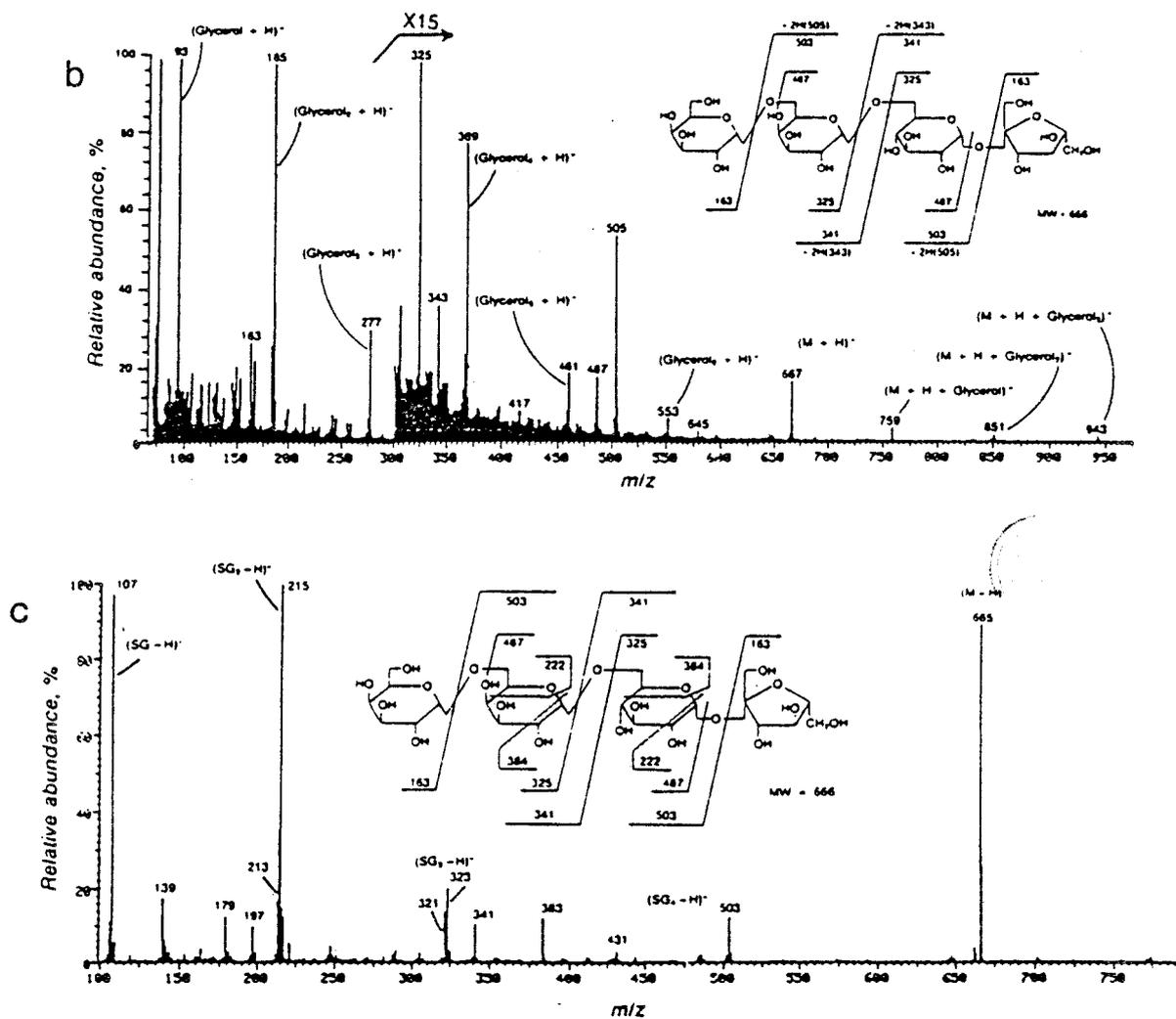


FIGURE 17

Spectres de masse d'une molécule de Stachyose obtenus par :

- SIMS sur un creuset en argent (113)
- FAB positif (matrice glycérol) (114)
- FAB négatif (matrice thioglycérol) (114)

pas ce type d'interaction à cause de la matrice. La cationisation est prédominante en SIMS alors qu'en FAB la protonation est le phénomène le plus important, le glycérol étant un bon donneur de proton. Une abondante littérature a été faite sur le FAB des glycannes et des glycolipides, la FAB étant de loin la technique la plus utilisée pour obtenir l'ion moléculaire. Des analyses ont été réalisées sur les polysaccharides par Forsberg et al. (94) et par Dell et al. (115-116). Pour les oligosaccharides, notons les travaux de Dell et al. (117-118), Egge et al. (68-69, 119-120), Kamerling et al. (121), Tsai et al. (122). Le FAB a aussi été utilisé pour l'analyse des glycolipides (123-125).

IV) IONS METASTABLES, COLLISION, MS-MS (50)

Avant d'aborder l'étude des techniques de spectrométrie de masse en tandem (MS-MS), il est nécessaire de faire quelques rappels théoriques, notamment sur la partie analytique du spectromètre de masse, sur les ions métastables et sur la collision (la spectrométrie de masse en tandem faisant intervenir ces deux derniers phénomènes).

A) l'analyseur

Un spectromètre de masse classique est composé de deux parties : la source que nous avons vue en détail dans les chapitres précédents et un analyseur qui permet d'accélérer et de séparer les ions produits par la source. Cet analyseur est souvent constitué d'un secteur magnétique et d'un secteur électrostatique.

1) l'analyseur magnétique

L'énergie cinétique acquise à la sortie de la source est égale à

$$\frac{1}{2}mv^2 = zV \quad (1)$$

m représente la masse de la molécule, v sa vitesse, z le nombre de charge, V la différence de potentiel.

En multipliant les deux termes par m/z^2 , nous obtenons

$$mv/z = \sqrt{(2Vm/z)} \quad (2)$$

Dans un champ magnétique B , les ions sont soumis à une force d'intensité Bzv . Cette force constante, perpendiculaire à la trajectoire, est la force centripète d'un mouvement circulaire uniforme.

$$Bzv = mv^2/R \quad (3)$$

où R est le rayon de la trajectoire.

nous en déduisons que

$$R = mv/Bz \quad (4)$$

pour une valeur fixée du champ magnétique B et pour une charge égale à 1, le rayon ne dépend que de la quantité de mouvement mv.

comme l'équation (2) donne la valeur de mv/z en remplaçant cette valeur dans l'équation (4). Nous avons

$$m/z = B^2R^2/2V \quad (5)$$

en faisant varier soit B soit V, les ions de différents rapports m/z défilent devant la fente fixe du collecteur

2) l'analyseur électrostatique

Dans un champ électrostatique E, les ions sont soumis à une force d'intensité zE. Cette force constante, perpendiculaire à la trajectoire est la force centripète d'un mouvement circulaire uniforme.

$$zE = mv^2/R \quad (6)$$

en remplaçant mv^2 par sa valeur dans l'équation (1)

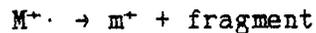
$$R = 2V/E \quad (7)$$

R ne dépend ni de la charge ni de la masse. En faisant varier E, les ions défilent devant la fente suivant leur énergie cinétique (zV).

A l'heure actuelle, ces deux types d'analyseur sont souvent combinés. Si l'analyseur électrostatique est placé devant l'analyseur magnétique, l'appareil est dit à "géométrie normale", s'il est placé derrière, l'appareil est dit à "géométrie inversée".

B) les ions métastables

Considérons un appareil à double focalisation (voir Fig. 18 p.58). Le temps de parcours des ions jusqu'au collecteur est de l'ordre de la microseconde. Soit t_1 à t_6 les temps représentés sur la figure 18 p.58. La fragmentation de la molécule M suivant le schéma ci dessous :



peut se réaliser à trois moments différents

A des temps inférieurs à t_1 (dans la source), l'ion M^+ est un ion instable, m^+ est alors analysé à la masse m/z .

A des temps supérieurs à t_6 (après le secteur magnétique), l'ion M^+ est un ion stable, m^+ est alors analysé à la valeur M/z .

A des temps intermédiaires entre t_1 et t_6 (entre la source et le collecteur). L'ion M^+ est un ion métastable. Si m^+ (il est alors noté m^*) est créé dans les champs V, E, B, il n'est pas détecté, s'il est produit dans les régions sans champ, il peut être enregistré.

1) détection des ions fragments issus d'ions métastables par variation d'un champ

Les ions fragments issus d'ions métastables ont une énergie cinétique inférieure à celle des ions produits dans la source

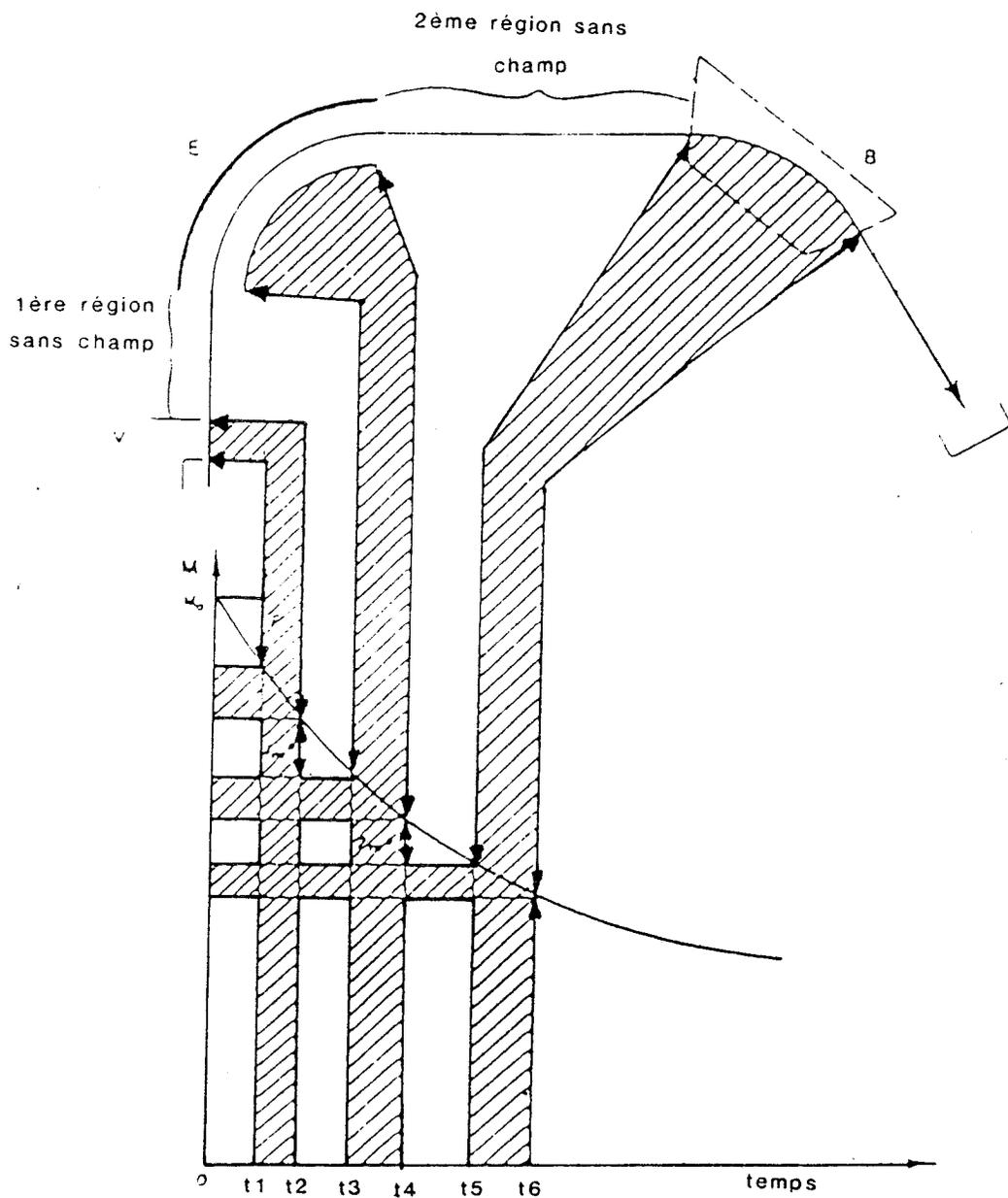


FIGURE 18

Relation entre le temps de vie moyen des ions d'une énergie interne donnée ($M = M_0 e^{-\lambda t}$) et leur temps de séjour dans les différentes parties d'un spectromètre de masse à double focalisation (50)

$$\frac{1}{2}mv^2 = zV.m/M \quad (8)$$

en multipliant par $2m/z^2$ les deux termes, nous obtenons

$$mv/z = \sqrt{(2Vm^2/zM)} \quad (9)$$

Nous nous apercevons en comparant avec l'équation (2) que l'ion formé n'est pas détecté à sa masse réelle mais à m^2/M .

a) Avec un appareil à géométrie normale

Les ions formés ne peuvent être détectés que de deux façons :

- en diminuant E jusqu'à $E.m/M$ cette technique s'appelle IKES (ion kinetic energie spectrum). Les ions sont collectés après le champ magnétique à leur masse apparente m^2/M . Les ions formés n'ayant pas l'énergie cinétique de m , le secteur magnétique n'est pas utilisé.
- en accroissant V jusqu'à $V.M/m$, les ions fragments issus des ions métastables retrouvent leur énergie cinétique normale et sont détectés après l'analyseur magnétique à leur masse réelle.

b) Avec un appareil à géométrie inversée.

Le champ magnétique trie les ions suivant le rapport m/z , B peut être sélectionné de façon à ne laisser passer qu'un ion donné. Il est possible ensuite d'étudier les ions fragments issus de cet ion parent dans la deuxième région sans champ par un spectre IKES. Nous pouvons par cette méthode d'enregistrer tous les ions fils d'un ion parent. Cette technique s'appelle "MIKES" (mass analysed ion kinetic energy spectrum) ou "DADI" (direct analysed of daughter ions).

2) détection des ions fragments issus d'ions métastables par variation des deux champs

Soit un ion M (ion parent) se fragmentant en m (ion fils)



le tableau ci dessous résume les énergies cinétiques, les quantités de mouvement des ions M^+ , m^+ , m^* , les rapports des énergies cinétiques et des quantités de mouvement.

Ions	Energie cinétique	quantité de mouvement
ion M^+	zV	$2zVM$
ion m^+	zV	$2zVm$
m^*	$zV \cdot m/M$	$2zVM \cdot m/M$

	Rapports des énergies cinétiques	rapports des quantités de mouvement
m^*/M^+	m/M	m/M
m^*/m^+	m/M	m/M



Pour laisser passer m^* il faut diminuer le champ E des rapports des énergies cinétiques soit m/M

Pour laisser passer m^* , le champ B doit être modifié des rapports des quantités de mouvement. Ces rapports sont respectivement égaux à m/M , et à m/M , dans le premier cas seuls les ions ayant la quantité de mouvement de M peuvent passer, dans le second cas seuls les ions ayant la quantité de mouvement de m peuvent passer.

a) maintient de B/E constant

Si le rapport B/E est maintenu constant, le pic sort à la masse apparente M . C'est à dire que le balayage de B et de E tel que B/E soit constant permet d'enregistrer tous les ions fils d'un ion parent M donné

b) maintient de B^2/E constant

Si le rapport B^2/E est maintenu constant, le pic formé sort alors à la masse apparente de m . Le balayage de B et de E tel que B^2/E soit constant permet d'enregistrer tous les ions parents d'un ion fragment donné.

C) Collision induced dissociation CID

Le but recherché en spectrométrie de masse est de produire des ions, puis de les diriger vers le collecteur. Pendant ce processus, les collisions entre molécules ne peuvent être évitées, ce qui baisse la sensibilité de l'appareil. Les collisions sont donc gênantes. Depuis peu cependant, les chercheurs essayent de mettre à profit ces phénomènes. Les collisions sont en général provoquées dans une zone sans champ de l'appareil, appelée alors "chambre de collision". Celle-ci est en général située entre les champs magnétiques et électrostatiques de l'appareil. Le gaz cible est introduit dans la chambre et en même temps continuellement pompé pour éviter la diffusion (la pression est d'environ 10^{-4} mm Hg). Le choix du gaz cible a un grand intérêt. Plus le potentiel d'ionisation (PI) du gaz utilisé est élevé plus la fragmentation sera importante. L'hélium qui possède le PI le plus élevé et la taille minimum apparaît être le meilleur gaz cible. Ce type de chambre se réalise en général sur des appareils de géométrie inversée. L'ion parent passe dans la chambre de collision, où il se fragmente (la quantité d'ions métastables est donc artificiellement augmentée), puis par le balayage du champ électrostatique (balayage B/E), tous les ions fils peuvent être recueillis.

D) Spectrométrie de masse en tandem (MS-MS)

L'utilisation d'un spectromètre de masse pour la séparation de molécules en mélange fut décrite pour la première fois par Beynon et al. (126). Cette technique est très récente car elle demande des appareils très évolués (et donc très chers). Ils sont le plus souvent constitués de quatre secteurs : deux magnétiques et deux électrostatiques, séparés par une chambre de collision (les secteurs sont généralement symbolisés par une lettre, B pour le secteur magnétique, E pour le secteur

électrostatique, C pour la chambre de collision). Dans le premier secteur, un spectre FAB classique permet d'obtenir les ions moléculaires, un des ions est sélectionné, il est alors fragmenté dans la chambre de collision. Enfin le deuxième secteur permet de collecter les ions fils. Ce type d'appareil est très intéressant, car il permet de tirer d'un mélange de produit le spectre particulier de chacun d'eux (s'il n'ont pas la même masse moléculaire). Le spectromètre de masse agit alors comme un appareil de séparation qui permet l'analyse à l'état pur de chacun des composés d'un mélange .

1) Utilisation de la MS-MS pour l'analyse des sucres

Le premier article utilisant cette technique a été publié par Carr et Reinhold (127). Deux oligosaccharides de groupe sanguin de même masse m/z 1115 sont analysés isolement par MS-MS. L'une des structures est linéaire, l'autre est branchée (voir Fig.19 p.64). Nous remarquerons l'intensité relative des ions, qui permet de distinguer les deux structures et la propreté des spectres. Le mécanisme des fragmentations obtenues par collision est représenté sur la figure 20 p.65.

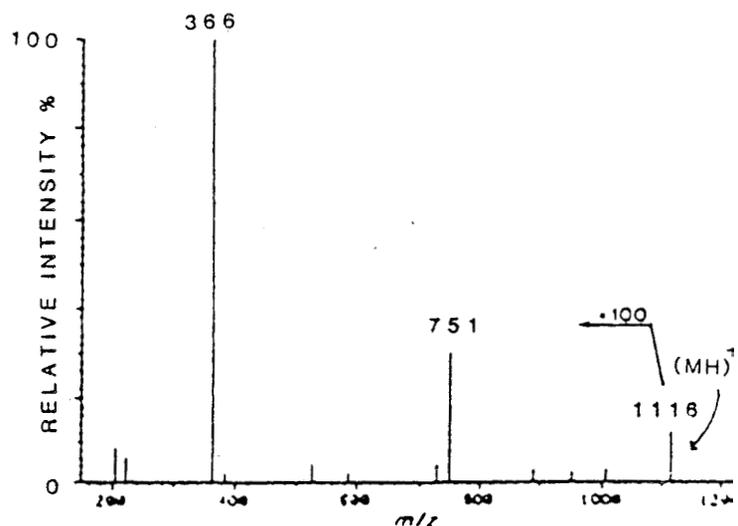
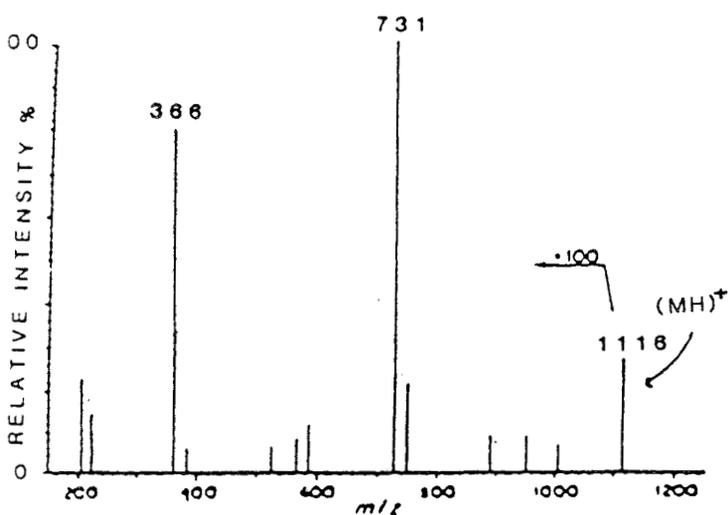
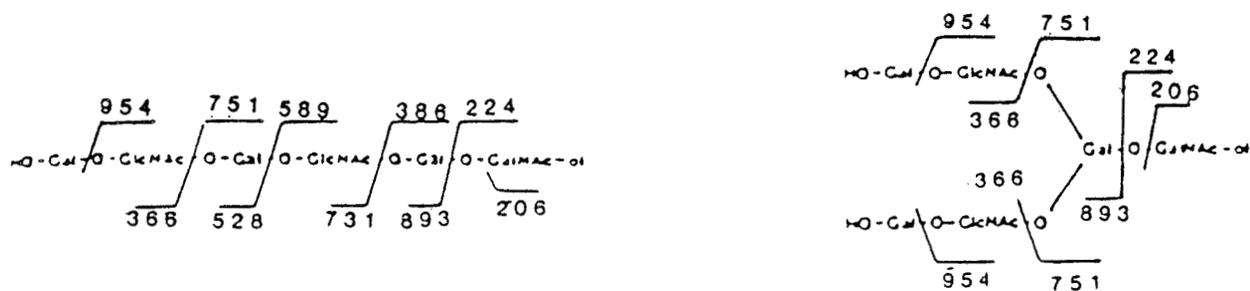


FIGURE 19

Spectres de masse obtenu sur un appareil MS-MS de type (BE-C-EB) après collision de l'ion $(M+H)^+$ 1116. Cet ion étant formé par ionisation en mode FAB positif dans le premier secteur de l'appareil. Energie de collision 8 kV, gaz : Helium 0.1 torr.

