

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SALERNO

**FACOLTA' DI FARMACIA**

Corso di Metodi fisici in chimica organica

***SPETTROMETRIA DI MASSA***

## 1. PRINCIPI GENERALI

La spettrometria di massa consiste in un insieme di tecniche analitiche, particolarmente usate in chimica organica, che consentono di misurare le masse molecolari e di determinare quindi la formula di struttura di composti sconosciuti, anche avendone a disposizione piccole quantità.

Una molecola però, per poter essere osservata e misurata nelle sue proprietà di massa, deve essere prima ionizzata.

Per ottenere uno spettro di massa, infatti, il requisito essenziale è di produrre degli ioni in fase gassosa che saranno successivamente accelerati fino a raggiungere una velocità specifica mediante un campo elettrico, e poi proiettati in un analizzatore di massa appropriato che separa entità di masse diverse ed infine, rivelare ogni composto dotato di carica e con una certa massa sequenzialmente nel tempo. Mediante la spettrometria di massa è possibile studiare qualsiasi tipo di composto che sia in grado di essere ionizzato, e i cui ioni possano esistere in fase gassosa. Questa tecnica, quindi, risulta completamente diversa dagli altri comuni metodi analitici. A differenza delle tecniche spettroscopiche, essa è un metodo d'analisi distruttivo (la molecola non rimane intatta dopo l'analisi), e soprattutto non si basa sull'interazione tra radiazioni e materia.

La spettrometria di massa nasce nel 1886, quando Goldstein, un fisico tedesco, scoprì che ioni positivi (raggi canale) fuoriuscivano da un campo elettrico cui era stata applicata una bassa pressione. Nel 1898, Wien mostrò che un raggio di questi ioni poteva essere deflesso da un campo elettrico e un campo magnetico. Tra il 1912 e il 1919, Thompson e Aston perfezionarono i dispositivi usati per lo studio dei raggi canale, costituendo nel 1919 il primo spettrometro di massa. Tale apparecchio fornì ai fisici uno strumento indispensabile per lo studio della struttura atomica della materia. Con esso Aston scoprì l'esistenza degli isotopi, prima dell'elio e poi di un gran numero di altri elementi, misurandone il peso e il numero atomico. Nel 1922 ricevette il premio Nobel per la chimica. Le applicazioni attuali della spettrometria di massa sono estremamente vaste e vanno dall'indagine isotopica, allo studio delle sostanze aeriformi e ancora all'indagine sulla struttura delle molecole organiche delle più semplici fino alle macromolecole di origine biologiche.

Essa è impiegata soprattutto nel campo farmaceutico nel settore di controllo della qualità ed è spesso associata a tecniche di separazione, come HPLC e GC.

## 2. SPETTROMETRO DI MASSA



In uno spettrometro di massa il campione è prima ionizzato; gli ioni risultanti sono poi separati in funzione del loro rapporto massa/carica  $m/z$ . Tutti gli analizzatori di massa richiedono per il loro funzionamento un vuoto molto spinto. Quelli più moderni sono largamente modulari: attorno ad un sistema di vuoto e ad un analizzatore può essere assemblato uno strumento con diversi sistemi di introduzione del campione e/o di ionizzazione. Tutti gli spettrometri sono comunque costituiti essenzialmente da tre parti:



- una camera di ionizzazione o sorgente (S)
- un analizzatore (A)
- un rivelatore (R)

L'introduzione del campione, e quindi la sua vaporizzazione, può avvenire sotto alto vuoto ( $10^{-6}$  -  $10^{-7}$  mmHg), per impedire una perdita di ionizzazione per urto con i gas atmosferici. Il campione può essere introdotto sotto diverse forme fisiche:

- i gas si trovano già nella forma fisica adatta
- i solidi e i liquidi vengono prima vaporizzati

- nei casi di sostanze poco volatili si ricorre a derivatizzazione

Il vapore ottenuto viene poi mandato alla camera di ionizzazione che si trova a pressione inferiore.

### **CAMERA DI IONIZZAZIONE**

Se una molecola è investita in fase vapore da un fascio di elettroni di notevole energia cinetica si può avere per urto la sua ionizzazione a ione positivo o negativo. In genere gli strumenti sono regolati per lavorare unicamente con ioni positivi, i quali possono spontaneamente o per urto decomporsi in una serie di frammenti di massa inferiore e questi a loro volta in altri. Ogni molecola avrà quindi una sua *frammentazione caratteristica e specifica* che dipenderà sia dalla natura delle molecole sia dalle condizioni operative di ionizzazione. Il campione viene ionizzato in un'apposita camera di ionizzazione, in cui il fascio di elettroni viene prodotto da una *sorgente* ionica che varia a seconda della tecnica utilizzata. In genere gli elettroni sono emessi da un filamento caldo di tungsteno o renio, passano attraverso un condotto, che crea il raggio, nella parte centrale della camera che contiene il campione gassoso. La frazione di elettroni che non urta contro le molecole è raccolta da una trappola per gli elettroni, le molecole che non sono ionizzate sono allontanate dalla pompa ad alto vuoto, mentre quelle ionizzate sono accelerate e convogliate verso l'analizzatore.