- a) d'un hexasaccharide linéaire (127)
- b) d'un hexasaccharide branché de même masse (127) .

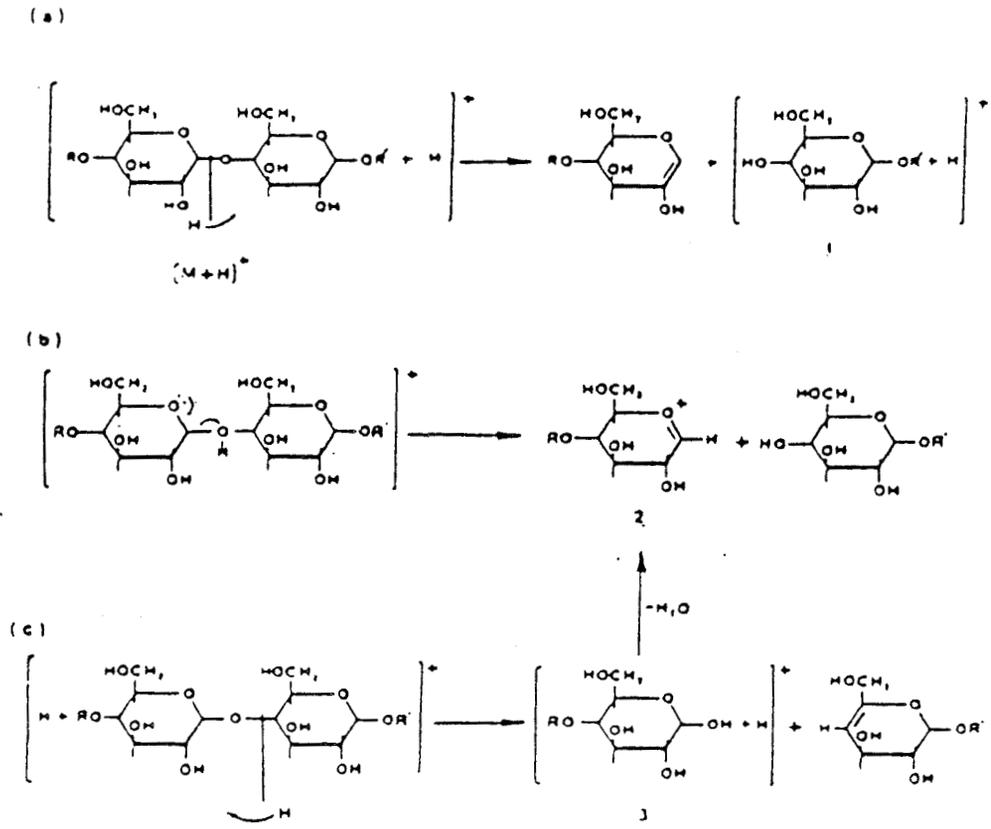


FIGURE 20

Mécanisme des fragmentations ayant lieu dans la chambre de collision (127).

I) COMPARAISON DE LA SONDE FAB CONVENTIONNELLE ET DE LA SONDE FAB A DEBIT CONTINU

A) Matériel et méthodes

1) Choix de l'oligosaccharide

Pour comparer les deux sondes nous avons utilisé un oligosaccharide que nous possédions en grande quantité et au spectre FAB facile à interpréter : Nous avons choisi le lacto-N-tétraose (LNT). L'oligosaccharide, a été méthylé selon la méthode de Ciucanu et al. (128) décrite dans l'appendice technique et analysé par FAB-MS en mode positif, la fragmentation de ce tétrasaccharide est donnée sur la figure 21 p.67.

2) Les sondes

Les analyses conventionnelles sont effectuées avec une canne d'introduction directe. Différentes quantités (1, 0.1, 0.01 μg) de LNT perméthylé en solution méthanolique (1 μl) sont déposées sur l'extrémité en cuivre de la canne. Après séchage la matrice est ajoutée : ici du thioglycérol.

Les analyses à débit continu ont été effectuées avec une sonde spéciale représentée sur la figure 22 p.68. Elle consiste en une tige creuse à l'extrémité de laquelle se trouve une pièce de cuivre taillée en biseau et percée en son centre par un trou de 0.3mm. Un tube capillaire en silice fondue de 1m x 0.075 mm passe à travers la tige et dépasse de la pièce de cuivre de 0.2 mm. Une ferrule en Vespel et un écrou à compression assurent l'étanchéité. Le capillaire est connecté à une vanne rhéodyne 7520 possédant une boucle de 1 μl à très faible volume mort. Cette sonde a été mise au point par Caprioli et al. (46) et prêtée

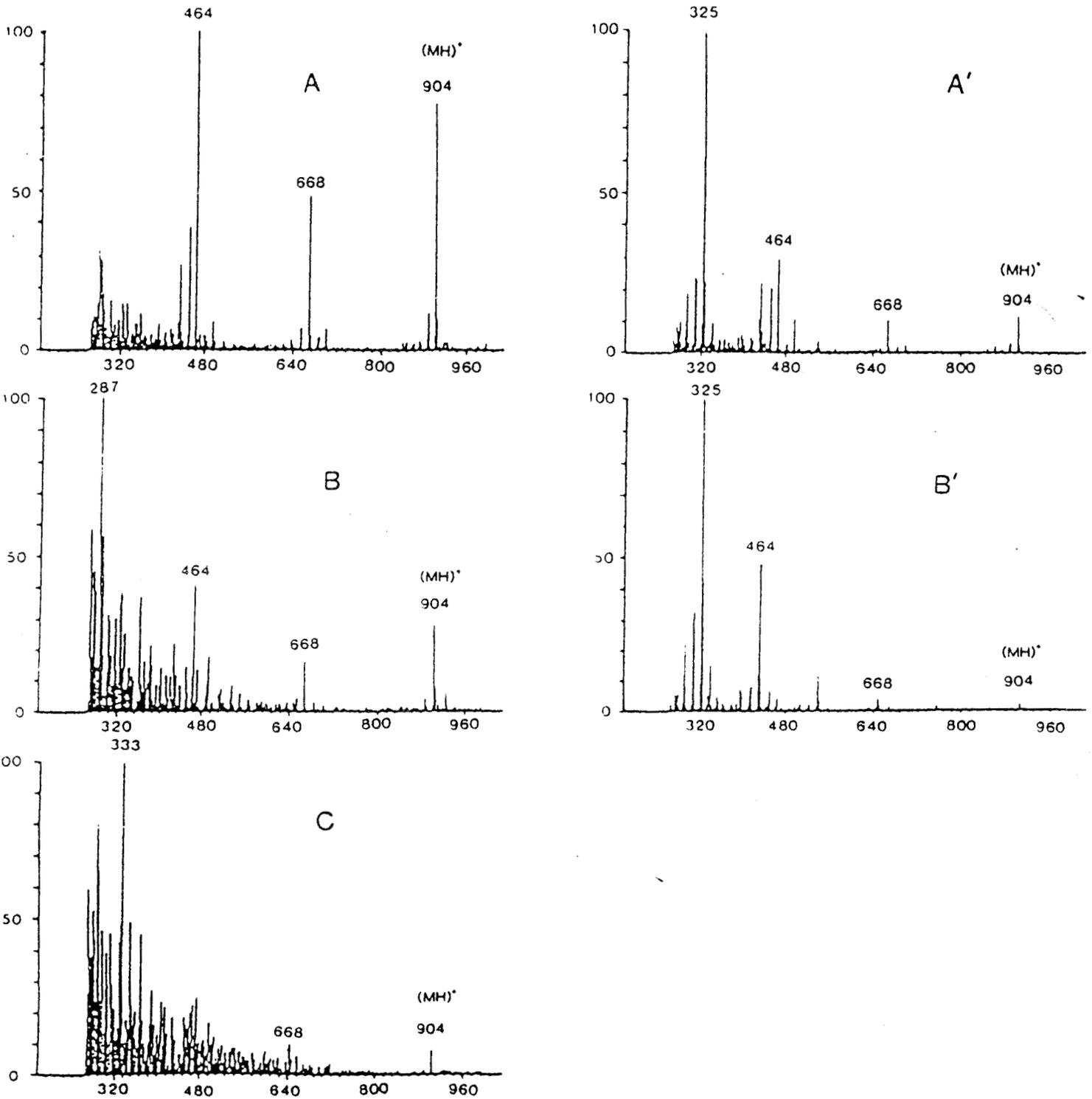


FIGURE 21

Fragmentation et spectres de masse du lacto-N-tétraose perméthylé obtenu avec la sonde à débit continu aux concentrations respectives de 1µg, 100ng, 10 ng (A,B,C) et avec la sonde conventionnelle aux concentrations respectives de 1µg et 100ng (A', B').

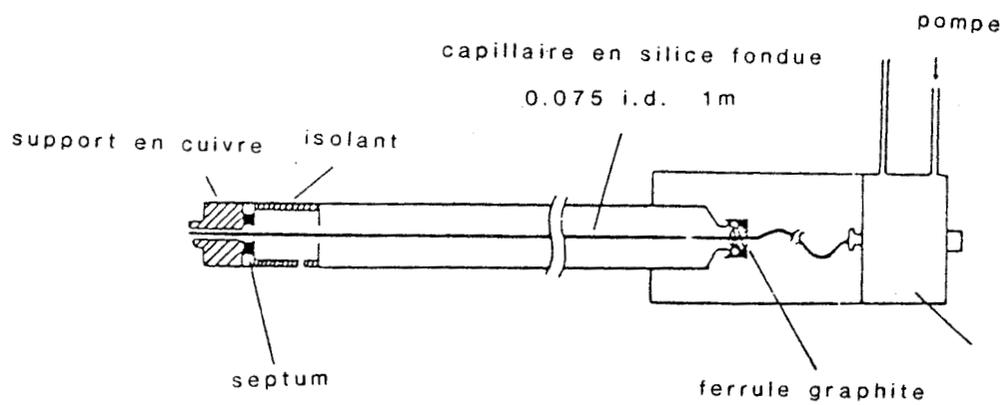


FIGURE 22

Schéma de la sonde à débit continu (46)

par Kratos analytical instrument (Urmston, Manchester, UK). Dans ce type d'analyse le LNT perméthylé est injecté en solution méthanolique (1 μ l) dans le capillaire par l'intermédiaire de la vanne Rhéodyne. L'élution est réalisée par une solution de : méthanol : thioglycérol : eau 90:10:5 (v/v/v), grâce à une pompe seringue (Brownlee Microgradient System, Santa Clara, CA, USA, et Touzart Matignon France) opérant à 5 μ l/min (ce type de pompe est capable de fournir des microdébits sans se désamorcer). Dans ce solvant le thioglycérol sert de matrice, et l'eau empêche l'extrémité du capillaire de se boucher.

3) Le spectromètre de masse

Nous avons utilisé un spectromètre de masse Kratos MS 50 RF haute résolution équipé avec un système de données DS 90 (DGDG/30). Le spectromètre de masse opère avec un potentiel d'accélération de 8 keV. Le canon à atomes rapides est utilisé avec du xénon comme gaz de bombardement dans les conditions suivantes : 7.3 kV, 1.2 mA, l'énergie étant régulée par un module B 50. Dans le cas de l'analyse conventionnelle la sonde n'est pas chauffée. La sonde à débit continu, est quant à elle maintenue à 50°C afin d'éviter la congélation de l'extrémité du capillaire. Les masses de 1000 à 200 sont balayées à raison de 10s par décade avec une résolution en masse de 3000.

B) résultats

Les spectres du LNT sont représentés sur la figure 21 p.67. Nous pouvons observer l'ion moléculaire (MH)⁺ m/z 904 et les fragments m/z 668 correspondant à l'oligosaccharide ayant perdu un hexose terminal et m/z 464 correspondant à l'élimination d'un résidu de lactose terminal. L'ion de masse m/z 325 provient du thioglycerol. Dans l'analyse en FAB conventionnelle de 1 μ g de LNT, l'ion moléculaire est relativement

intense. Par contre pour 100 ng, l'ion 325 devient prédominant, les ions du LNT étant "écrasés" par la trop forte dilution du LNT dans la matrice. A la concentration de 10 ng nous n'avons pu visualiser l'ion moléculaire. Pour les analyses réalisées à l'aide de la sonde à débit continu, nous observons une intensité accrue de l'ion moléculaire en comparaison de celle que nous avons obtenu pour l'analyse en mode conventionnelle (Fig.21a et Fig.21a'). La différence est encore plus marquée pour l'analyse de 100 ng d'oligosaccharides (Fig.21b et Fig.21b'). Enfin, Avec cette sonde, il est possible de visualiser l'ion moléculaire pour une quantité de 10 ng de LNT perméthylé (Fig.21c). Nous pouvons expliquer ce résultat d'une part à cause de la très faible quantité de matrice utilisée (< à 10 %), d'autre part parce que le LNT est élué à l'extrémité du capillaire sous forme ponctuelle grâce à l'effet de concentration de la capillaire.

D'aussi bons résultats ont été obtenus sur des oligosaccharides de masse moléculaire élevée, par exemple pour un oligosaccharide de l'ovomucoïde de poule (oligosaccharide 14) de masse m/z 2843 (voir appendice technique) nous obtenons pour une analyse de 0.1 μ g d'oligosaccharide perméthylé une très bonne intensité du pic de masse moléculaire, comme le montre le spectre FAB (Fig.23 p.71).

C) conclusion

Nous nous apercevons de la supériorité de la sonde à débit continu par rapport à la sonde classique pour l'analyse des microquantités. D'autre part, cette canne d'introduction peut demeurer dans la source, ce qui permet des injections rapprochées d'échantillons. Nous n'avons pas observé d'effet mémoire d'une injection à l'autre.

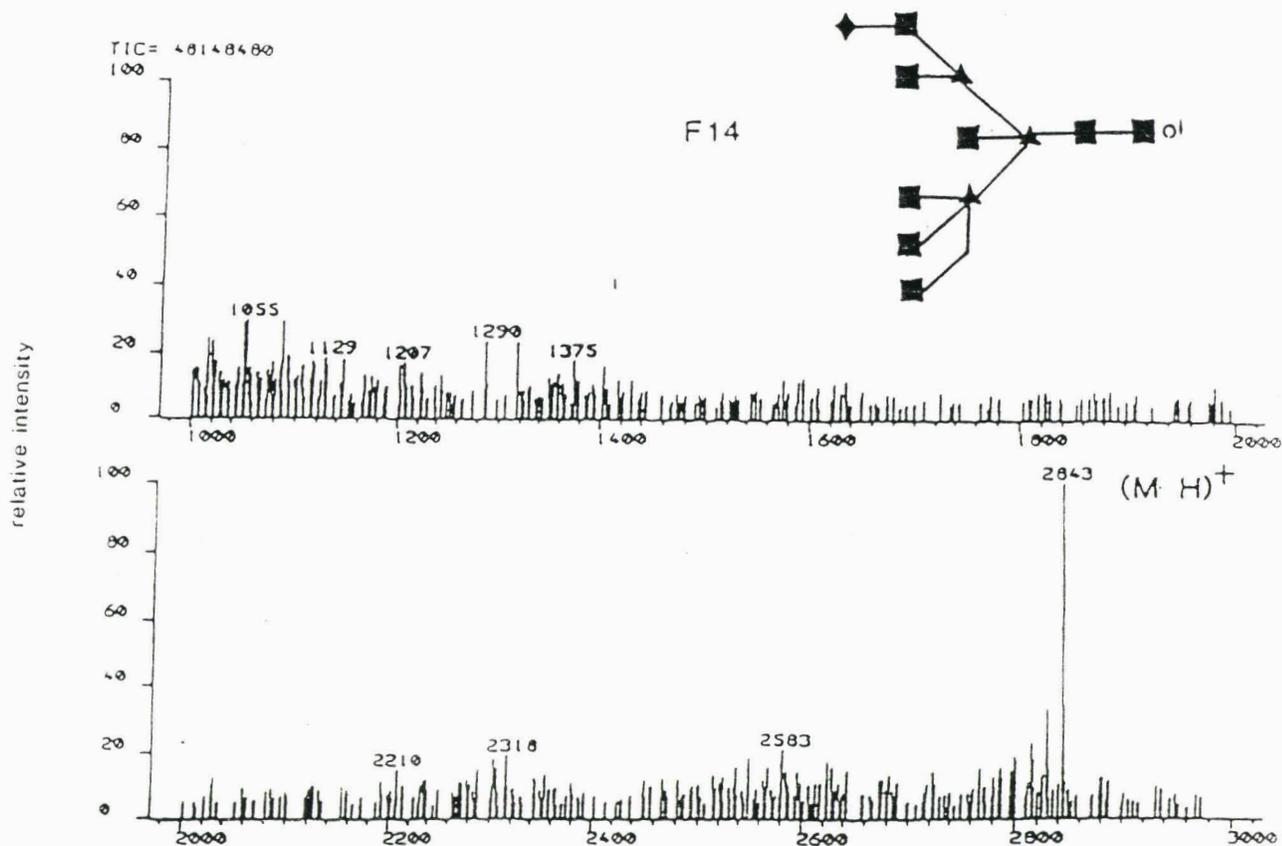


FIGURE 23

Spectre de masse de 100 ng d'oligosaccharide 14 perméthylé en mode d'ionisation FAB positif purifié à partir de la fraction neutre de l'ovomucoïde de poule. (■) GlcNac, (▲) Man, (◆) Gal.

II) UTILISATION DE LA SONDE A DEBIT CONTINU COMME INTERFACE

A) Matériel et méthodes

1) Choix du mélange d'oligosaccharides

Pour réaliser cette expérience nous avons utilisé les oligosaccharides neutres de l'ovomucoïde de poule qui forment un mélange complexe dont les structures ont été déterminées par le groupe de Kobata (129-130) et par le groupe de Montreuil (69, 131-133). Ces molécules ont été analysées après perméthylation.

2) La sonde

Nous avons utilisé la sonde à débit continu de Caprioli que nous avons modifiée. A cet effet nous avons déconnecté le capillaire de la boucle d'injection pour le relier à la microcolonne grâce à une union MVSV/004 (SGE, Victoria, Australia) munie de ferrules FS4 (Interchim). Ce type de joint présente un volume mort quasiment nul.

3) la colonne

La séparation des oligosaccharides perméthylés a été effectuée sur une colonne capillaire (250 x 0.32mm) remplie avec une phase reverse RoSil C18 D ayant des particules de 5µm de diamètre. Cette colonne nous a été fournie par RSL/Alltech, Europe, Eke, Belgique.

L'élution est réalisée grâce à une pompe seringue (Brownlee micro-gradient system, Touzart Matignon France) opérant à 5µl/min. L'échantillon (4.5µg) est injecté en solution méthanolique (1µl) par l'intermédiaire d'une vanne Valco munie d'une boucle de 60nl. La colonne est équilibrée dans un solvant constitué de : 80% de solvant A (méthanol : Thioglycerol : eau 90 : 10 : 5 (v/v/v)) et 20% de solvant B

(thioglycerol : eau 10 : 90 (v/v). Après l'injection les oligosaccharides perméthylés sont élués à l'aide d'un gradient de 80% de solvant A, 20% de solvant B jusqu'à 100% de solvant A en 20 minutes suivi d'une élution d'une heure à 100% de solvant A.

4) le spectromètre de masse

Nous avons utilisé les mêmes conditions que pour l'analyse effectuée à l'aide de la sonde à débit continu sur le LNT (voir p.69 paragraphe 3). Les masses de 3200 à 900 sont balayées à raison de 10s/décade avec une résolution en masse de 3000.

B) résultats

La figure 24 p.74 nous donne la variation du courant ionique total du spectromètre de masse en fonction du temps de rétention. Nous observons une très bonne séparation des oligosaccharides méthylés. Les oligosaccharides 1-7-11-14 décrits par Paz Parente et al. (132-133) sont indiqués par une flèche. Le spectre de masse des oligosaccharides 1 et 7 (Fig.25 p.75) montrent la présence de l'ion moléculaire (MH)⁺ m/z 1166 pour l'oligosaccharide 1 et m/z 2147 pour l'oligosaccharide 7 (l'ion m/z 1902 correspond à la perte d'une osamine).

Nous avons d'autre part effectué une reconstruction d'ion (RIC) (voir Fig.26 p.76) pour les masses données dans le tableau IV p.77 et qui correspondent aux principaux oligosaccharides contenus dans la fraction neutre de l'ovomucoïde de poule. Nous constatons que les pics sont élués par ordre croissant de masse. Nous obtenons d'autre part une profusion de pics. Celle ci est due d'une part aux nombreux isomères oligosaccharidiques présents dans l'ovomucoïde de poule d'autre part à la fragmentation qui a lieu dans la source (élimination d'osamines ou de galactoses terminaux). Ce phénomène a déjà été constaté par Egge et al.

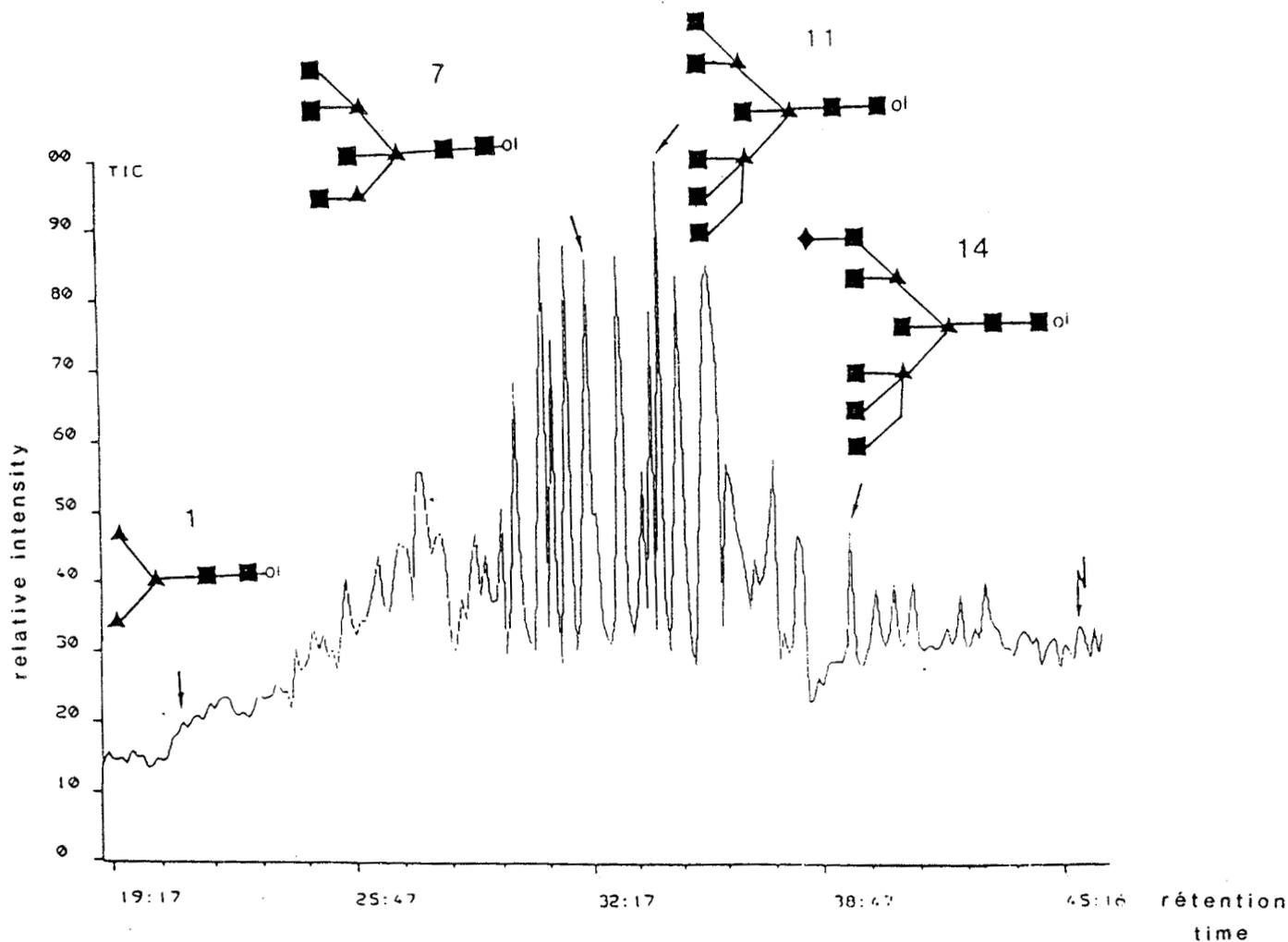


FIGURE 24

Courant ionique total donné par l'injection des oligosaccharides perméthylés isolés de l'ovomucoïde de poule sur colonne capillaire d'HPLC remplie. Les oligosaccharides 1, 7, 11, et 14 sont localisés et leur structure décrite. (■) GlcNAc, (▲) Man, (◆) Gal. La flèche brisée montre l'éluion d'un nouvel oligosaccharide analysé dans la Figure 27.

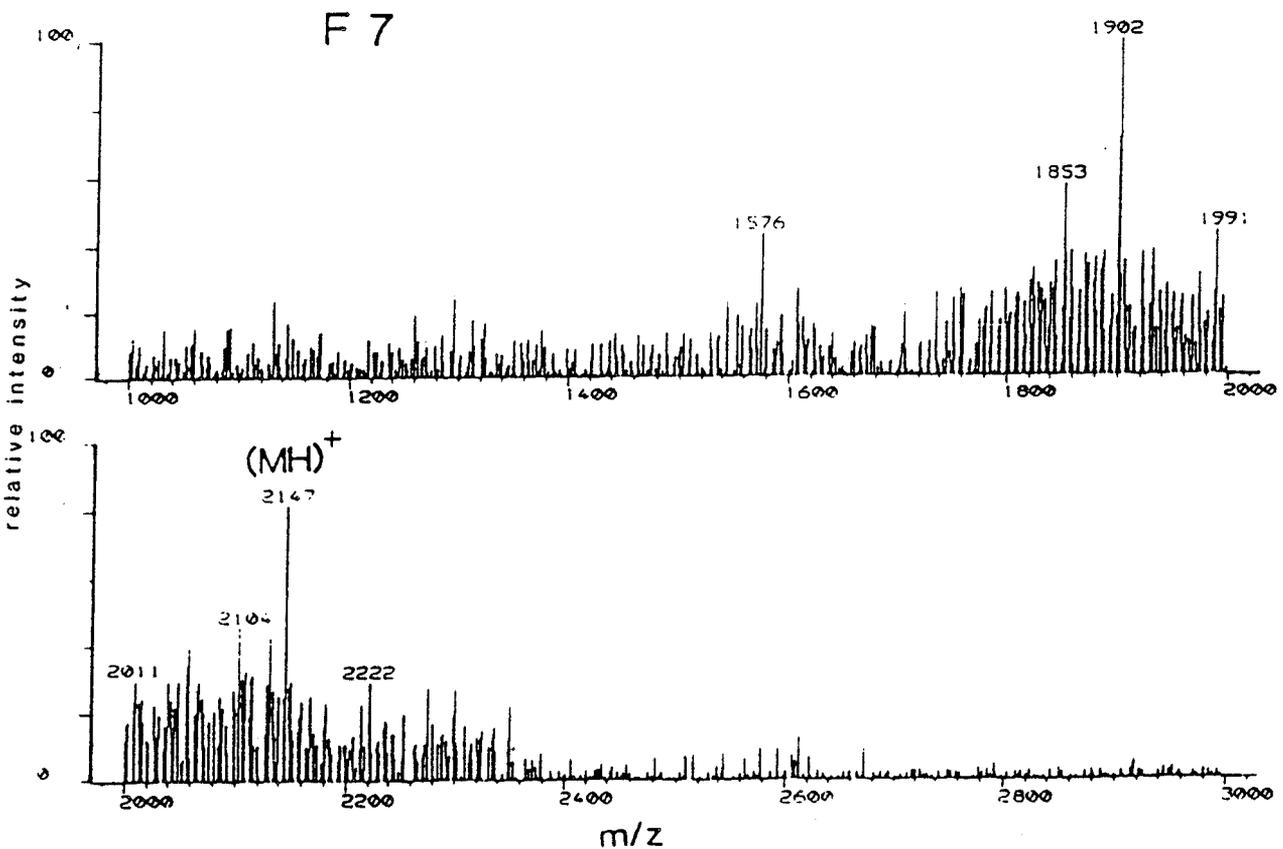
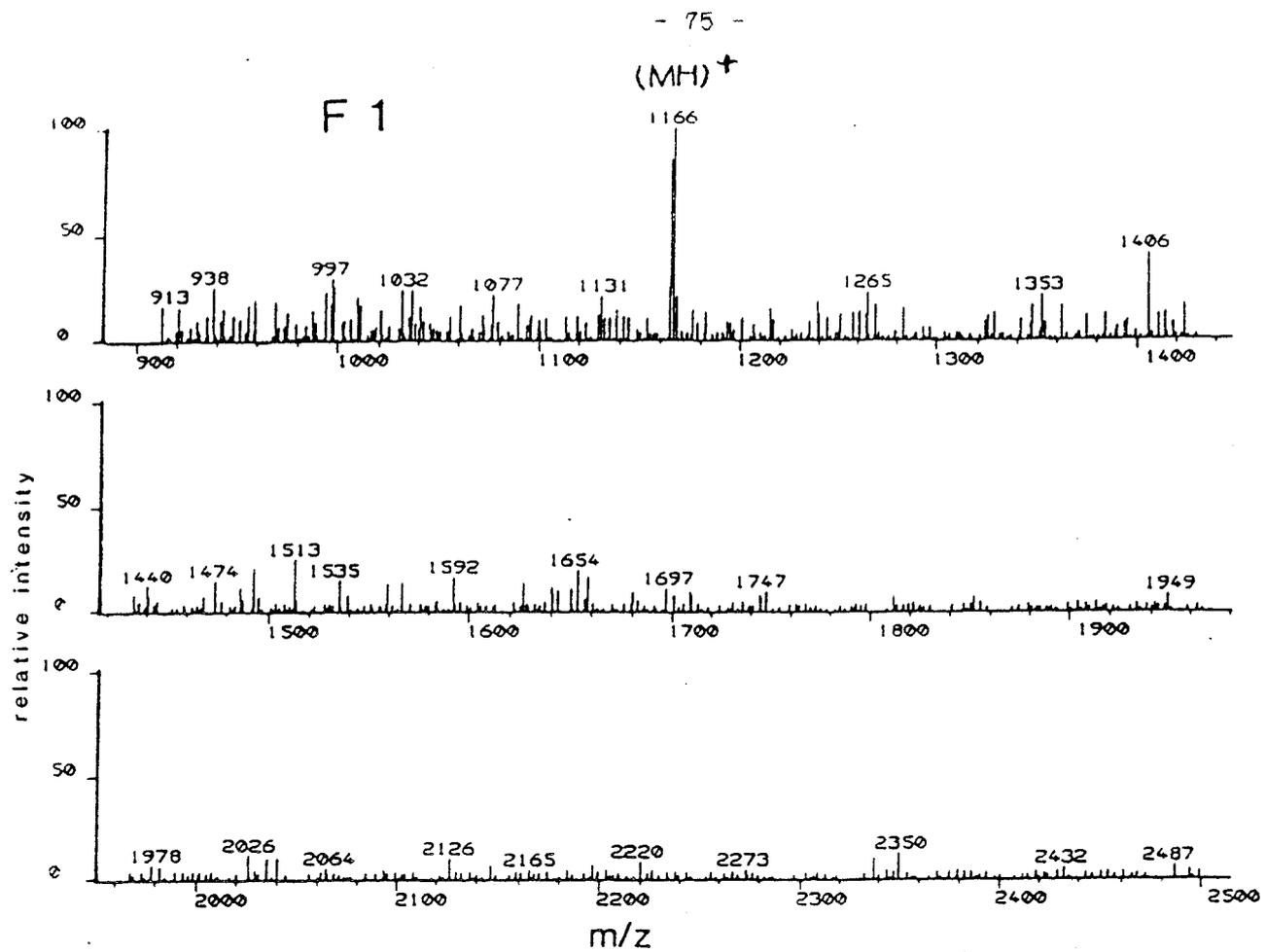


FIGURE 25

Spectres de masse en mode d'ionisation FAB positif des oligosaccharides 1 et 7 perméthylés obtenus par LC-FAB-MS à partir des oligosaccharides neutres de l'ovomucoïde de poule.

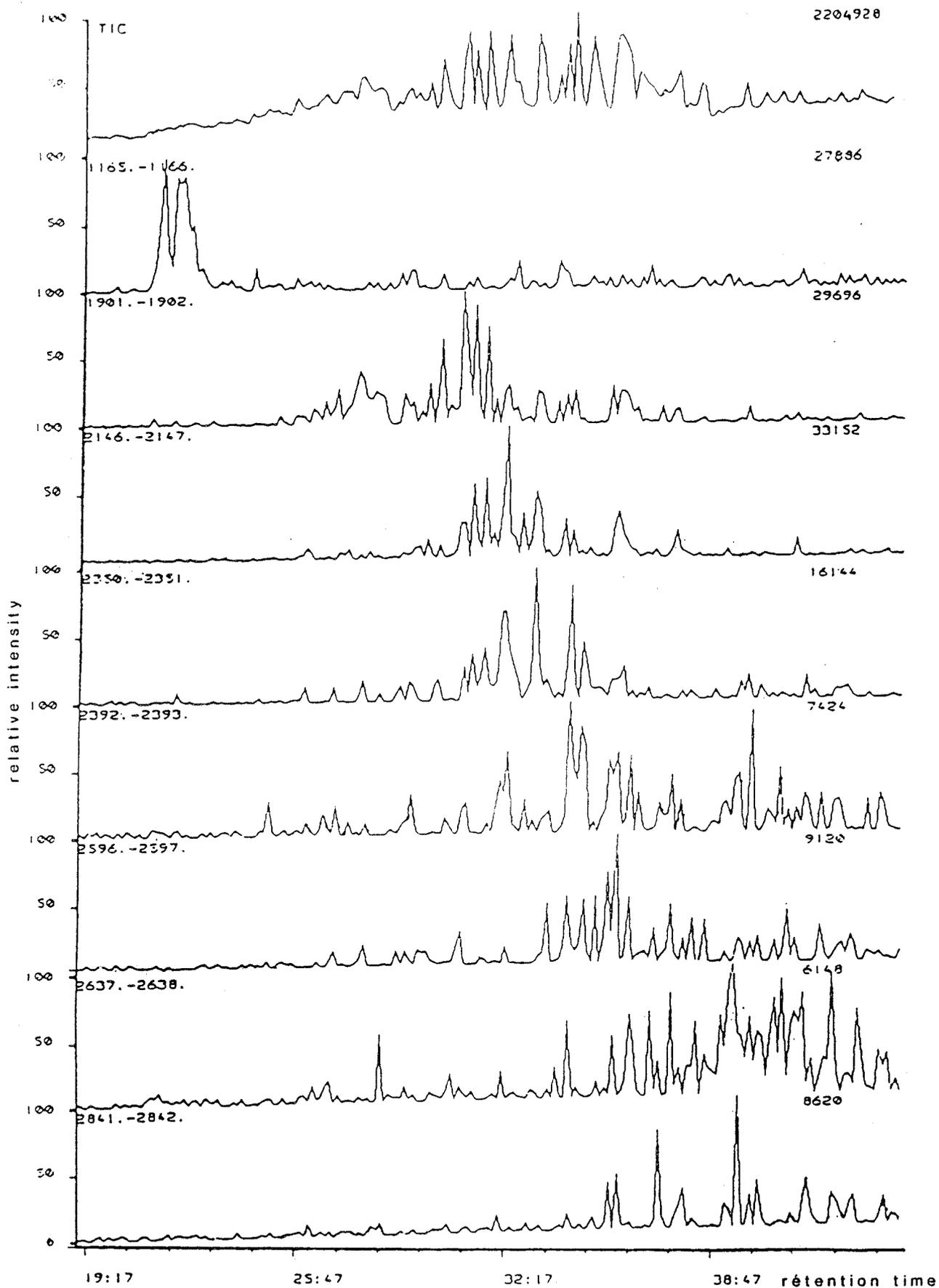


FIGURE 26

Chromatogramme établi à partir du courant ionique total (TIC) et à partir des masses décrites dans le tableau IV correspondant aux différents oligosaccharides neutres de l'ovomucoïde de poule (RIC).

TABLEAU IV

Masse moléculaire exacte des différents oligosaccharides neutres perméthylés de l'ovomucoïde de poule.

Masse moléculaire	Rapports molaires			
	Gal	Man	GlcNAc	GlcNAc-ol
1165	0	3	1	1
1901	0	3	4	1
2146	0	3	5	1
2350	1	3	5	1
2392	0	3	6	1
2596	1	3	6	1
2637	0	3	7	1
2841	1	3	7	1
2882	0	3	8	1
3086	1	3	8	1

Les rapports molaires sont calculés sur la base de 3 mannoses (Man)

(69) pour l'analyse de ces mêmes oligosaccharides effectuée à l'aide de la FAB-MS mais avec une sonde classique.

Enfin nous avons voulu vérifier la présence ou l'absence d'oligosaccharides hexaantennés, molécules qui n'ont pas encore été décrites à ce jour. Aucun pic de masse m/z 2882 correspondant à un oligosaccharide hexaantenné sans galactose n'a pu être visualisé. Par contre nous avons été surpris de trouver un pic de masse m/z 3086 correspondant à une structure hexaantennée possédant du galactose, du mannose, de la N-acétylglucosamine et de la N-acétylglucosaminitol dans les rapports molaires 1/3/8/1 respectivement. L'élution de cet oligosaccharide est indiqué sur la Fig.24 p.74 à l'aide d'une flèche brisée. La Fig 27 p.79 illustre le spectre de masse de ce nouvel oligosaccharide.

C)discussion

1)la colonne

Les essais de séparation d'oligosaccharides perméthylés obtenus en chromatographie de phase reverse à partir de glycannes isolés de glycoprotéines, nous ont toujours donné des résultats peu convaincants. A l'inverse, Mc Neil et al. (87-88) sur des produits d'hydrolyses partielles de polysaccharides peracylés obtiennent des séparations intéressantes. Ces résultats sont le fait d'une certaine homogénéité dans les structures oligosaccharidiques obtenues à partir des polysaccharides constitués d'unité de répétition. Il n'en est pas de même avec les oligosaccharides isolés de glycoprotéine, souvent très branchés et qui se comportent différemment en HPLC de phase reverse. Par contre, l'utilisation de colonnes capillaires remplies nous a fourni d'excellents résultats, comparables à ceux obtenus en colonne de phase

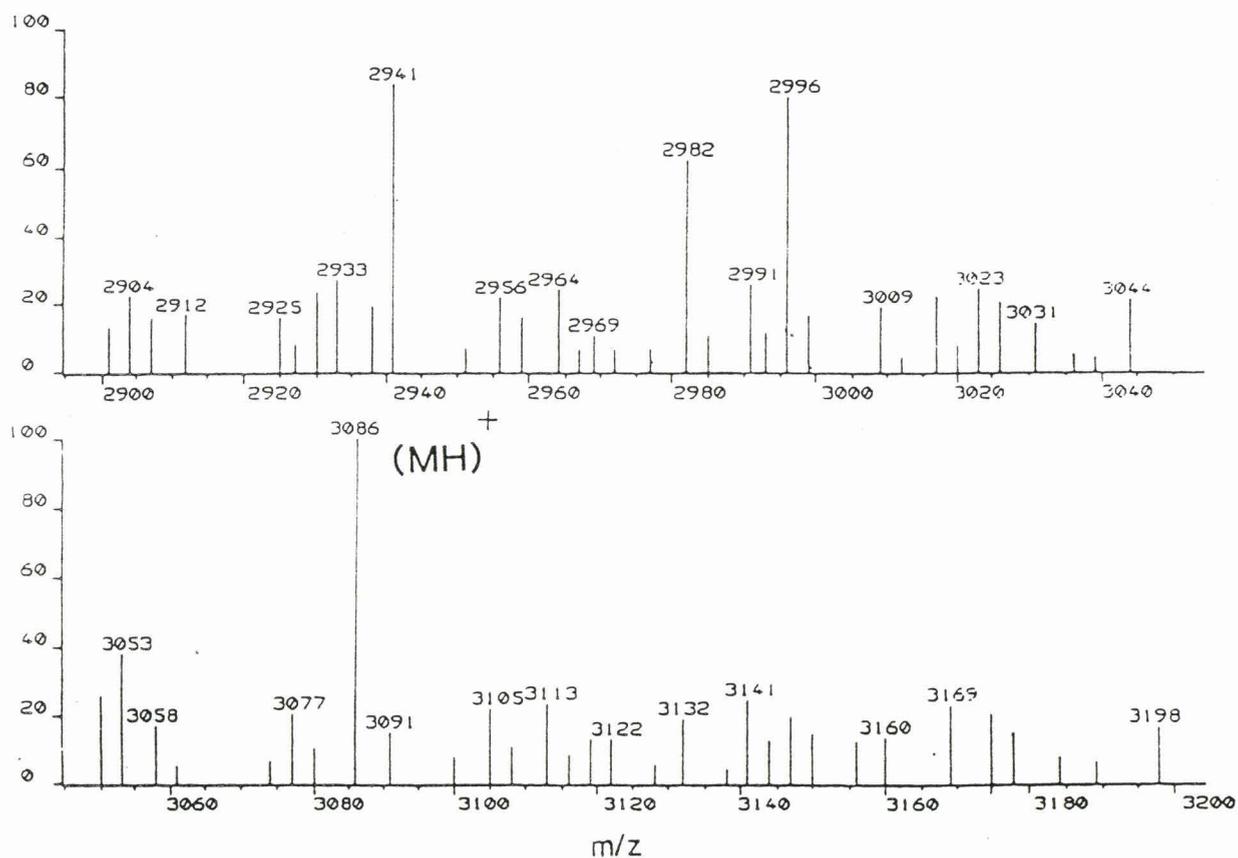


FIGURE 27

Spectre de masse de l'oligosaccharide perméthylé obtenu par LC-FAB-MS et indiqué par une flèche brisée sur le chromatogramme de la Fig. 24.

normale pour des oligosaccharides natifs. L'utilisation de micro-colonne présente de plus le grand avantage de pouvoir travailler avec des micro-débits (1µl/min) compatibles avec les capacités de pompage du spectromètre de masse. Ensuite, le faible diamètre de cette colonne a pour effet de concentrer l'échantillon en sortie de colonne. L'intensité du courant ionique total reste donc forte malgré les faibles quantités injectées. Enfin ces capillaires remplis permettent, contrairement aux colonnes capillaires vraies, l'utilisation de vannes d'injection classiques et l'injection de volumes raisonnables (1µl) grâce à leurs capacités supérieures. Toutefois, la minimalisation des volumes morts, notamment au niveau de la vanne d'injection et du joint de raccordement entre la colonne capillaire et l'interface reste essentielle.

Nous avons constaté une dégradation assez rapide des performances de la colonne, provoquée par le tassement des particules, ce qui induit une augmentation du volume mort en tête de colonne, et par la présence dans l'éluant du thioglycérol qui peut interagir avec le garnissage de la colonne. Ce dernier point pourrait être levé par ajout du thioglycérol après la colonne à l'aide d'une deuxième pompe.

2) l'interface

L'interface utilisée a l'avantage de ne donner qu'un faible bruit de fond et de ne pas provoquer de trainées sur l'arrière des pics. Ce résultat est dû à l'absence d'effet mémoire de cette interface. Nous notons qu'Ito et al. (45) premiers auteurs à réaliser un spectre FAB sur l'éluant d'une colonne capillaire remplie avaient observé ce phénomène. Cet effet de trainée est à mettre à l'actif de l'interface utilisée, celle-ci étant constituée par un fritté placé à l'extrémité de la colonne capillaire. Enfin l'interface à débit continu permet de travailler au moins une heure sans diminution notable de la qualité

d'analyse dans le temps. La sensibilité, en particulier ne diminue pas. Ceci est dû à la faible pollution de la source par la matrice utilisée en faible quantité.

D) Conclusion

Nous pouvons constater le très grand intérêt de la colonne capillaire remplie et de l'interface constituée par la sonde à débit continu. Elles permettent d'avoir sur des micro quantités de bonnes séparations et un courant ionique très intense. D'autre part l'utilisation du spectromètre de masse comme détecteur en sortie de colonne nous fournit des informations sur la structure des composés élués. C'est ainsi qu'il a été possible de détecter une masse correspondant à une structure hexaantennée. Ce résultat est à confirmer à l'aide d'autres techniques. S'il se révélait exact, nous devrions pouvoir mettre en évidence une nouvelle N acétylglucosaminyl transférase capable de fixer une N-acétyl glucosamine sur le mannose lié en 3 en position 6. Cette N-acétylglucosaminyl transférase prendrait le chiffre VI dans la nomenclature de Schachter (134).

Ce travail a fait l'objet d'un mémoire qui sera publié prochainement dans Analytical Biochemistry et dont nous présentons dans les pages suivantes les épreuves.

Continuous-Flow Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometry of Permethylated Oligosaccharides: A Comparative Study of Direct Mixture Analysis with Packed Capillary Column Liquid Chromatography-Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometry¹

PATRICK BOULENGUER,* YVES LEROY,* JOSEFA MARIA ALONSO,* JEAN MONTREUIL,*
BERNARD FOURNET,*² GUY RICART,† COLLIN COLBERT,‡ DIRK DUQUET,§
AND CHRIS DEWAELE§

*Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois (UA du CNRS No. 217 et Laboratoire National du MEN), 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France; †Laboratoire de Spectrométrie de Masse de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France; ‡Kratos Analytical Instrument, Urmston, Manchester, United Kingdom; and §RSL, Alltech Europe, Eke, Belgium

Received June 9, 1987

Conventional positive fast atom bombardment (FAB) and continuous-flow FAB analysis were carried out with permethylated lacto-*N*-tetraose. This latter method, a new approach, has been used to analyze a mixture of permethylated oligosaccharides by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) with a packed capillary fused-silica column and the continuous-flow probe as interface. Under these conditions, we found the continuous-flow probe to be superior to the conventional probe because its low matrix level increased the signal-to-noise ratio. The analysis of the mixture of permethylated oligosaccharide alditols obtained from hen ovomucoid by LC-MS using the continuous-flow probe as interface is described. © 1988 Academic Press, Inc.

KEY WORDS: mass spectrometry; carbohydrate; LC-MS; FAB-MS; continuous flow FAB.

Fast atom bombardment (FAB)³ has greatly facilitated structural studies of non-volatile and thermally labile molecules (1-3). In studies of carbohydrates, Forsberg *et al.* (4) applied it to unmodified polysaccharides and Dell *et al.* (5,6) applied it to unmodified, permethylated, and peracetylated oligosaccharides and glycosphingolipids. In a new approach to the FAB method for carbohydrate study, Carr *et al.* used tandem mass

spectrometry, which allows selection of a molecular ion in the first mass spectrometer and fragmentation of the ion in the second mass spectrometer. An important aspect of the primary structure determination of polysaccharides is the analysis of peralkylated oligosaccharides obtained by formolysis of methylated polysaccharides by LC-MS with chemical ionization (8-10). LC-MS using FAB has not been applied to carbohydrates until now and no example of high-molecular-weight carbohydrate analysis using thermospray (11,12) or moving belt LC-MS interface (13) has been described. Because of their small internal column volumes, micro-LC columns allow direct coupling with the FAB source (14). The only problem posed by this technique is the tailing of the peaks due to the interface (14).

¹ Presented in part at the IXth International Symposium on Glycoconjugates, July 6-11, 1987, Lille, France.

² To whom correspondence should be addressed.

³ Abbreviations used: FAB-MS, fast atom bombardment-mass spectrometry; LNT, lacto-*N*-tetraose; LC-MS, liquid chromatography-mass spectrometry; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; GlcNAc-ol, *N*-acetylglucosaminitol.

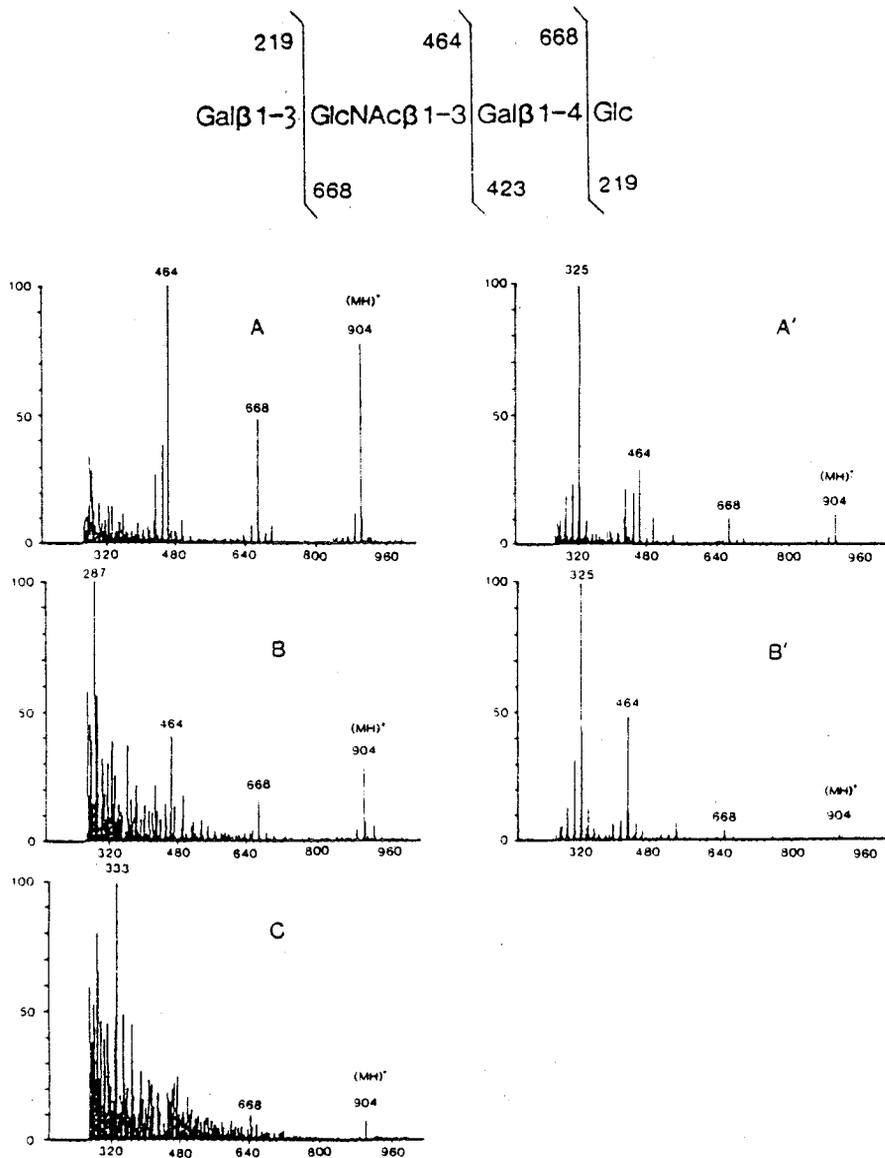


FIG. 1. Positive FAB mass spectra of 1, 0.1, and 0.01 μg permethylated LNT (A, B, and C) with continuous-flow probe and of 1 and 0.1 μg permethylated LNT (A' and B') with conventional probe.

To improve peak formation, we used as the interface for LC-MS the continuous-flow probe developed by Caprioli *et al.* (15). We applied this method to the micro-LC analysis of a mixture of permethylated oligosaccharide alditols obtained from hen ovomucoid. Before this experiment, we compared results obtained by the positive FAB analysis of per-

methyated lacto-*N*-tetraose with the conventional probe and the analysis carried out with the continuous-flow probe.

MATERIALS AND METHODS

Mass spectrometer. A Kratos MS 50 RF high-resolution mass spectrometer equipped

with a DS 90 (DGDG/30) data system was used in these studies. The mass spectrometer was operated at a 8-keV accelerating potential. An Ion Tech Model B11NF saddle field fast atom source energized with the B 50 current-regulated power supply was used with xenon employed as the bombarding atom (operating conditions: 7.3 kV, 1.2 mA).

For classical FAB analysis permethylated lacto-*N*-tetraose was dissolved in 1 μ l of methanol and loaded on the copper tip with thioglycerol. In this case the source housing was not heated.

For continuous-flow FAB analysis, permethylated lacto-*N*-tetraose dissolved in methanol was introduced with a Rheodyne Model 7520 injection valve. The solvent, methanol:thioglycerol:water (90:10:5, v/v/v) was delivered by a Brownlee syring pump (Brownlee Microgradient System, Santa Clara, CA, and Touzart, Matignon, France) operated at 5 μ l/min. In this case the source housing was maintained at 40°C. The continuous-flow probe is described in Ref. (15).

For the analysis of the permethylated lacto-*N*-tetraose, the mass range 1000 to 200 was scanned at 10 s/decade with a mass resolution of 3000. For the LC-MS analysis of the permethylated oligosaccharide alditols from ovomucoid, the mass range 3200 to 900 was scanned at 10 s/decade with a mass resolution of 3000.

Micro-LC with a packed fused-silica column. The microdelivery system consists of a

Brownlee syringe pump equipped with a 60- μ l Valco injection valve. The analysis of permethylated oligosaccharides from hen ovomucoid (4.5 μ g) was performed on a fused-silica micro-LC column (250, 0.32 mm) packed with 5 μ m RoSil C 18D (RSL/Alltech, Europe, Eke, Belgium). The flow rate was 5 μ l/min.

The column was connected directly to the capillary of the continuous-flow probe by a SGE (Victoria, Australia) MVSV/004 union. The elution was carried out with following gradient: 80% of solvent A (methanol:thioglycerol:water, 90:10:5, v/v/v) and 20% of solvent B (thioglycerol:water, 10:90, v/v) to 100% of solvent A in 20 min followed by isocratic conditions for 1 h.

Sample preparation. Lacto-*N*-tetraose was isolated according to Kuhn *et al.* (16). Ovomucoid was prepared according to Fredericq and Deutsch (17). The asialoglycopeptides β from hen ovomucoid were fractionated after Pronase digestion according to Monsigny *et al.* (18). Oligosaccharides were released from asialoglycopeptides β by alkaline hydrolysis (19). The resulting oligosaccharide alditols were *N*-reacetylated according to Reading *et al.* (20). The methylation procedure is described in Ref. (21). After methylation, the permethylated oligosaccharides were purified on Iatro beads (Toyo Soda Company, Japan) washed with chloroform and chloroform:methanol (95:5, v/v). The elution of the permethylated oligosaccharides was carried out by using chloroform:methanol, 90:10 (v/v) and chloroform:methanol:water, 75:25:4 (v/v/v).

TABLE I

COMPARISON OF THE INTENSITY OF PROTONATED MOLECULE (MH)⁺ OBTAINED BY CONTINUOUS-FLOW PROBE (CFP) AND CONVENTIONAL PROBE (GP) FAB ANALYSIS OF PERMETHYLATED LNT

Quantity of sample (μ g)	Intensity of (MH) ⁺		Ratio of (MH) ⁺ peak intensities (CFP/CP)
	CFP	CP	
1	756,449	219,709	3.4
0.1	81,401	54,067	1.5
0.01	22,118	—	—

RESULTS AND DISCUSSION

Positive FAB analyses of permethylated lacto-*N*-tetraose carried out with conventional and continuous-flow probes are compared in Fig. 1 and Table I. For this oligosaccharide the peaks due to the protonated molecule (MH)⁺ at *m/z* 904 and its fragments at *m/z* 668 correspond to the elimination of one terminal hexose: the peak at *m/z* 464, corresponds to the elimination of a re-

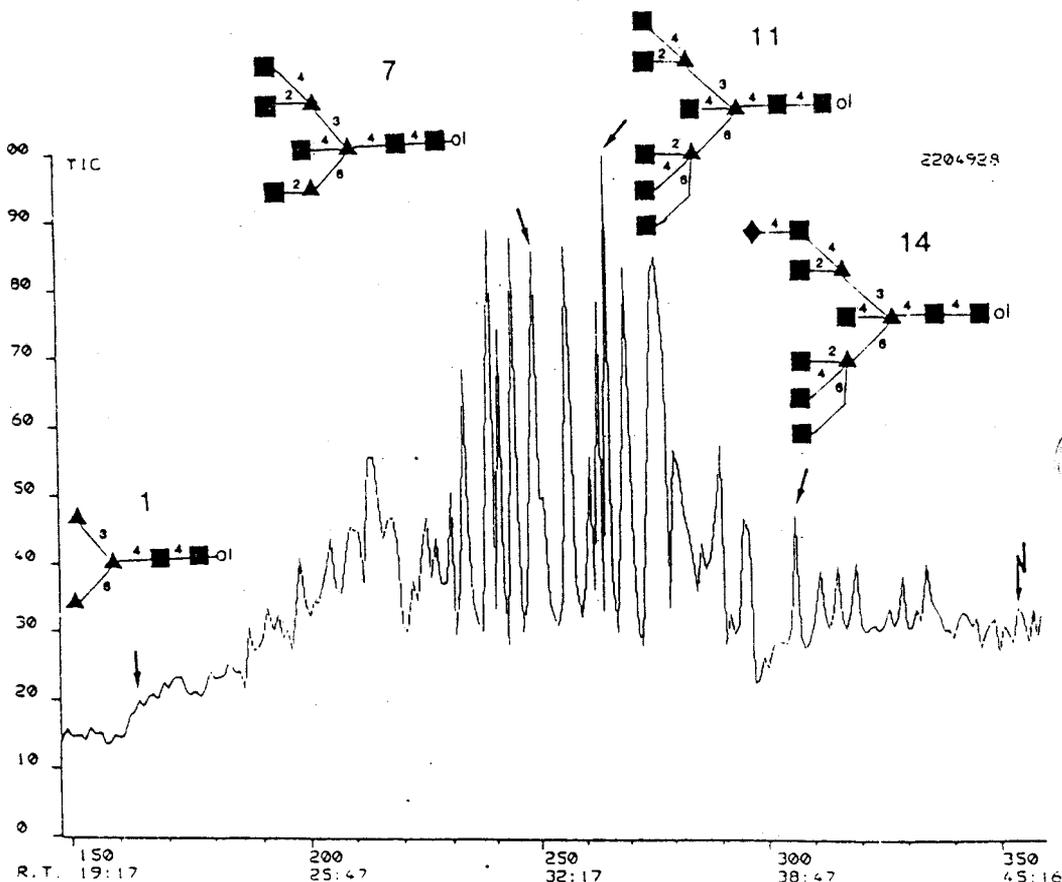


FIG. 2. Total ionic current of the permethylated oligosaccharides from hen ovomucoid on a packed fused-silica capillary column. Oligosaccharides 1, 7, 11, and 14 are localized and their structures are shown. (■) GlcNAc, (▲) Man, (◆) Gal. The broken arrow shows the elution of a new oligosaccharide analyzed in Fig. 4.

ducing terminal lactose residue. The peak at m/z 325 is due to the thioglycerol matrix. Several years ago, Karlsson (22,23) and Fredman *et al.* (24) obtained good results on the fragmentation and determination of molecular ions by mass spectrometry of permethylated glycolipids. Table I clearly shows that for detection of $(MH)^+$ in permethylated LNT, continuous-flow FAB is 1.5 times more sensitive with $0.1 \mu\text{g}$ and 3.4 times more sensitive with $1 \mu\text{g}$ than conventional FAB. This increased sensitivity is due to the low level of thioglycerol used in the continuous-flow FAB mode, indicated by the absence of a peak at m/z 325. This ion is the

major one in the mass spectra of permethylated LNT in the conventional FAB mode. Another effect of the continuous-flow probe is the residence time of the sample in the source, which can be controlled by the flow delivery system without the necessity of cooling the sample probe, as in the method of Falick *et al.* (25).

The quality of the separation by micro-LC coupled to FAB-MS is illustrated by the very slight deformation of peaks due to the suitability of the probe (Fig. 2). This is an improvement over the results obtained by Ito *et al.* (14), who observed a tailing of the peaks. Figure 2 demonstrates the good separation of

a mixture of permethylated oligosaccharide alditols from hen ovomucoid and characterizes oligosaccharides 1, 7, 11, and 14 (26). In Fig. 3, we give the LC-MS continuous-flow FAB mass spectra of oligosaccharides 1 and 7. The FAB spectrum of compound 1 gives an intense pseudomolecular ion at m/z 1166 (MH)⁺; this was accompanied by signals corresponding to column background. Compound 7 shows a pseudomolecular ion at

m/z 2147 (MH)⁺ accompanied by signals at 245 m units lower (m/z 1902), indicating a difference of one *N*-acetylglucosamine residue. This cleavage of the glycosidic bond of glucosamine in the nonreducing terminal position has been observed already in conventional FAB mass spectra of the same oligosaccharides by Egge *et al.* (27). The intensity of the signal of the protonated molecule is satisfactory despite the low quantities in-

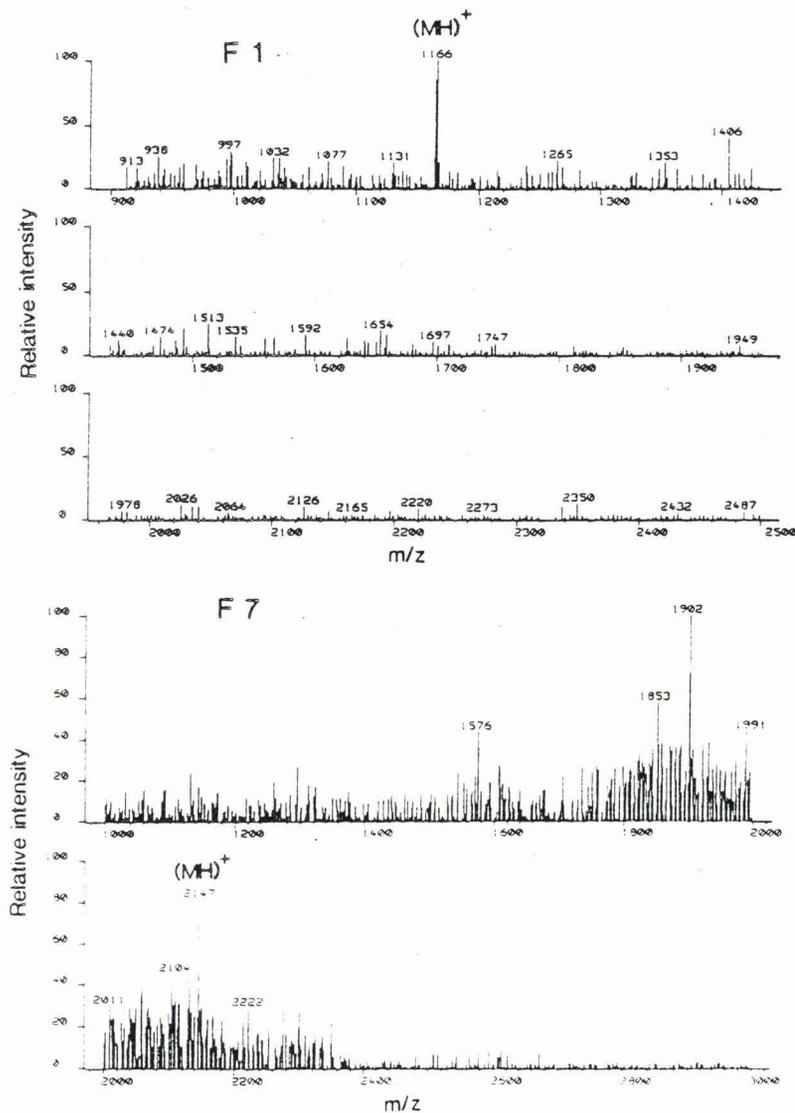


FIG. 3. Positive FAB mass spectra of oligosaccharides 1 (MH)⁺ m/z 1166 and 7 (MH)⁺ m/z 2147.

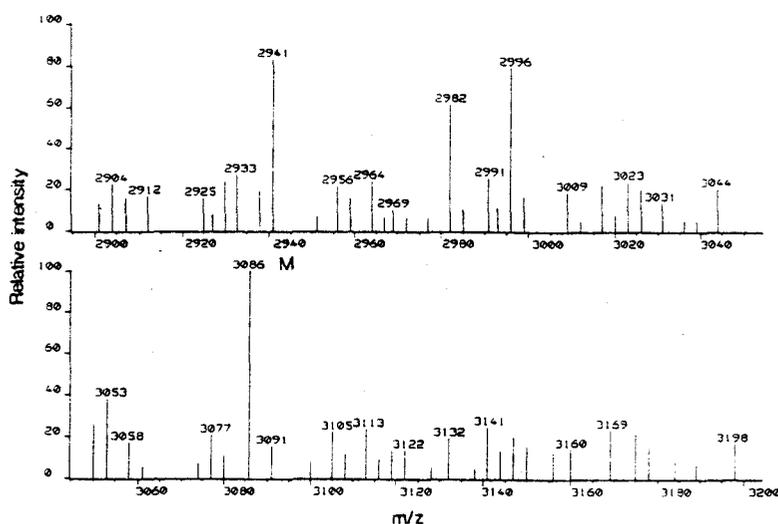


FIG. 4. Positive FAB mass spectrum of oligosaccharide indicated by the broken arrow in Fig. 2.

jected (4.5 μg of total permethylated oligosaccharide alditols). These results are due to the concentrating effect of the packed capillary column and to the absence of splitting.

Figure 4 shows the continuous-flow FAB spectrum of the oligosaccharide indicated by the broken arrow in Fig. 2. The intense peak at m/z 3086 is evidence for a new hexaantennary oligosaccharide alditol consisting of galactose, mannose, *N*-acetylglucosamine, and *N*-acetylglucosaminitol in a molar ratio of 1:3:8:1, respectively.

These first results obtained by using the packed capillary LC-FAB-MS with continuous-flow probe as interface are very promising. Indeed, the good resolution of a packed capillary column allows the analysis of microquantities of very complex mixtures of oligosaccharides (less than 200 ng per peak) with a suitable intensity of the molecular ion.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois and by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, Unité Associée 217: Relations structure fonction des constituants membranaires). The authors are grateful to the Conseil Régional de la Région Nord-Pas de Calais, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Ministère de la Recherche et de la Technolo-

gie, the Ministère de l'Éducation, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Association pour la Recherche contre le Cancer, and the Laboratoire Régional Scientifique de la Police for their contributions in the acquisition of the KRATOS MS-50 RF mass spectrometer apparatus.

REFERENCES

1. Barber, M., Bordoli, R. S., Elliott, G. J., Sedgewick, R. D., and Tyler, A. N. (1982) *Anal. Chem.* **54**, 645A-657A.
2. Barber, M., Bordoli, R. S., Sedgewick, R. D., and Tyler, A. N. (1981) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 325-327.
3. Barber, M., Bordoli, R. S., Sedgewick, R. D., and Tyler, A. N. (1981) *Nature (London)* **293**, 270-275.
4. Forsberg, L. S., Dell, A., Walton, D. H., and Ballou, C. E. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 3555-3563.
5. Dell, A., Morris, H. R., Egge, H. E., von Nicolai, H., and Strecker, G. (1983) *Carbohydr. Res.* **115**, 41-52.
6. Dell, A., Oates, J. E., Morris, H. R., and Egge, H. (1983) *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Phys.* **46**, 415-418.
7. Carr, S. A., Reinhold, V. N., Green, B. N., and Hass, J. R. (1985) *Biomed. Mass Spectrom.* **12**, 288-295.
8. York, W. S., McNeil, M., Darvill, A. G., and Albersheim, P. (1980) *J. Bacteriol.* **142**, 243-248.
9. McNeil, M., Darvill, A. G., Aman, P., Franzen, L. E., and Albersheim, P. (1981) in *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P., Kaplan, N. O., and

- Ginsburg, V., Eds.), Vol. 83, pt D, pp. 3-45. Academic Press, New York.
10. Aman, P., McNeil, M., Franzen, L. E., Darvill, A. G., and Albersheim, P. (1981) *Carbohydr. Res.* **95**, 263-282.
 11. Blakeley, C. R., and Vestal, M. L. (1983) *Anal. Chem.* **55**, 750-754.
 12. Covey, T. R., Crowther, J. B., Dewey, E. A., and Henson, J. D. (1985) *Anal. Chem.* **57**, 474-479.
 13. Hayes, M. J., Lankmayer, E. P., Vouros, D., Karger, B. L., and McGuire, J. M. (1983) *Anal. Chem.* **55**, 1745-1752.
 14. Ito, Y., Takeuchi, T., and Ishii, D. (1985) *J. Chromatogr.* **346**, 161-166.
 15. Caprioli, R. M., Fan, T., and Cottrell, J. S. (1986) *Anal. Chem.* **58**, 2949-2954.
 16. Kuhn, R., Baer, T. H., and Gauhe, A. (1956) *Chem. Ber.* **89**, 2514-2519.
 17. Fredericq, E., and Deutsch, H. F. (1949) *J. Biol. Chem.* **181**, 499-510.
 18. Monsigny, M., Adam-Chosson, A., and Montreuil, J. (1968) *Bull. Soc. Chim. Biol.* **50**, 857-874.
 19. Lee, Y. C., and Scocca, J. R. (1972) *J. Biol. Chem.* **217**, 5753-5758.
 20. Reading, C. L., Penhoet, E., and Ballou, C. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 5600-5612.
 21. Ciucanu, I., and Kerek, F. (1984) *Carbohydr. Res.* **131**, 209-217.
 22. Karlsson, K. A. (1973) *FEBS Lett.* **32**, 317-320.
 23. Karlsson, K. A. (1974) *Biochemistry* **13**, 3643-3647.
 24. Fredman, P., Mansson, J. E., Svennerholm, L., Samuelsson, B., Pascher, I., Pimplott, W., Karlsson, K. A., and Klinghardt, G. W. (1981) *Eur. J. Biochem.* **116**, 553-564.
 25. Falick, A. M., Walls, F. C., and Laine, R. A. (1986) *Anal. Biochem.* **159**, 132-137.
 26. Paz-Parente, J., Strecker, G., Leroy, Y., Montreuil, J., Fournet, B., van Halbeek, H., Dorland, L., and Vliegthart, J. F. G. (1983) *FEBS Lett.* **152**, 145-152.
 27. Egge, H., Peter-Katalinic, J., Paz-Parente, J., Strecker, G., Montreuil, J., and Fournet, B. (1983) *FEBS Lett.* **156**, 357-362.

III) LA CHROMATOGRAPHIE SUPERCRITIQUE

A) matériel et méthodes

1) Echantillons analysés

Nous avons étudié les performances de la chromatographie supercritique des glucides à l'aide de mono et d'oligosaccharides perméthylés par la méthode de Ciucanu et Kerek (128) (voir appendice technique). Nous avons utilisé d'une part du glucose, du tréhalose et du raffinose d'autre part un mélange d'oligosaccharides isolés de l'amidon (Glucidex 19) fourni par les établissements Roquettes, la composition de ce dernier est donnée dans le tableau V p.90. Nous avons avant perméthylation réduit le glucidex 19.

2) l'appareil de chromatographie en fluide supercritique

Nous présentons dans la figure 28 p.91 l'installation permettant de réaliser la chromatographie en phase supercritique. Nous verrons successivement : le solvant d'éluion, la pompe, l'injecteur, le diviseur, les colonnes, le restricteur, le détecteur et enfin, le four.

a) Le solvant

Comme nous l'avons vu dans les généralités, nous utilisons du CO₂ comme éluant. En effet il présente une faible température et pression critique (31°C, 71,4 atm), il n'est ni toxique ni inflammable. La bouteille de CO₂ utilisée est de qualité N45 (99,995%). Elle est munie d'un plongeur qui permet de délivrer, quelque soit le niveau de la bouteille, un CO₂ liquide sans dispositif de refroidissement.

TABLEAU V

Composition du mélange GLUCIDEX 19 ayant servi pour les essais en chromatographie en phase supercritique, et masses des oligomères méthylés.

degré de polymérisation	% d'oligosaccharide	Masse moléculaire
glucitol	1.1	266
maltose	5.2	470
DP3	8.0	674
DP4	6.1	878
DP5	6.5	1082
DP6	8.1	1286
DP7	7.8	1490
DP8	3.6	1694
DP9	3.1	1898
DP10-20	21.5	-
Sup. à 20	29.0	-

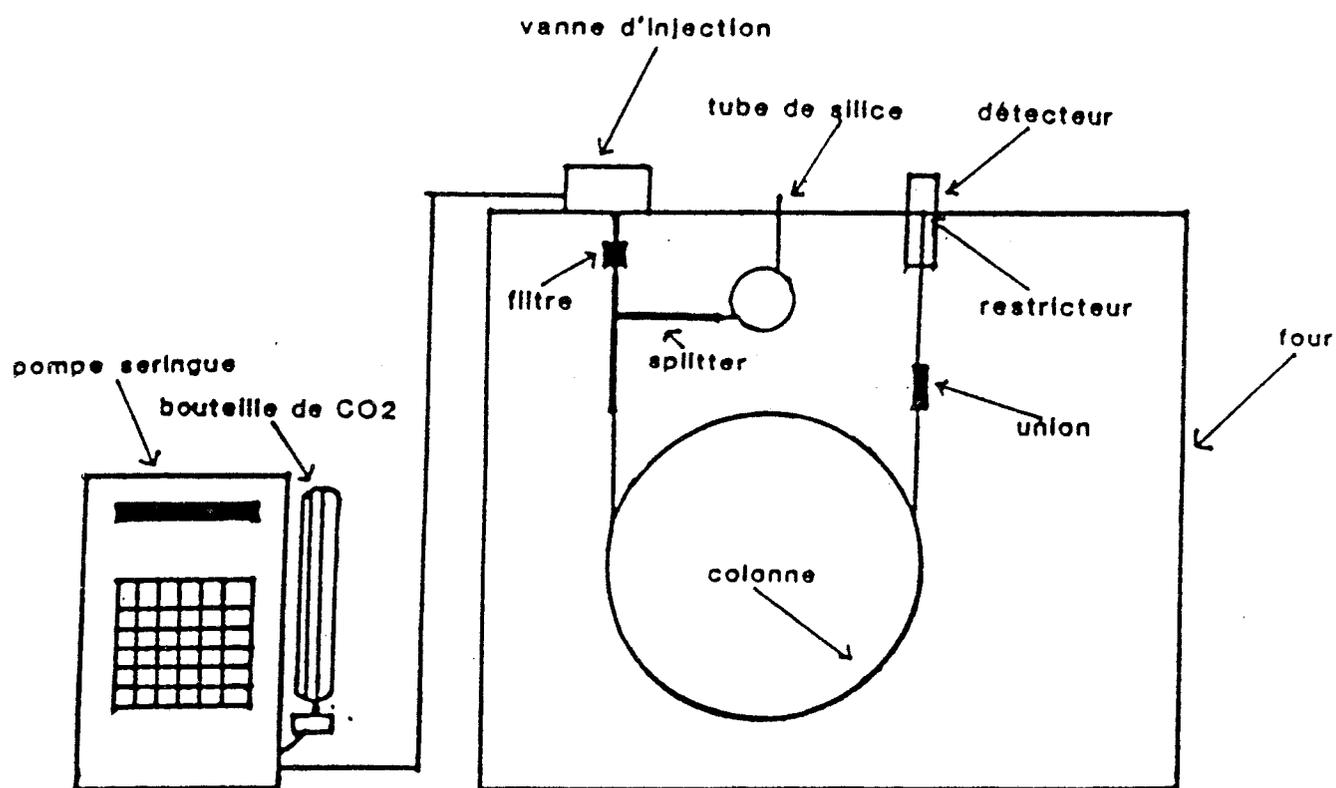


FIGURE 28

Schéma d'un chromatographe en fluide supercritique.

b) La pompe

Une pompe seringue de type "Brownlee microgradient system" (Santa Clara CA, USA) permet de donner des gradients de pression tout en conservant un débit constant de 400 μ l. Les pistons de la pompe sont remplis et comprimés de façon à avoir du CO₂ liquide. L'injection des composés se fait dans le CO₂ liquide, état qui permet de solubiliser le maximum d'échantillon. Le fluide devient supercritique dès l'entrée du four. Nous avons utilisé trois gradients de pression : le premier consiste en des conditions isobariques pendant 5 min suivies par une montée à 350 bars en 30 min, et d'un pallier à cette pression pendant 20 min. Le second gradient consiste en des conditions isobariques pendant 5 min à 90 bars suivies par une montée en 40 min à 350 bars, et d'un maintien à cette pression pendant 5 min. Le troisième consiste en des conditions isobariques pendant 5 min suivies par une montée à 300 bars en 60 minutes et d'un pallier à cette pression pendant 5 min.

c) L'injecteur

Les injections ont été réalisées grâce à une vanne Valco maintenue à température ambiante et munie d'une boucle de 60nl. Les volumes doivent être minimaux pour ne pas modifier la qualité du fluide supercritique et pour ne pas dépasser la capacité de la colonne capillaire. C'est pour cette raison qu'il est aussi nécessaire de diviser la quantité de produit injectée.

d) Le diviseur ou "Splitter"

Le diviseur ou splitter est constitué d'une pièce métallique en T gainée de verre à l'intérieur (Brownlee) où arrivent la colonne et un capillaire en silice désactivée de 25 μ m de diamètre intérieur. Suivant la longueur du capillaire utilisé, on peut faire arriver plus ou moins

d'échantillon dans la colonne.

e) Les colonnes

Du fait de la faible solubilité des sucres natifs dans le CO₂ supercritique, nous avons décidé de travailler sur les sucres méthylés. C'est ainsi que nous avons choisi des colonnes de types capillaires (0.1 mm x 20m ; J W scientific inc, CA, USA) possédant des phases hydrophobes de type DB 225 (cyanopropyl (50%), methyl(50%), phenyl-polysiloxane et DB 5 (methyl(5%), phenyl(95%)dimethylpolysiloxane)

f) le restricteur

Le but du restricteur est de conserver la nature du fluide supercritique jusqu'à l'extrémité de la colonne capillaire, ce qui évite une détente du CO₂ qui provoquerait l'insolubilisation des échantillons. Un restricteur de bonne qualité permet d'avoir un débit en sortie de colonne d'environ 2ml/min à 140 bars. Nous avons utilisé deux types de restricteur : le restricteur intégral fabriqué par soudure du capillaire au chalumeau oxy-acétylénique suivi d'un grattage de la soudure avec un papier couvert d'une poudre de diamant afin de réaliser une ouverture approximative de 1µm. Le deuxième type de restricteur est constitué par une longueur plus ou moins grande de capillaire de diamètre 10µm (5 à 10 cm en moyenne). L'extrémité du restricteur est placée directement dans la flamme du détecteur à ionisation de flamme (FID).

g) détecteur

Nous avons utilisé la FID avec un débit d'hydrogène de 40ml/min et d'air de 300ml/min. La température du détecteur est maintenue à 100°C.

h)Le four

La colonne et le splitter sont localisés dans le four d'un chromatographe en phase gazeuse Girdel Série 3000 maintenu dans des conditions isothermes.

Tous les raccords ont été effectués avec des joints SGE MVSV/004 munis de ferrules Vespel de type FS4 (Interchim).

B) Résultats

Nos premières expériences ont été réalisées sur colonne capillaire de type DB 225 avec un four à 50°C. La figure 29 p. 97 illustre la séparation des perméthyl glucose, trehalose, raffinose injectés dans le méthanol à raison de 4µg par échantillons. Ces sucres sont très légers en masse (< à 700) et ne présentent pas de problèmes de solubilité dans le CO₂ (le perméthyl glucose qui est volatile aux températures de travail sert de témoin interne). Nous avons calculé pour le tréhalose un nombre de plateaux théoriques $N = 43266$ et une capacité égale à 0.36. Pour le raffinose, nous avons obtenu $N = 35759$ plateaux et une capacité de 0.6 ce qui fait que la sélectivité entre ces deux composés est de 1.66 (ces valeurs ne sont données qu'à titre indicatif, un calcul rigoureux aurait du être fait dans des conditions isobariques). Ces résultats préliminaires sont très encourageants. Ils nous ont conduits tout naturellement à étudier le comportement chromatographique d'oligosaccharides plus lourds. En effet notre objectif est l'analyse d'oligomères de masses moléculaires élevées qui ne peuvent pas être chromatographiés en GLC et qui posent problèmes en HPLC. Nous avons dans un premier temps analysé des oligomères du glucose (voir tableau V p.90). La figure 30 p.97 représente les diagrammes obtenus. Nous constatons pour les deux conditions opératoires une très bonne séparation des oligomères avec cependant un élargissement des pics pour les hautes masses moléculaires. De plus il apparait des "dents de scie" dans les pics (spikes). Nous notons également une dérive de la ligne de base assez importante.

C) discussion

Nous n'avons obtenu pour l'instant que des résultats partiels mais encourageants. Un certain nombre d'améliorations doivent cependant être

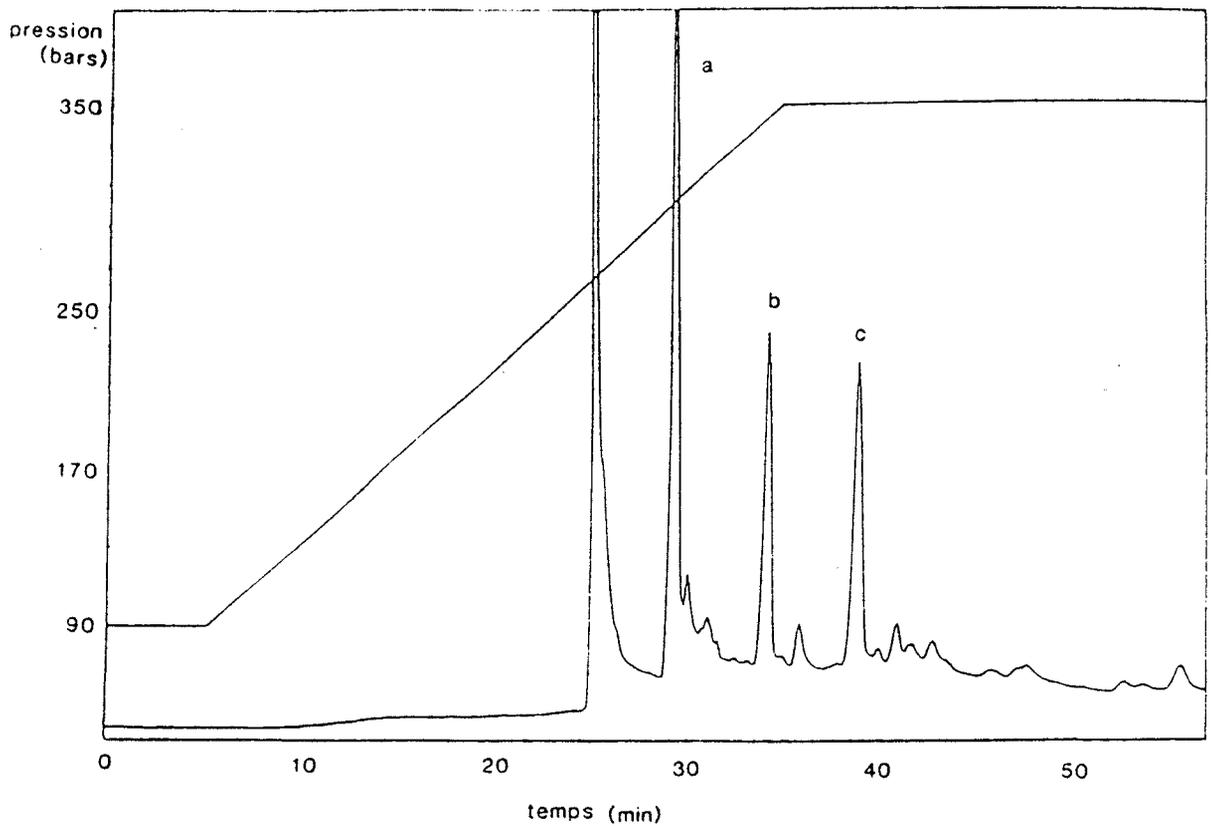


FIGURE 29

Chromatographie en fluide supercritique. Colonne DB 225 de 0.1mm x 20m; température du four 50°C, du détecteur 100°C; Splittage au 1/4; Utilisation d'un restricteur intégral; injection de 4µg par échantillon.
a) perméthyl-glucose
b) perméthyl-tréhalose
c) perméthyl-raffinose

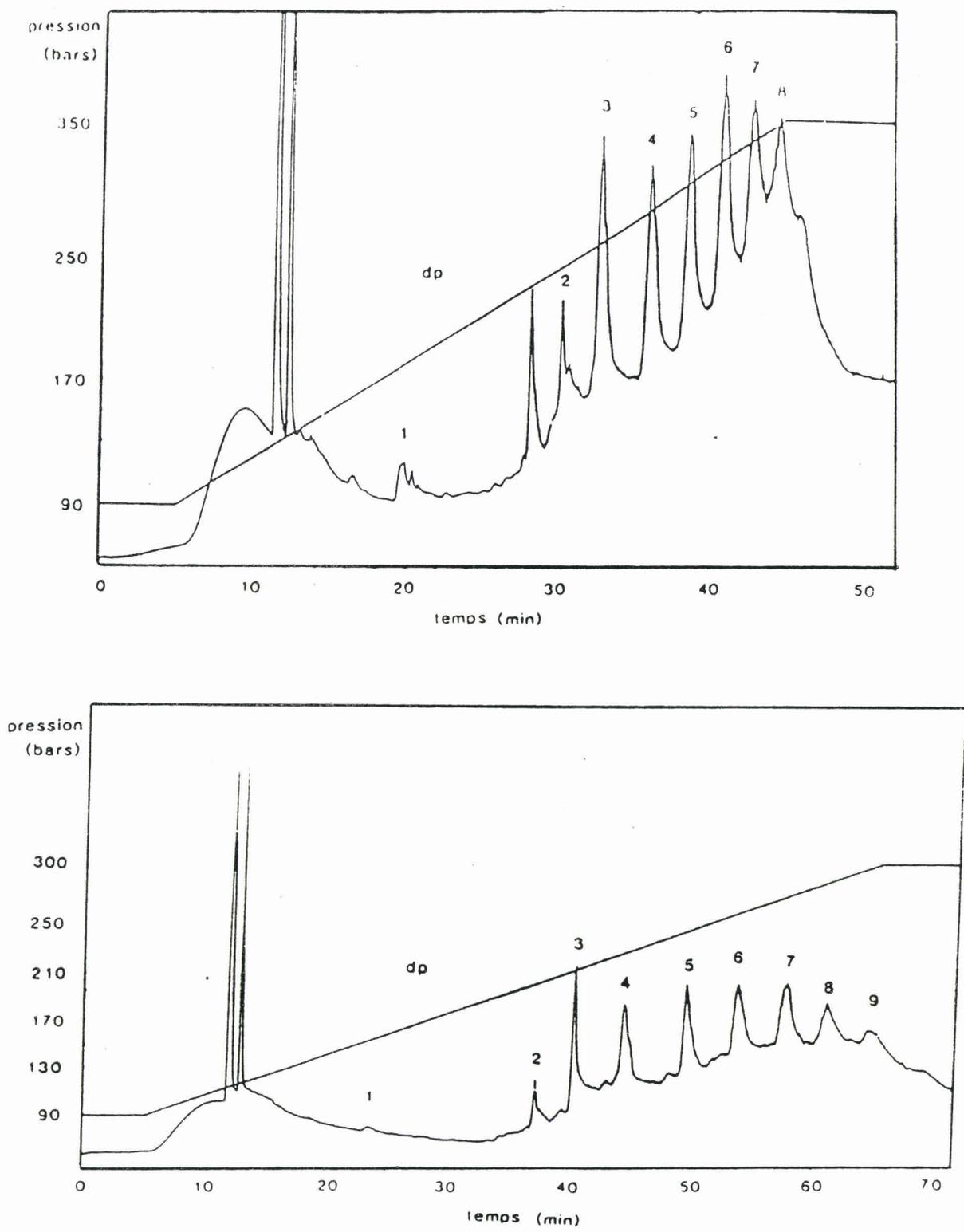


FIGURE 30

Chromatographie en fluide supercritique d'oligomères de glucose perméthylés (GLUCIDEX 19) sur colonne DB5 (0.1mm x 20m) à la température du four de 100°C, du détecteur de 100°C, splittage au 1/4 et restricteur intégral.

a) Conditions isobariques de 5' à 90 bars, gradient de pression de 90 bars à 350 bars en 40', conditions isobariques à 350 bars pendant 10'.

b) Conditions isobariques de 5' à 90 bars, gradient de pression de 90 bars à 300 bars en 60', conditions isobariques à 300 bars pendant 5'.

apportées notamment au niveau de la diminution de la largeur des pics et de la formation des "spikes".

Nous pouvons facilement expliquer la largeur des pics par les quantités injectées (4µg par échantillons) trop importantes en regard de la capacité de la colonne capillaire utilisée. Ces conditions nous ont été imposées par le manque de sensibilité de la détection. Il nous faut donc pour diminuer la largeur des pics augmenter la sensibilité de l'appareil. Pour cela nous pouvons intervenir sur plusieurs points : le détecteur, le restricteur, et les conditions d'analyse.

1) le détecteur

La détection par ionisation de flamme (FID) présente l'inconvénient d'être sensible à la montée en pression du CO₂ ce qui nous oblige à travailler à une sensibilité nettement inférieure à celle utilisée avec le même détecteur en chromatographie en phase gazeuse. Nous ne pouvons malheureusement pas intervenir sur ce phénomène. Par contre nous avons pu améliorer la qualité de la détection en jouant sur la température du détecteur. En effet nous avons utilisé au départ une température de 350°C, température généralement employée dans la littérature. En travaillant à une température nettement plus basse (100°C), nous avons obtenu une meilleure sensibilité. A cette température l'échantillon reste soluble plus longtemps dans la colonne capillaire, il en résulte qu'il arrive à la flamme plus d'échantillon.

2) Le restricteur

Nous avons utilisé deux types de restricteur: Le restricteur constitué d'un capillaire de 10µm de diamètre et long de 5 à 10 cm et le restricteur intégral. Le premier est facile à manipuler et permet d'obtenir le débit désiré en sortie de colonne. Cependant nous n'avons

jamais obtenu des diagrammes corrects pour des oligosaccharides supérieurs aux tétrasaccharides. Nous pensons, comme Lee et al. (22), que ce résultat est dû à la détente du CO₂. Si celle ci s'effectue sur toute la longueur du restricteur, les échantillons de haute masse moléculaire redeviennent insolubles et se "collent" sur la face interne du restricteur. Le restricteur intégral est plus difficile à fabriquer, il nous a fourni cependant de meilleurs résultats. Néanmoins, les phénomènes de condensation des particules de haute masse moléculaire ont toujours lieu mais s'effectuent en sortie du restricteur. Ce phénomène se manifeste par la production de particules difficiles à brûler par la flamme. C'est ce qui provoque les spikes. On peut réduire ce phénomène en plaçant l'extrémité du restricteur à proximité immédiate de la flamme (il faut éviter que la silice ne rougisse). Cette position pose cependant des problèmes techniques. En effet à des pressions de 300 bars l'éluant arrive au détecteur à un débit très élevé qui perturbe la flamme. Pour pallier à cet inconvénient, nous augmentons le débit d'hydrogène ce qui malheureusement provoque une augmentation de la température et de la taille de la flamme. On perd donc de la sensibilité. D'autre part la construction du restricteur intégral étant "artisanale" il arrive souvent que le flux de CO₂ ne soit pas rectiligne ce qui perturbe également la flamme. Nous pensons pouvoir résoudre ce problème en utilisant un détecteur spécialement transformé pour la chromatographie supercritique. Ce détecteur possède une électrode circulaire qui entoure la flamme et peut supporter des débits de gaz importants (voir Fig.31 p.100).

3) Les conditions d'analyse

La température et la pression ont une importance capitale. Nous avons déterminé que la température optimum de travail se situe entre 80 et

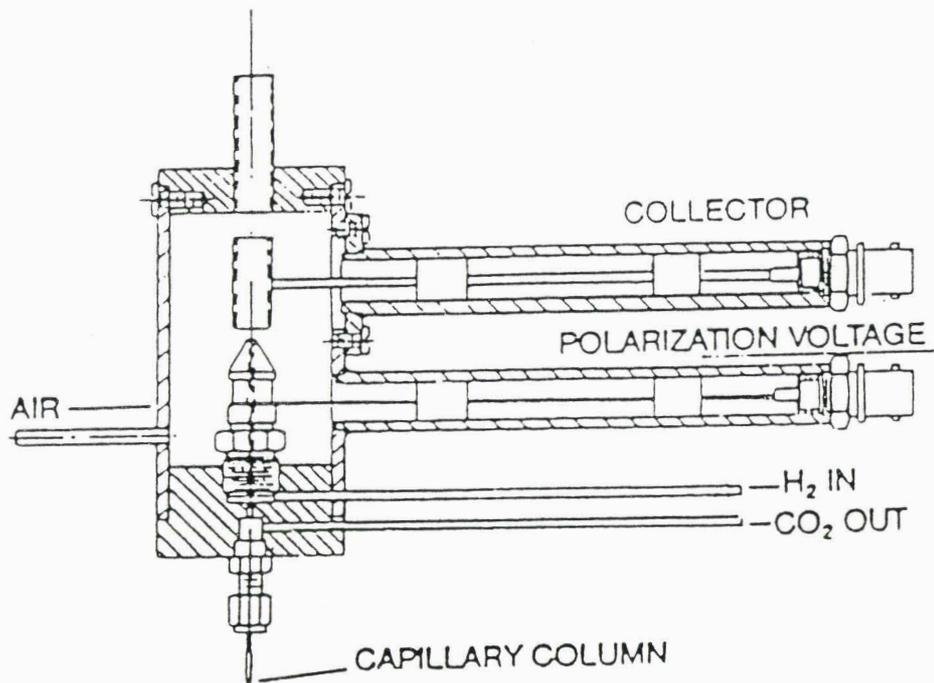


FIGURE 31

Schéma d'un détecteur à ionisation de flamme spécifique à la chromatographie en phase supercritique.

100°C, température qui permet d'obtenir la meilleure séparation. D'autre part nous nous sommes aperçus qu'il valait mieux commencer le gradient à une pression assez élevée. En effet à 90 bars la masse volumique du CO₂ étant faible, la solubilité des échantillons de haute masse est difficile à réaliser. Nous avons déterminé que la pression minimale d'injection pour les oligosaccharides étudiés se situe aux alentours de 150 bars. Enfin, Il est possible en changeant les dimensions de la colonne d'avoir des pics moins larges et mieux résolus. En effet, le fait de diminuer le diamètre va augmenter le nombre de plateaux théoriques au mètre (voir annexe), le fait de diminuer la longueur va réduire le temps d'analyse (temps très long en chromatographie supercritique) et donc éviter les phénomènes de rediffusion. Pour les colonnes supercritiques les dimensions idéales seront donc de 50µm de diamètre pour 10m de long.

D) Conclusion

Il faudra donc utiliser dans l'avenir un détecteur plus sensible, ce qui permettra de ne pas dépasser la capacité des colonnes et donc d'augmenter la qualité de la séparation. Ceci pourra être réalisé par le couplage avec le spectromètre de masse directement à la sortie de la colonne capillaire. L'analyse pourra être réalisée par ionisation chimique, ou peut être même en FAB avec la sonde à débit continu (le problème étant celui de la matrice).

Les premiers résultats que nous avons obtenus sont très encourageants et devraient déboucher sur l'analyse d'oligosaccharides isolés de glycoprotéines en chromatographie supercritique couplée à la masse. Cependant les analyses nécessitent encore de dériver les molécules glucidiques (méthylation, triméthylsilylation). Une prochaine étape consistera à modifier la nature du fluide supercritique pour le rendre

plus polaire (mélange CO₂/Méthanol) permettant l'utilisation de colonne capillaire de phase normale (Carbowax) pour l'analyse de sucres natifs.

CONCLUSION

Les conclusions générales que nous pouvons dégager de ces travaux sont les suivantes.

-L'utilisation en spectrométrie de masse d'une nouvelle canne d'introduction spécifique des analyses en mode d'ionisation FAB permet par rapport aux sondes conventionnelles, l'analyse de microquantités de glycanes par l'augmentation du rapport signal sur bruit. Ce résultat est dû aux faibles quantités de matrice utilisées. D'autre part ce système permet l'analyse des échantillons sans déplacement de la canne. Aucun effet mémoire n'a été constaté d'une injection à l'autre.

-La transformation de la canne à débit continu, interface adaptée au mode d'ionisation FAB nous a permis d'effectuer le couplage entre micro-colonne LC et spectrométrie de masse. Cette technique est la première qui permet de détecter les molécules en sortie de colonne d'HPLC par mode d'ionisation FAB sans déformation des pics.

-L'emploi de la colonne capillaire remplie en HPLC, par les faibles débits de solvant qu'elle réclame, autorise le couplage de celle-ci avec le spectromètre de masse. Ses excellentes caractéristiques conduisent à une parfaite séparation des oligosaccharides méthylés. La grande sensibilité du spectromètre de masse et l'élution ponctuelle de la colonne capillaire rend possible le travail sur des quantités très faibles de produit de départ.

-L'utilisation du spectromètre de masse comme détecteur fournit des informations intéressantes sur la nature des composés élués. Appliquée à l'étude des glycanes neutres de l'ovomucoïde du blanc d'oeuf de poule, l'analyse des glycanes perméthylés en LC-FAB-MS nous a permis de retrouver les structures glycaniques déjà décrites au laboratoire et de supposer la présence de nouvelles molécules, en particulier d'une structure de type hexaantennée.

-Les recherches sur les caractéristiques des fluides supercritiques ont abouti à l'introduction au laboratoire d'une nouvelle technique de chromatographie qui a pour objectif la séparation des composés glucidiques de masse moléculaire moyenne (oligosaccharides) et le couplage au spectromètre de masse. Les travaux préliminaires que nous avons présenté dans ce mémoire semblent indiquer que la chromatographie d'oligosaccharides est réalisable. Les résultats de séparation de polymères de glucose sont à ce titre encourageants. Le travail doit se poursuivre au niveau de la détection en sortie de colonne par l'utilisation de nouveaux détecteurs à ionisation de flamme ou à diffusion de la lumière. Le couplage avec le spectromètre de masse reste toutefois l'objectif majeur que nous nous sommes fixés.

APPENDICE TECHNIQUE

PREPARATION DES ECHANTILLONS

A)Methylation par la méthode de Ciucanu et Kerek (128)

200 µg d'oligosaccharides lyophilisés sont dissous dans 100 µl de DMSO distillé. 1mg de soude finement broyée est ajouté sous argon ainsi que 200 µl d'iodure de méthyle (Merck, Darmstadt , R.F.A.). Le mélange est ensuite mis à soniquer au bain ultrasonique pendant 45 min. La methylation est ensuite arrêtée par 2ml d'eau saturée en thiosulfate de sodium (R.P. Normapur , Prolabo). Après 4 extractions par 2ml de chloroforme (Merck), les phases chloroformiques sont rassemblées et lavées par 4 fois 2 ml d'eau puis concentrées sous courant d'azote. Les oligosaccharides ainsi préparés sont déposés sur colonne de iatrobeads (5 x 50 mm, Toyo Soda Kompany, Japon) stabilisée en chloroforme. Les impuretés sont éliminées par 2ml de chloroforme et de chloroforme : methanol 95:5 (v/v). Les oligosaccharides perméthylés sont élués par 2ml de chloroforme : méthanol 90:10 (v/v) et de chloroforme : methanol : eau 75:25:4 (v/v/v).

B)préparation des oligosaccharides de l'ovomucoïde

1)préparation de l'ovomucoïde

L'ovomucoïde à été préparé suivant la technique de Frédéricq Deutch (135), résumée sur la Fig.32 p.106

2)préparation des glycopeptides

Nous avons utilisé la technique de l'hydrolyse pronasique de Monsigny (136). A 10 gr d'ovomucoïde dans 1 litre d'acetate de calcium 0.01M on ajoute 200 mg de pronase (CALBIOCHEM). L'hydrolyse est effectuée à pH 8, à 40°C sous agitation, pendant 48 h en présence de toluène. Le pH est

Homogénéiser 1.500 ml de blanc d'oeuf (50 oeufs) pendant 1 minute à l'aide d'un mixer. Ajouter un volume d'une solution aqueuse de trichloroacétate de sodium à 10 g p. 100 ml ajustée à pH 3 avec une solution d'acide trichloroacétique 0,3 N. Ajuster le pH à 3,5 avec NaOH 0,5 N. Laisser reposer une nuit à 4°C. Filtrer sur Büchner.

PRECIPITE ELIMINE

(Protéides dénaturés par l'acide trichloroacétique)

FILTRAT

à la température de 4°C, ajuster le pH du filtrat à 6 avec NaOH 0,5 N à 4°C. Laisser reposer 20 min. à - 8°C. Ajouter 2 volumes d'éthanol 96 % à - 20°C. Laisser reposer 4 h à - 8°C. Centrifuger à - 8°C pendant 30 min. à 1.800 t/mn.

PRECIPITE

Reprendre le précipité par un volume minimum d'eau distillée. Dialyser pendant 3 jours contre eau distillée. Filtrer. Lyophiliser.

SURNAGEANT ELIMINE

Rendement : 12 g d'ovomucoïde/1.500 ml de blanc d'oeuf

FIGURE 32

Schéma de préparation de l'ovomucoïde du blanc d'oeuf de poule suivant la technique de Frédéricq et Deutsch. (135)

maintenu constant par l'addition de soude 0.1 N contrôlé par un titrateur automatique (pH stat TTT1C Radiometer) et la consommation de soude est régulièrement déterminée. L'hydrolysate est ensuite ajusté à pH 4.5 avec de l'acide acétique glacial, puis concentré à environ 20 ml et traité par 10 volumes d'éthanol absolu. Le mélange est maintenu à 2°C pendant 18 heures. Le précipité formé est recueilli par centrifugation, dissous dans 500 ml d'acétate de calcium et soumis à une nouvelle hydrolyse pronasique dans les conditions décrites ci-dessus. Ce protocole est encore répété deux fois. La fraction glycopeptidique obtenue est dissoute dans 50 ml d'eau et additionnée d'un volume égal d'une solution aqueuse d'acide trifluoroacétique à 10 gr pour 100 ml. Le précipité formé est éliminé par centrifugation après un repos de 18 h à 4°C. La solution surnageante est purifiée par passage successif sur des colonnes (2 x 35 cm) d'échangeurs de cations (DOWEX 50 x 8 "mesh" 25-50 forme acide) puis d'anions (Dowex 1 x 8 "mesh" 25-50 forme formiate). Le liquide effluent ainsi que les eaux de lavages sont concentrées à l'évaporateur rotatif à 20 ml. Les glycopeptides obtenus sont isolés par l'addition de 10 volumes d'éthanol absolu. ce précipité est ensuite débarrassé des derniers peptides résiduels par dessalage sur sephadex G25 (50 x 1.6 cm Pharmacia).

3) préparation des glycopeptides B

Comme seule la fraction neutre des glycopeptides nous intéresse, nous avons soumis le mélange total à un échange d'ion sur colonne de Dowex 50 x 8 "mesh" 200 400 forme acide). Le passage d'un litre d'eau fournit une première fraction (fraction α). Le déplacement des glycopeptides de la colonne est ensuite réalisé à pH 3 à l'aide d'un gradient de concentration en formiate de pyridine (système à deux réservoirs cylindriques contenant le premier : 8ml de pyridine, 12.5 ml d'acide

formique et 479.5 ml d'eau. Le second : 160 ml de pyridine, 250 ml d'acide formique et 90 ml d'eau. On obtient ainsi la fraction β puis la fraction Y. On se débarrasse ensuite du formiate de pyridine par simple évaporation sous vide à l'évaporateur rotatif, suivie d'une lyophilisation poussée.

4) Isolation des oligosaccharides

Nous avons utilisé la technique d'hydrolyse sodique (137). 1 gr de glycopeptides obtenus à partir d'ovomucoïde sont dissous dans une solution (5ml) 1 M en soude 1 M en borohydrure de sodium. Le mélange est chauffé à reflux pendant 6 heures. Après refroidissement à 0°C, le mélange est neutralisé à l'acide acétique glacial et déposé pour dessalage sur une colonne de Sephadex G15 (1000 X 2cm, Pharmacia) éluée avec de l'acide acétique 0.5%. Les fractions orcinolées positives sont ensuite poolées, concentrées à sec à l'évaporateur rotatif et codistillées au méthanol pour éliminer les complexes boratés qui pourraient encore subsister. Les oligosaccharides sont ensuite repris par une solution saturée en bicarbonate (5 ml) et réacetylés par des additions de 500 μ l d'anhydride acétique pur toutes les 20 min et ce pendant 2 heures à température ambiante. (méthode de Roseman (138)). Après hydrolyse du bicarbonate à l'acide acétique 10% le mélange est déposé sur colonne séphadex G15 (1000 X 2 cm pharmacia) en eau. Après récupération les oligosaccharides ainsi préparés sont lyophilisés

5) Séparation des oligosaccharides alditols par HPLC

Les oligosaccharides alditols analysés sont purifiés à partir des oligosaccharides de l'ovomucoïde par HPLC de partage sur alkylamine suivant la technique de Paz Parente et al. (131). La séparation est effectuée sur un chromatographe Spectra Physics modèle 700 équipé d'un UV à longueur d'onde variable LDC spectro monitor D connecté à un

intégrateur Spectra 4290. L'HPLC est effectuée sur une colonne d'alkylamine (25 X 0.9 mm, Dupont de Nemours France) 5mg d'oligosaccharides dissous dans 100µl d'eau sont injectés dans la colonne. La colonne est équilibrée dans un mélange d'acétonitrile eau (65:35). Après l'injection on applique un gradient linéaire pendant 40 min jusqu'à un mélange acétonitrile eau (60:40), puis on garde des conditions isocratiques pendant 20 min on nettoie ensuite la colonne en appliquant un gradient linéaire pendant 30 min jusqu'à obtenir un mélange d'acétonitrile eau (50:50). Le débit est de 3 ml par min. Les oligosaccharides sont détectés à 200 nm.



ANNEXE

PRINCIPALES GRANDEURS CHROMATOGRAPHIQUES

Pour analyser un chromatogramme tel que celui représenté sur la figure 33 p.111, on utilise diverses grandeurs physiques.

A)N : nombre de plateaux théoriques ou efficacité

$$N = 16 (tr/\omega)^2 \text{ ou } N = 5.54 (tr/\omega_s)^2$$

Cette grandeur fait intervenir à la fois le temps de rétention du pic et sa largeur. L'efficacité est maximale (N maximum) quand ω est très petit ou quand tr est très grand.

B)k' : facteur de capacité

k' représente le rapport de masse d'échantillon entre la phase stationnaire de la colonne et la phase mobile. On le calcule facilement car il est égal à tr'/tm . Il ne faut pas confondre le facteur de capacité k' avec la capacité d'une colonne qui est la quantité que l'on peut injecter dans celle-ci sans la saturer.

C) α' : sélectivité

α' représente pour deux échantillons le rapport de leur facteur de capacité

$$\alpha' = k'_1/k'_2 \text{ ou } \alpha' = tr'_1/tr'_2$$

Elle donne une bonne idée de la séparation de deux produits par la colonne

D)R : résolution

$$R = 2(tr_2 - tr_1/\omega_2 - \omega_1)$$

c'est une grandeur importante car elle permet de définir la qualité de la séparation entre deux échantillons, puisqu'elle fait intervenir à la fois la largeur des pics et leur séparation

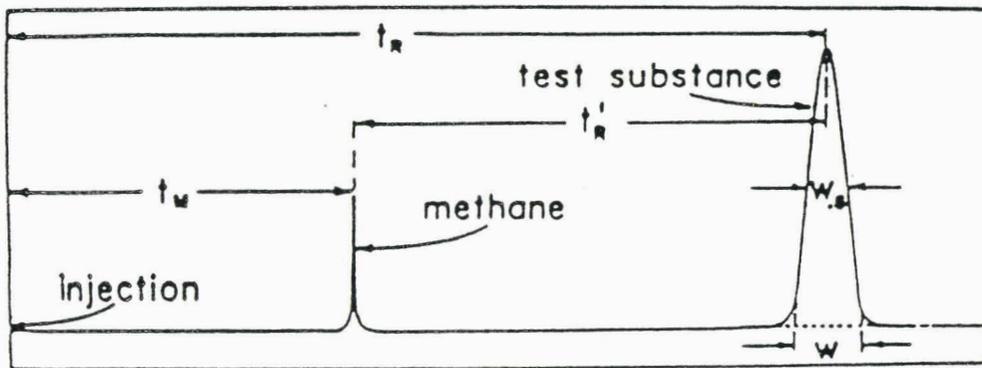


FIGURE 33

Représentation schématique d'un diagramme permettant de définir les grandeurs :

t_m , représentant le temps passé entre l'injection et la sortie du pic solvant.

t_r , représentant le temps passé entre l'injection et la sortie du pic de l'échantillon.

t'_r , représentant le temps passé entre le pic solvant et la sortie du pic d'échantillon.

w , représentant la largeur du pic d'échantillon à la base.

w_s , représentant la largeur du pic d'échantillon à mi-hauteur.

E)H : hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT)

N étant dépendant de la longueur de la colonne, on préfère parfois utiliser $H = L/N$ où L représente la longueur de la colonne et N le nombre de plateau théorique. Dans la courbe de Van Deemter (voir généralités) H passe par un minimum pour une valeur du débit de gaz vecteur. Ce minimum peut être facilement calculé pour une colonne capillaire par la relation:

$$H_{min} = r \sqrt{\frac{1 + 6k' + 11k'^2}{3(1+k')^2}}$$

r étant le rayon de la colonne et k' le facteur de capacité.

Nous pouvons constater que la valeur de H et donc celle de N dépend du diamètre de la colonne. Plus le diamètre d'une colonne est faible plus le nombre de plateaux théoriques au mètre est important.

BIBLIOGRAPHIE

	<u>pages</u>
1) GROß R.L. (editeur) Dans "Modern practice of gas chromatography" 2nd edition a Wiley interscience publication. John Wiley & sons New york 1985.	3
2) JENNING W. Dans " gas chromatography with capillary column " Academic press New York 1978	3
3) TRANCHANT J. Dans " Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse" 3eme edition (1982) Masson. Paris.	3
4) DE GRAEVE J., BERTHOU F. et PROST M. dans " Methodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse" (1986) Masson Paris.	3, 5, 25, 26
5) VAN DEEMTER J.J., ZUYDERWEG F.J. and KINKENBERG A. Chem. Eng. Sci., 5 (1956) 271.	4
6) WIEDEMER R.T., Mc KINLEYS.L. and RENDL T.W. Int. Lab., May (1986) 69-77	6, 7
7) Mc CREADIE S.W.S. and SWAN D.F.K. Spectra, 13 (1985) n°106 33-43.	8
8) MULLER F. and GOEKELER U.K. Am. Lab., May (1985)	8, 9
9) KUCERA P. (editeur) Dans "Microcolumn High-Performance Liquid Chromatography" Elsevier, Amsterdam, New York, 1984.	11
10) ROSSET R., CAUDE M. et JARDY A. Dans " Manuel pratique de chromatographie en phase liquide" 2eme edition 1982 Masson.	11
11) LEE M.L. et WRIGHT B.N. J. Chrom. Sci., 18 (1980) 345-358.	12
12) GOLAY M. Dans "Gas chromatography " 1958 (Amsterdam symposium) D.H. Desty ed., Butterworths London 1958 pp.36-53	12
13) BALLY R.W. and CRAMERS C.A. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 9 (1986) 626-632.	15
14) BERRY A.J., GAMES D.E. and PERKINS J.R. J. Chromatogr., 363 (1986) 147-158.	15
15) BLIBLIE A.L. and GREIBROKK T. Anal. Chem., 57 (1985) 2239-2242.	15
16) CAUDE M. and ROSSET R. Analisis, 14 (1986) 310-311	15

	<u>pages</u>
17) FJELDSTED J.C. and LEE M.L. Anal. Chem., 56 (1984) 619A-628A.	15
18) GAMES D.E., BERRY A.J., MYLCHREEST I.C., PERKINS J.R. and PLEASANCE Eur. Chromatogr. News, 1 (1987) 10-14.	15
19) GERE D.R. Science, 222 (1983) 253-259.	15
20) HENSLEY J.L. and Mc NAIR H.M. J. Liquid Chromatogr., 9 (1986) 1985-1996.	15
21) KLESPER E. and LEYENDECKER D. Int. Lab., November (1986) 18-30.	15
22) LEE M.L. and MARKIDES K.E. J. High Resolu. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 9 (1986) 652-656.	15, 99
23) LEE M.L. and MARKIDES K.E. Science, 235 (1987) 1342-1347.	15
24) MOURIER P., SASSIAT P., CAUDE M. and ROSSET R. J. Chromatogr., 353 (1986) 61-75.	15
25) NOVOTNY M., SPRINGSTON S.R., PEADEN P.A., FJELDSTED J.C. and LEE M.L. Anal. Chem., 53 (1981) 407A-414A.	15
26) MOURIER P., SASSIAT P., CAUDE M. and ROSSET R. Analisis, 12 (1984) 229-248.	15
27) RAWDON M.G. and NORRIS M.A. Int. Lab., June (1984) 12-23.	15
28) ROSSET R., MOURIER P. and CAUDE M. L'Actualité Chimique, Septembre (1986) 17-34.	15, 16 17, 19
29) SIMPSON R.C., GANT J.R. and BROWN P.R. J. Chromatogr., 371 (1986) 109-119.	15
30) SMITH R.D., FELIX R.D., FJELDSTED J.C. and LEE M.L. Anal. Chem., 54 (1982) 1883-1885.	15
31) KLESPER E., CORWIN A.H. and TURNER D.A. J. Org. Chem., 27 (1962) 700-701.	18
32) GERE D.R., BOARD R., and Mc MANIGILL D. "Pittsburg Conférences on Analytical chemistry and applied spectroscopy" Atlantic city N.J. 1982.	22
33) CHESTER T.L. INNIS D.P. and OWENS G.D. Anal. Chem., 57 (1985) 2243-2247.	22

	<u>pages</u>
34) CHESTER T.L. and INNIS D.P. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 9 (1986) 209-212.	22, 24
35) PEADEN P.A. and LEE M.L. J. Liquid Chromatogr., 5 (1982) 179-221.	23
36) RYHAGE R. Anal. Chem., 36 (1964) 759	25
37) MILLINGTON D.S. YORKE D.A. BURNS P. Adv. Mass Spectrom., 8B (1983) 1819-1825	28
38) HAYES M.J., LANKMAYERE E.P., VOUROS D., KARGER B.L. and MC GUIRE J.M. Anal. Chem., 55 (1983) 1745-1752	29
39) BLAKLEY C.R. and VESTAL M.L. Anal. Chem., 55 (1984) 750 .	32
40) COVEY T.R., CROWTHET J.B., DEWEY E.A. and HENSON J.D. Anal. Chem., 57 (1985) 474-479	32
41) VESTEC Sté. Thermospray LC/MS interface instruction, maintenance manual	30, 31 33
42) HSU F.F., EDMONDS C.G. and Mc CLOSKEY J.A. Anal. Lett., 19 (1986) 1259-1271.	33
43) TSUDA T., KELLER G. and STAM H.J. Anal. Chem., 57 (1985) 2280-2282.	33
44) MATSUMOTO K., LIEU H.C. and TSUGE S. Fresenius Z. Anal. Chem., 323 (1986) 212-216.	33
45) ITO J., TAKEUCHI T. and ISHII D. J. Chromatogr., 346 (1985) 161-166.	33, 80
46) CAPRIOLI R.M., FAN T. and COTTRELL J.S. Anal. Chem., 58 (1986) 2949-2954	33, 66 68
47) RADFORD T. DE JONGH D. Dans "Biochemical applications of Mass spectrometry " Waller G.R. Ed Wiley intersciences New York 1972	35
48) RADFORD T. DE JONGH D. Dans "Biochemical applications of Mass spectrometry " First supplementary Vol. Waller G.R. Dermer O.C. Eds Wiley intersciences New York 1980	35
49) CHAPMAN J.R. Dans "Practical organic mass spectrometry" a Wiley interscience publication John Wiley & sons New york	35

	<u>pages</u>
50) LONGUEVIALLE P. Dans "Principes de la spectrométrie de masse des substances organiques" Masson Paris 1981	35, 41 52, 55 58
51) TABEL J.C. and FETIZON M. Dans "Modern Physical methods in Biochemistry " Part A Chapitre 3 Neuberger / Van Deenen (eds) Elsevier Science 1985	35
52) REINHOLD V.N. and CARR S.A. Mass Spectrom. Rev., 2 (1983) 153-221	35
53) FOURNET B., DHALLUIN J.M., MONTREUIL J., BOSSO C. and J. DEFAYE J. Anal. Biochem., 108 (1980) 35-56.	36
54) FOURNET B., STRECKER G., LEROY Y., and MONTREUIL J. Anal. Biochem., 116 (1981) 489-502.	36
55) STRECKER G., PIERCE CRETEL A., FOURNET B., SPIK G., and MONTREUIL J. Anal. Biochem., 111 (1981) 17-26.	36
56) REED R.I. and REID W.K. J. Chem. Soc., (1963) 5933.	36
57) ZOLOTAREV B.M., OTT., A. Ya . and CHISHOV O.S. Advan. Mass Spectrom., 7B (1978) 1371-1375.	37
58) DELL A., WILLIAMS D.H., MORRIS H.R., SMITH G.A., FEENEY J. and ROBERTS G.C.K. J. Am. Chem. Soc., 97 (1975) 2497-2502.	38
59) OHASHI M., YAMADA S., KUDO H., and NAKAYAMA N. Biomed. Mass Spectrom., 5 (1978) 578-581.	38
60) ANGSTOM J., FALK K., KARLSSON K.A. and LARSON G. Biochim. Biophys. Acta, 710 (1982) 428-436	38
61) BREIMER M.E., HANSSON G.C., KARLSSON K.A. and LEFFLER H. J. Biochem., (Tokyo) 90 (1981) 589-609	38
62) EGGE H. and HANFLAND P. Arch. Biochem. Biophys., 210 (1981) 396-404.	38, 47
63) FALK K.E., KARLSSON K.A. and SAMUELSON B. FEBS Lett., 124 (1981) 173-177	38
64) HANFLAND P. and EGGE H. Chem. Phys. Lipids, 16 (1970) 201-214.	38
65) SMITH E.L., Mc KIBBIN J.M., KARLSSON K.A., PASCHER I., SAMUELSSON B.E. and LI S.C. J. Biol. Chem., 250 (1975) 6059- 6064	38

	<u>pages</u>
66) SMITH E.L., Mc KIBBIN J.M., KARLSSON K.A., PASCHER I. and SAMUELSSON B.E. Biochem. Biophys. Acta, 388 (1979) 171-179	38
67) SMITH E.L., Mc KIBBIN J.M., KARLSSON K.A., PASCHER I., SAMUELSSON B.E. and LI S.C. Biochem., 14 (1975) 3370-3376	38
68) EGGE H., MICHALSKI J.C. and STRECKER G. Arch. Biochem. Biophys., 213 (1982) 318-326.	38, 54
69) EGGE H., PETER KATALINIC J., PAZ PARENTE J., STRECKER G., MONTREUIL J. and FOURNET B. FEBS Lett., 156 (1983) 357-362.	38, 54 72, 78
70) TAYLOR G.W., MORRIS H.R., PETERSON T.E. and MAGNUSSON S. Adv. Mass Spectrom., 8 (1979) 1090-1096	38
71) KARLSSON K.A., PASCHER I., SAMUELSSON B.E., FINNE J., KRUSIUS T. and RAUVALA H. FEBS Lett., 94 (1978) 413-418	38
72) BREIMER M.E., HANSSON G.C., LEFFLER H., PIMLOTT W. and SAMUELSSON B.E. FEBS Lett., 124 (1981) 299-303	38
73) BREIMER M.E., HANSSON G.C., KARLSSON K.A. and LEFFLER H. Dans "cell surface Glycolipids" Sweeley C.C. ed Am. Chem. Symp. Ser 128 Am. Chem. Soc. Washington DC (1980) pp.79-104	38
74) ANGSTOM J., BREIMER M.E., FALK K.E., HANSSON G.C., KARLSSON K.A., LEFFLER H. and PASCHER I. Arch. Biochem. Biophys., 213 (1982) 708-725.	38
75) FIELD F.H. Acc. Chem. Res., 1 (1968) 42	38
76) MUNSON M.S.B. Anal. Chem., 49 (1977) 772A	38
77) ARPINO P. Actualité Chimique, Avril (1982) 19-28	40
78) BALDWIN M.A. and Mc LAFFERTY T.W Org. Mass Spectrom., 7 (1973) 1141-1353	42
79) HUNT D.F., SHABANOWITCH J., BOTZ F.K. and BRENT D.A. Anal. Chem., 49 (1977) 1160	42
80) MARKEY S.P. and WENGERENGER D.A. Chem. Phys. Lipids, 12 (1974) 182-200	44
81) MURATA T., ARIGA T., OSHIMA M. and MIYATAKE T. J. Lipid Res., 19 (1978) 370-374	44

	<u>pages</u>
82) MURATA T., ARIGA T., OSHIMA T., MAEZAMA M. and MIYATAKE T. J. Lipid Res. 21 (1980) 879-887.	44
83) CANGULY A.K., CAPPUCINO N.F., FUJIWARA H. and BOSE A.K. J. Chem. Soc. Chem. Comm., (1979) 148-149	44
84) CARR S.A. and REINHOLD V.N. " the 30th annual conference on mass spectrometry and allied topics" Honolulu HI 1982 pp. 728-729	43
85) ARIGA T., MARATA T., OSHIMA M., MUEZAWA M. and MIYATAKE T. J. Lipid Res., 21 (1980) 879-887	43
86) AMAN P., Mc NEIL M., FRANZEN L.E., DARVILL A.G. and ALBERSHEIM P. Carbohydr. Res., (1981) 263-282	44
87) Mc NEIL M., DARVILL A.G., AMAN P., FRANZEN L.E. and ALBERSHEIM P. Dans "methods in Enzymology" (Colowick S.P. Kaplan N.O. and Ginsburg V. ed Vol 83 part D pp. 3-45 Academic Press New York 1981	44, 78
88) YORK W.S., Mc NEIL M., DARVILL A.G. and ALBERSHEIM P. J. Bacteriol., 142 (1980) 243-248	44, 78
89) SHULTEN H.R. Int: J. Mass Spectrom. Ion Phys., 32 (1979) 97-283	44, 52
90) SCHULTEN H.R. Methods Biochem. Anal., 24 (1977) 314-448.	44
91) WOOD G.W. Mass Spectrom. Rev., 1 (1982) 63-102.	44
92) LINSHEID M., D'ANGONA J., BURLINGAME A., DELL A., and BALLOU C.E. Proc. Natl. Acad. Sci., 78 (1981) 1471-1475.	45
93) MORRIS H.R., DELL A. and Mc DOWELL R.A. Biomed. Mass Spectrom., 8 (1981) 463-470.	45
94) FARBERG L.S., DELL A., WALTON D.J. and BALLOU C.E. J. Biol. Chem., 257 (1982) 3555-3563.	47, 54
95) KUSHI Y. and HANDA S. J. Biochem., 91 (1982) 923-931.	47
96) HAFLAND P., EGGE H., DABROWSKI U., KUHN S., ROELCKE D. and DABROWSKI J. Biochemistry, 20 (1981) 5310-5319.	47
97) SCHULTEN H.R., KOMORI T., NOHARA T., HIGUCHI R. and KAWASAKI T. Tetrahedron Lett., 34 (1978) 1003-1010	46

	<u>Pages</u>
98) COSTELLO C.E., WILSON B.W., BIEMANN K. and REINHOLD V.N. Dans "Cell surface glycolipids" Sweeley C.C. ed; Am. Chem. Soc. Symp. Ser. N°128 Am. Chem. Soc. Washington DC 1980 pp.35-54	48
99) POSTHUMUS M.A., KISTEMACKER P.G., MEUZELAAR H.L.C. and TEN NOEVER DE BRAUW M.C. Anal. Chem., 50 (1978) 985-991.	49
100) VAN DER PEYL G.J.Q., ISA K., HAVERKAMP J. and KISTEMACKER P.G. Org. Mass Spectrom., 16 (1981) 416-420.	49
101) HEINEN H.S., MEIER S., VOGT H. and WECHSUNG R. Adv. Mass Spectrom., 8A (1980) 942-953	49
102) HERCULES D.M., DAY R.J., BALASANMUNGAM K., DANG T.A. and LI C.P. Anal. Chem., 54 (1982) 280A-303A	49
103) COATES M.L. and WILKINS C.L. Biomed. Mass Spectrom. 12 (1985) 424-428.	49
104) COATES M.L. and WILKINS C.L. Anal. Chem., 59 (1987) 197-200.	49
105) LINDNER B., KAWAHARA K., ZAHRINGEN U. et SEYDEL U. "International Symposium on applied mass spectrometry in health sciences" Barcelone 1987 pp. 86	49
106) Mc FARLANE R.D. Biomed. Mass Spectrom., 8 (1981) 449-452.	50
107) Mc FARLANE R.D. and TORGERSON D.F. Science, 191 (1976) 920-925.	50
108) Mc FARLANE R.D. and TORGERSON D.F. Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys., 21 (1976) 81-92.	50
109) TORGERSON D.F., SKOWRONSKI R.P., and Mc FARLANE R.D. Biochem. Biophys. Res. Commun., 60 (1974) 920-925.	50
110) Mc FARLANE R.D. and HILL J.C. "International symposium on applied mass spectrometry in health science" Barcelone 1987 pp. 141	50
111) BARBER M., BORDOLI R.S., ELLIOTT G.J., SEDGWICK R.D. and TYLER A.N. Anal. Chem., 54 (1982) 645A-657A.	51, 52
112) BARBER M., BORDOLI R.S., SEDGWICK R.D. and TYLER A.N. Nature, 293 (1981) 270-275.	51
113) KAMBARA H. and HISHIDA S. Anal. Chem., 53 (1981) 2340-2344	53

	<u>pages</u>
114) REINHOLD V.N. and CARR S.A. "30th Annual conference on mass spectrometry and allied topics" Honolulu, HI 1982 pp. 730-731	53
115) DELL A. and BALLOU C. Carbohydr. Res., 120 (1983) 95-111.	54
116) DELL A., OATES J., LUGOWSKI C., ROMANOWSKA E., KENNE L. and LINDBERG B. Carbohydr. Res., 133 (1984) 95-104.	54
117) DELL A., MORRIS H.R., EGGE H., VON NICOLAI H. and STRECKER G. Carbohydr. Res., 115 (1983) 41-52.	54
118) DELL A., OATES J.E., MORRIS H.R. and EGGE H. Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys., 46 (1983) 415-418.	54
119) EGGE H., DELL A. and VON NICOLAI H. Arch. Biochem. Biophys., 224 (1983) 235-253.	54
120) EGGE H. and PETER-KATALINIC J. "Symposium on MS Health and life sciences San Francisco" A Burlingame ed. pp.9-13 1984.	54
121) KAMERLING J.P., HEERMA W., VLIEGENTHART J.F.G., GREEN B.N., LEWIS I.A.S., STRECKER G. and SPIK G. Biomed. Mass Spectrom., 10 (1983) 420-425.	54
122) TSAI P.K., DELL A., and BALLOU C.E. Proc. Natl. Acad. Sci., 82 (1986) 4119-4123.	54
123) ARITA M., IWAMORI M., HIGUCHI T. and NAGAI Y. J. Biochem., 94 (1983) 249-256.	54
124) ARITA M., IWAMORI M., HIGUCHI T. and NAGAI Y. J. Biochem., 95 (1984) 971-984.	54
125) HEMLING M.E., YU R.K., SEDWICK R.D., and RINCHART Jr K.L. Biochemistry, 23 (1984) 5706-5713.	54
126) BEYNON J.H., COOKS R.G., AMY J.W., BAITINGER W.E., and RIDLEY T.Y. Anal. Chem., 45 (1973) 1023A.	62
127) CARR S.A., REINHOLD V.N., GREEN B.N. and HASS J.R. Biomed. Mass Spectrom., 12 (1985) 288-295.	63, 64 65
128) CIUCANU I. and KEREK F. Carbohydr. Res., 131 (1984) 209-217.	66, 89 105
129) YAMASHITA K., KAMERLING J.P. and KOBATA A. J. Biol. Chem., 257 (1982) 12809-12814.	72

	<u>pages</u>
130) YAMASHITA K., KAMERLING J.P. and KOBATA A. J. Biol. Chem., (1983) 3099-3106.	72
131) PAZ PARENTE J., STRECKER G., LEROY Y., MONTREUIL J. and FOURNET B. J. Chromatogr., 249 (1982) 199-204.	72, 109
132) PAZ PARENTE J., STRECKER G., LEROY Y., MONTREUIL J., FOURNET B., VAN HALBEEK H. DORLAND L. and Vliegenthart J.F.G. FEBS Lett., 152 (1983) 145-152.	72, 73
133) PAZ PARENTE J., WIERUSZESKI J.M., STRECKER G., MONTREUIL J., FOURNET B., VAN HALBEEK H., DORLAND L. and Vliegenthart J.F.G. J. Biol. Chem., 257 (1982) 13173-13176.	72, 73
134) SCHACHTER H., NARASIMTTAN S., GLEESON P. and VELLA G. Can. J. Biochem. Cell. Biol., 61 (1983) 1059-1066.	81
135) FREDERICQ E. and DEUTSCH H.F. J. Biol. Chem., 181 (1949) 499-510	105, 106
136) MONSIGNY M. Thèse Doct.Sci., Lille (1968)	105
137) LEE Y.C. and SCOCCA J.R. J. Biol. Chem., 217 (1972) 5753-5758.	108
138) ROSEMAN S., LUDOWIEG J. J. Am. Chem. Soc., 76 (1954) 301	108

	<u>ref.</u>	<u>pages</u>
AMAN P., Mc NEIL M., FRANZEN L.E., DARVILL A.G. and ALBERSHEIM P. Carbohydr. Res., (1981) 263-282	86	44
ANGSTOM J., BREIMER M.E., FALK K.E., HANSSON G.C., KARLSSON K.A., LEFFLER H. and PASCHER I. Arch. Biochem. Biophys., 213 (1982) 708-725.	74	38
ANGSTOM J., FALK K., KARLSSON K.A. and LARSON G. Biochim. Biophys. Acta, 710 (1982) 428-436	60	38
ARIGA T., MARATA T., OSHIMA M., MUEZAWA M. and MIYATAKE T. J. Lipid Res., 21 (1980) 879-887	85	43
ARITA M., IWAMORI M., HIGUCHI T. and WAGAI Y. J. Biochem., 94 (1983) 249-256.	123	54
ARITA M., IWAMORI M., HIGUCHI T. and WAGAI Y. J. Biochem., 95 (1984) 971-984.	124	54
ARPINO P. Actualité Chimique, Avril (1982) 19-28	77	40
BALDWIN M.A. and Mc LAFFERTY T.V Org. Mass Spectrom., 7 (1973) 1141-1353	78	42
BALLY R.W. and CRAMERS C.A. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 9 (1986) 626-632.	13	15
BARBER M., BORDOLI R.S., SEDGWICK R.D. and TYLER A.N. Nature, 293 (1981) 270-275.	112	51
BARBER M., BORDOLI R.S., ELLIOTT G.J., SEDGWIG R.D. and TYLER A.N. Anal. Chem., 54 (1982) 645A-657A.	111	51 52
BERRY A.J., GAMES D.E. and PERKINS J.R. J. Chromatogr., 363 (1986) 147-158.	14	15
BEYNON J.H., COOKS R.G., AMY J.W., BAITINGER W.E., and RIDLEY T.Y. Anal. Chem., 45 (1973) 1023A.	126	62
BLAKLEY C.R. and VESTAL M.L. Anal. Chem., 55 (1984) 750 .	39	32
BLIBLIE A.L. and GREIBROKK T. Anal. Chem., 57 (1985) 2239-2242.	15	15
BREIMER M.E., HANSSON G.C., KARLSSON K.A. and LEFFLER H. Dans "cell surface Glycolipids" Sweeley C.C. ed Am. Chem. Symp. Ser 128 Am. Chem. Soc. Washington DC (1980) pp.79-104	73	38
BREIMER M.E., HANSSON G.C., KARLSSON K.A. and LEFFLER H. J. Biochem., (Tokyo) 90 (1981) 589-609	61	38

	ref.	pages
BREIMER M.E., HANSSON G.C., LEFFLER H., PIMLOTT W. and SAMUELSSON B.E. FEBS Lett., 124 (1981) 299-303	72	38
CANGULY A.K., CAPPUCINO N.F., FUJIWARA H. and BOSE A.K. J. Chem. Soc. Chem. Comm., (1979) 148-149	83	44
CAPRIOLI R.M., FAN T. and COTTRELL J.S. Anal. Chem., 58 (1986) 2949-2954	46	33 66,68
CARR S.A. and REINHOLD V.N. " the 30th annual conference on mass spectrometry and allied topics" Honolulu HI 1982 pp. 728-729	84	43
CARR S.A., REINHOLD V.N., GREEN B.N. and HASS J.R. Biomed. Mass Spectrom., 12 (1985) 288-295.	127	63 64,65
CAUDE M. and ROSSET R. Analisis, 14 (1986) 310-311	16	15
CHAPMAN J.R. Dans "Practical organic mass spectrometry" a Wiley interscience publication John Wiley & sons New york	49	35
CHESTER T.L. INNIS D.P. and OWENS G.D. Anal. Chem., 57 (1985) 2243-2247.	33	22
CHESTER T.L. and INNIS D.P. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 9 (1986) 209-212.	34	22 24
CIUCANU I. and KEREK F. Carbohydr. Res., 131 (1984) 209-217.	128	66 89,105
COATES M.L. and WILKINS C.L. Biomed. Mass Spectrom. 12 (1985) 424-428.	103	49
COATES M.L. and WILKINS C.L. Anal. Chem., 59 (1987) 197-200.	104	49
COSTELLO C.E., WILSON B.W., BIEMANN K. and REINHOLD V.N. Dans "Cell surface glycolipids" Sweeley C.C. ed; Am. Chem. Soc. Symp. Ser. N°128 Am. Chem. Soc. Washington DC 1980 pp.35-54	98	48
COVEY T.R., CROWTHET J.B., DEWEY E.A. and HENSON J.D. Anal. Chem., 57 (1985) 474-479	40	32
DE GRAEVE J., BERTHOU F. et PROST M. dans " Methodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse" (1986) Masson Paris.	4	3,5 25,26
DELL A., WILLIAMS D.H., MORRIS H.R., SMITH G.A., FEENEY J. and ROBERTS G.C.K. J. Am. Chem. Soc., 97 (1975) 2497-2502.	58	38

	<u>ref.</u>	<u>pages</u>
DELL A. and BALLOU C. Carbohydr. Res., 120 (1983) 95-111.	115	54
DELL A., MORRIS H.R., EGGE H., VON NICOLAI H. and STRECKER G. Carbohydr. Res., 115 (1983) 41-52.	117	54
DELL A., OATES J.E., MORRIS H.R. and EGGE H. Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys., 46 (1983) 415-418.	118	54
DELL A., OATES J., LUGOWSKI C., ROMANOWSKA E., KENNE L. and LINDBERG B. Carbohydr. Res., 133 (1984) 95-104.	116	54
EGGE H. and HANFLAND P. Arch. Biochem. Biophys., 210 (1981) 396-404.	62	38 47
EGGE H., MICHALSKI J.C. and STRECKER G. Arch. Biochem. Biophys., 213 (1982) 318-326.	68	38 54
EGGE H., DELL A. and VON NICOLAI H. Arch. Biochem. Biophys., 224 (1983) 235-253	119	54
EGGE H., PETER KATALINIC J., PAZ PARENTE J., STRECKER G., MONTREUIL J. and FOURNET B. FEBS Lett., 156 (1983) 357-362.	69	38, 54 72, 78
EGGE H. and PETER-KATALINIC J. "Symposium on MS Health and life sciences San Francisco" A Burlingame ed. pp.9-13 1984.	120	54
FALK K.E., KARLSSON K.A. and SAMUELSON B. FEBS Lett., 124 (1981) 173-177	63	38
FARSBERG L.S., DELL A., WALTON D.J. and BALLOU C.E. J. Biol. Chem., 257 (1982) 3555-3563.	94	47 54
FIELD F.H. Acc. Chem. Res., 1 (1968) 42	75	38
FJELDSTED J.C. and LEE M.L.. Anal. Chem., 56 (1984) 619A-628A.	17	15
FOURNET B., DHALLUIN J.M., MONTREUIL J., BOSSO C. and J. DEFAYE J. Anal. Biochem., 108 (1980) 35-56.	53	36
FOURNET B., STRECKER G., LEROY Y., and MONTREUIL J. Anal. Biochem., 116 (1981) 489-502.	54	36
FREDERICQ E. and DEUTSCH H.F. J. Biol. Chem., 181 (1949) 499-510	135	105 106
GAMES D.E., BERRY A.J., MYLCHREEST I.C., PERKINS J.R. and PLEASANCE Eur. Chromatogr. News, 1 (1987) 10-14.	18	15

	<u>ref.</u>	<u>pages</u>
GERE D.R., BOARD R., and Mc MANIGILL D. "Pittsburg Conférences on Analytical chemistry and applied spectroscopy" Atlantic city N.J. 1982.	32	22
GERE D.R. Science, 222 (1983) 253-259.	19	15
GOLAY M. Dans "Gas chromatography " 1958 (Amsterdam symposium) D.H. Desty ed., Butterworths London 1958 pp.36-53	12	12
GROß R.L. (editeur) Dans "Modern practice of gas chromatography" 2nd edition a Wiley interscience publication. John Wiley & sons 1985 New york	1	3
HANFLAND P. and EGGE H. Chem. Phys. Lipids, 16 (1970) 201-214.	64	38
HAFLAND P., EGGE H., DABROWSKI U., KUHN S., ROELCKE D. and DABROWSKI J. Biochemistry, 20 (1981) 5310-5319.	96	47
HAYES M.J., LANKMAYERE E.P., VOUIROS D., KARGER B.L. and MC GUIRE J.M. Anal. Chem., 55 (1983) 1745-1752	38	29
HEINEN H.S., MEIER S., VOGT H. and WECHSUNG R. Adv. Mass Spectrom., 8A (1980) 942-953	101	49
HEMLING M.E., YU R.K., SEDWICK R.D., and RINCHART Jr K.L. Biochemistry, 23 (1984) 5706-5713.	125	54
HENSLEY J.L. and Mc NAIR H.M. J. Liquid Chromatogr., 9 (1986) 1985-1996.	20	15
HERCULES D.M., DAY R.J., BALASANMUNGAM K., DANG T.A. and LI C.P. Anal. Chem., 54 (1982) 280A-303A	102	49
HSU F.F., EDMONDS C.G. and Mc CLOSKEY J.A. Anal. Lett., 19 (1986) 1259-1271.	42	33
HUNT D.F., SHABANOWITCH J., BOTZ F.K. and BRENT D.A. Anal. Chem., 49 (1977) 1160	79	42
ITO J., TAKEUCHI T. and ISHII D. J. Chromatogr., 346 (1985) 161-166.	45	33 80
JENNING W. Dans " gas chromatography with capillary column " Academic press New York 1978	2	3
KAMBARA H. and HISHIDA S. Anal. Chem., 53 (1981) 2340-2344	113	53

	<u>ref.</u>	<u>pages</u>
KAMERLING J.P., HEEERMA W., VLIAGENTHART J.F.G., GREEN B.N., LEWIS I.A.S., STRECKER G. and SPIK G. Biomed. Mass Spectrom., 10 (1983) 420-425.	121	54
KARLSSON K.A., PASCHER I., SAMUELSSON B.E., FINNE J., KRUSIUS T. and RAUVALA H. FEBS Lett., 94 (1978) 413-418	71	38
KLESPER E., CORWIN A.H. and TURNER D.A. J. Org. Chem., 27 (1962) 700-701.	31	18
KLESPER E. and LEYENDECKER D. Int. Lab., November (1986) 18-30.	21	15
KUCERA P. (editeur) Dans "Microcolumn High-Performance Liquid Chromatography" Elsevier, Amsterdam, New York, 1984.	9	11
KUSHI Y. and HANDA S. J. Biochem., 91 (1982) 923-931.	95	47
LEE Y.C. and SCOCCA J.R. J. Biol. Chem., 217 (1972) 5753-5758.	137	108
LEE M.L. et WRIGHT B.N. J. Chrom. Sci., 18 (1980) 345-358.	11	12
LEE M.L. and MARKIDES K.E. J. High Resolu. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 9 (1986) 652-656.	23	15 99
LEE M.L. and MARKIDES K.E. Science, 235 (1987) 1342-1347.	23	15
LINDNER B., KAWAHARA K., ZHRINGEN U. et SEYDEL U. "International Symposium on applied mass spectrometry in health sciences" Barcelone 1987 pp. 86	105	49
LINSHEID M., D'ANGONA J., BURLINGAME A., DELL A., and BALLOU C.E. Proc. Natl. Acad. Sci., 78 (1981) 1471-1475.	92	45
LONGUEVIALLE P. Dans "Principes de la spectrométrie de masse des substances organiques" Masson Paris 1981	50	35,41 52,55 58
MARKEY S.P. and WENGERENGER D.A. Chem. Phys. Lipids, 12 (1974) 182-200	80	44
MATSUMOTO K., LIEU H.C. and TSUGE S. Fresenius Z. Anal. Chem., 323 (1986) 212-216.	44	33
Mc CREADIE S.W.S. and SWAN D.F.K. Spectra, 13 (1985) n°106 33-43.	7	8

	<u>ref.</u>	<u>pages</u>
Mc FARLANE R.D. and TORGERSON D.F. Science, 191 (1976) 920-925.	107	50
Mc FARLANE R.D. and TORGERSON D.F. Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys., 21 (1976) 81-92.	108	50
Mc FARLANE R.D. Biomed. Mass Spectrom., 8 (1981) 449-452.	106	50
Mc FARLANE R.D. and HILL J.C. "International symposium on applied mass spectrometry in health science" Barcelone 1987 pp. 141	111	50
Mc NEIL M., DARVILL A.G., AMAN P., FRANZEN L.E. and ALBERSHEIM P. Dans "methods in Enzymology" (Colowick S.P. Kaplan N.O. and Ginsburg V. ed Vol 83 part D pp. 3-45 Academic Press New York 1981	87	44 78
MILLINGTON D.S. YORKE D.A. BURNS P. Adv. Mass Spectrom., 8B (1983) 1819-1825	37	28
MONSIGNY M. Thèse Doct.Sci., Lille (1968)	136	105
MORRIS H.R., DELL A. and Mc DOWELL R.A. Biomed. Mass Spectrom., 8 (1981) 463-470.	93	45
MOURIER P., SASSIAT P., CAUDE M. and ROSSET R. Analisis, 12 (1984) 229-248.	26	15
MOURIER P., SASSIAT P., CAUDE M. and ROSSET R. J. Chromatogr., 353 (1986) 61-75.	24	15
MULLER F. and GOEKELER U.K. Am. Lab., May (1985)	8	8 9
MUNSON M.S.B. Anal. Chem., 49 (1977) 772A	76	38
MURATA T., ARIGA T., OSHIMA M. and MIYATAKE T. J. Lipid Res., 19 (1978) 370-374	81	44
MURATA T., ARIGA T., OSHIMA T., MAEZAMA M. and MIYATAKE T. J. Lipid Res. 21 (1980) 879-887.	82	44
NOVOTNY M., SPRINGSTON S.R., PEADEN P.A., FJELDSTED J.C. and LEE M.L. Anal. Chem., 53 (1981) 407A-414A.	25	15
OHASHI M., YAMADA S., KUDO H., and WAKAYAMA N. Biomed. Mass Spectrom., 5 (1978) 578-581.	59	38
PAZ PARENTE J., STRECKER G., LEROY Y., MONTREUIL J. and FOURNET B. J. Chromatogr., 249 (1982) 199-204.	131	72 109

	<u>ref.</u>	<u>pages</u>
PAZ PARENTE J., WIERUSZESKI J.M., STRECKER G., MONTREUIL J., FOURNET B., VAN HALBEEK H., DORLAND L. and VLIAGENTHART J.F.G. J. Biol. Chem., 257 (1982) 13173-13176.	133	72 73
PAZ PARENTE J., STRECKER G., LEROY Y., MONTREUIL J., FOURNET B., VAN HALBEEK H. DORLAND L. and VLIAGENTHART J.F.G. FEBS Lett., 152 (1983) 145-152.	132	72 73
PEADEN P.A. and LEE M.L. J. Liquid Chromatogr., 5 (1982) 179-221.	35	23
POSTHUMUS M.A., KISTEMACKER P.G., MEUZELAAR H.L.C. and TEN NOEVER DE BRAUW M.C. Anal. Chem., 50 (1978) 985-991.	99	48
RADFORD T. et DE JONGH D. Dans "Biochemical applications of Mass spectrometry " Waller G.R. Ed Wiley intersciences New York 1972 and	47	35
RADFORD T. et DE JONGH D. Dans "Biochemical applications of Mass spectrometry " First supplementary Vol. Waller G.R. Dermer O.C. Eds Wiley intersciences New York 1980	48	35
RAWDON M.G. and NORRIS N.A. Int. Lab., June (1984) 12-23.	27	15
REED R.I. and REID W.K. J. Chem. Soc., (1963) 5933.	56	36
REINHOLD V.N. and CARR S.A. "30th Annual conference on mass spectrometry and allied topics" Honolulu, HI 1982 pp. 730-731	114	53
REINHOLD V.N. and CARR S.A. Mass Spectrom. Rev., 2 (1983) 153-221	52	35
ROSEMAN S., LUDOWIEG J. J. Am. Chem. Soc., 76 (1954) 301	138	108
ROSSET R., CAUDE M. et JARDY A. Dans " Manuel pratique de chromatographie en phase liquide" 2eme edition 1982 Masson.	10	11
ROSSET R., MOURIER P. and CAUDE M. L'Actualité Chimique, Septembre (1986) 17-34.	28	15, 16 17, 19
RYHAGE R. Anal. Chem., 36 (1964) 759	36	25
SCHACHTER H., NARASIMTTAN S., GLEESON P. and VELLA G. Can. J. Biochem. Cell. Biol., 61 (1983) 1059-1066.	134	81

	<u>ref.</u>	<u>pages</u>
SCHULTEN H.R. Methods Biochem. Anal., 24 (1977) 314-448.	90	44
SCHULTEN H.R., KOMORI T., NOHARA T., HIGUCHI R. and KAWASAKI T. Tetrahedron Lett., 34 (1978) 1003-1010	97	46
SHULTEN H.R. Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys., 32 (1979) 97-283	89	44 52
SIMPSON R.C., GANT J.R. and BROWN P.R. J. Chromatogr., 371 (1986) 109-119.	29	15
SMITH E.L., Mc KIBBIN J.M., KARLSSON K.A., PASCHER I., SAMUELSSON B.E. and LI S.C. J. Biol. Chem., 250 (1975) 6059- 6064	65	38
SMITH E.L., Mc KIBBIN J.M., KARLSSON K.A., PASCHER I., SAMUELSSON B.E. and LI S.C. Biochem., 14 (1975) 3370-3376	67	38
SMITH E.L., Mc KIBBIN J.M., KARLSSON K.A., PASCHER I. and SAMUELSSON B.E. Biochem. Biophys. Acta, 388 (1979) 171-179	66	38
SMITH R.D., FELIX R.D., FJELDSTED J.C. and LEE M.L. Anal. Chem., 54 (1982) 1883-1885.	30	15
STRECKER G., PIERCE CRETEL A., FOURNET B., SPIK G., and MONTREVIL J. Anal. Biochem., 111 (1981) 17-26.	55	36
TABET J.C. and FETIZON M. Dans "Modern Physical methods in Biochemistry " Part A Chapitre 3 Neuberger / Van Deenen (eds) Elsevier Science 1985	51	35
TAYLOR G.W., MORRIS H.R., PETERSON T.E. and MAGNUSSON S. Adv. Mass Spectrom., 8 (1979) 1090-1096	70	38
TORGERSON D.F., SKOWRONSKI R.P., and Mc FARLANE R.D. Biochem. Biophys. Res. Commun., 60 (1974) 920-925.	109	50
TRANCHANT J. Dans " Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse" 3eme edition (1982) Masson. Paris.	3	3
TSAI P.K., DELL A., and BALLOU C.E. Proc. Natl. Acad. Sci., 82 (1986) 4119-4123.	122	54
TSUDA T., KELLER G. and STAN H.J. Anal. Chem., 57 (1985) 2280-2282.	43	33
VAN DEEMTER J.J., ZUYDERWEG F.J. and KINKENBERG A. Chem. Eng. Sci., 5 (1956) 271.	5	4

	<u>ref.</u>	<u>pages</u>
VAN DER PEYL G.J.Q., ISA K., HAVERKAMP J. and KISTEMAKER P.G. Org. Mass Spectrom., 16 (1981) 416-420.	100	49
VESTEC Sté "Thermospray LC/MS interface instruction, maintenance manual"	41	30 31,33
WIEDEMER R.T., Mc KINLEYS.L. and RENDL T.W. Int. Lab., May (1986) 69-77	6	6 7
WOOD G.W. Mass Spectrom. Rev., 1 (1982) 63-102.	91	44
YAMASHITA K., KAMERLING J.P. and KOBATA A. J. Biol. Chem., 257 (1982) 12809-12814.	129	72
YAMASHITA K., KAMERLING J.P. and KOBATA A. J. Biol. Chem., (1983) 3099-3106.	130	72
YORK W.S., Mc NEIL M., DARVILL A.G. and ALBERSHEIM P. J. Bacteriol., 142 (1980) 243-248	88	44 78
ZOLOTAREV B.M., OTT.,A. Ya . and CHISHOV O.S. Advan. Mass Spectrom., 7B (1978) 1371-1375.	57	37

Ces dernières années, l'ionisation des molécules organiques par bombardement d'atomes neutres accélérés (FAST ATOM BOMBARDMENT: FAB) a été largement développée dans le champ des glycoconjugués. Cette technique d'ionisation, qui utilise une sonde d'introduction directe sur laquelle est déposé l'échantillon dissous dans une matrice (glycérol ou thioglycérol), ne permet pas le couplage entre un appareil de chromatographie et le spectromètre de masse. Nous décrivons dans ce travail une nouvelle sonde d'introduction qui permet à la fois d'utiliser le mode d'ionisation FAB et l'arrivée en continu des échantillons. L'avantage de cette sonde par rapport aux cannes d'introductions conventionnelles, est la possibilité d'analyser des micro-quantités de glycannes. L'augmentation du rapport signal/bruit est due à la faible quantité de matrice utilisée. D'autre part, cette sonde s'adapte tout à fait comme interface : chromatographie liquide-spectrométrie de masse (LC-MS). C'est ainsi que nous avons pu analyser pour la première fois des produits de masse moléculaire élevée en sortie de colonne d'HPLC. La colonne utilisée lors de ce travail est une colonne capillaire remplie dont les excellentes caractéristiques conduisent à une parfaite séparation d'oligosaccharide-alditols perméthylés obtenus à partir des glycannes neutres de l'ovomucoïde du blanc d'oeuf de poule.

Notre second objectif a été l'application des caractéristiques des fluides supercritiques à l'analyse d'oligomères glucidiques de masse moléculaire importante ne pouvant être séparés par GLC ou par HPLC. Les premiers résultats obtenus sur la séparation d'oligomères du glucose perméthylés sont très encourageants et nous permettent d'espérer d'excellentes séparations sur les glycannes de glycoprotéines. L'objectif final de ce travail est bien-sûr le couplage avec le spectromètre de masse qui ne devrait pas poser de problèmes compte tenu de la nature du fluide supercritique.