Il sistema di ionizzazione svolge un ruolo essenziale nella spettrometria di massa, perché da esso dipende anche il numero, la natura e l'abbondanza dei frammenti molecolari che compaiono nello spettro di massa. Per questo motivo le tecniche utilizzate sono numerose e alcune di esse danno origine a particolari varianti nella spettrometria di massa.

Tra i vari dispositivi alcuni consentono di analizzare solo frammenti positivi, altri invece, permettono la rivelazione anche di ioni negativi. Inoltre alcune tecniche di ionizzazione sono decisamente potenti, operano cioè ad alta energia e portano ad una frammentazione spinta (TECNICHE HARD), altre

invece operano a bassa energia producendo un numero inferiore di ioni (TECNICHE SOFT).

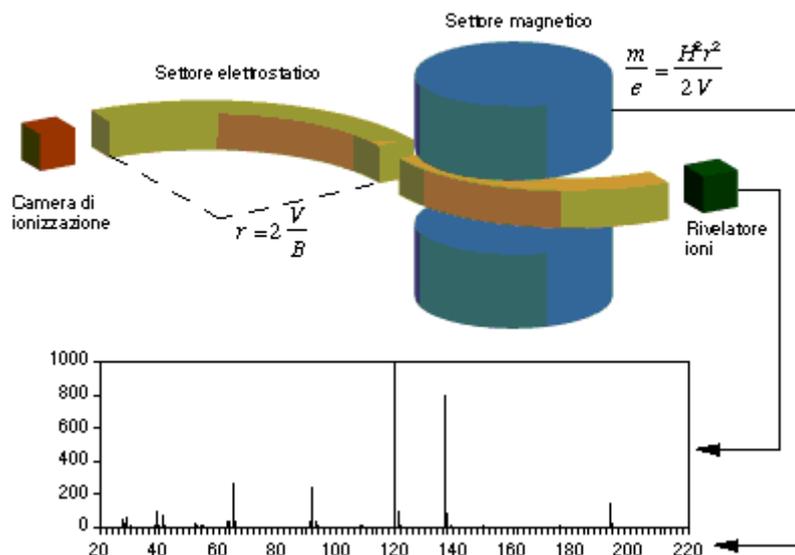
In base al tipo di sorgente utilizzata la ionizzazione primaria del campione viene realizzata in vario modo; le tecniche più utilizzate sono:

- impatto elettronico (E.I.)
- ionizzazione chimica (C.I.)
- bombardamento con atomi veloci (F.A.B.)
- desorbimento con laser (M.A.L.D.I.)
- electrospray (E.S.I.)

## ANALIZZATORE

L'analizzatore consente di differenziare gli ioni generati in base al loro rapporto **massa/carica**. Poiché nella maggior parte dei casi la carica degli ioni è +1, la separazione avviene sulla base delle rispettive masse ( $M/1$ ).

Nel caso più noto (uno dei primi analizzatori) ciò viene realizzato ricorrendo a campi elettrici accoppiati a campi magnetici (es. spettrometro a doppia focalizzazione elettromagnetica). Il campo elettrico accelera gli ioni ad una velocità piuttosto elevata, inviandoli in un condotto ricurvo, ed il campo



magnetico induce una deflessione del percorso degli ioni accelerati in base alla loro massa.

Le leggi fisiche che stanno alla base di questo dispositivo sono abbastanza semplici. All'uscita della camera di ionizzazione il raggio di ioni è accelerato attraverso un potenziale  $V$  di 6000 – 8000 Volt. Le equazioni che governano il moto degli ioni nel campo elettrostatico sono:

$$\text{Energia cinetica} \quad E_c = \frac{1}{2} m v^2$$

$$\text{Forza centrifuga} \quad F_c = \frac{m v^2}{r}$$

Occorre considerare che l'energia cinetica degli ioni accelerati eguaglia l'energia fornita dal campo elettrico

$$\frac{1}{2} m v^2 = zV$$

dove  $m$  è la massa,  $v$  la velocità,  $z$  la carica dello ione e  $V$  la differenza di potenziale. Lo ione accelerato quindi acquista energia cinetica a spese del campo elettrico. Il settore elettrostatico si limita ad uniformare le energie traslazionali degli ioni compensando le differenze di velocità iniziali.

La vera separazione degli ioni avviene nel settore magnetico, in quanto esso obbliga gli ioni che lo attraversano a descrivere una traiettoria circolare.

Gli ioni dotati di energia traslazionale appena entrano nel campo magnetico vengono sottoposti ad una forza centripeta data da

$$F_H = BzV$$

Essa indica il potere di deflessione del campo magnetico ( $B$ ) ed è direttamente proporzionale al campo e alla carica. In tali condizioni, affinché uno ione possa percorrere il tubo analizzatore la sua forza centrifuga dovrà eguagliare la forza centripeta per cui:

$$\frac{m v^2}{r} = BzV$$

Se non ci fosse tale bilancio lo ione colliderebbe con la parete dell'analizzatore.

Combinando le due equazioni di bilancio

$$\frac{1}{2}mv^2 = zV$$

$$\frac{mv^2}{r} = BzV$$

otteniamo l'equazione fondamentale della spettrometria di massa:

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2}{2V}$$

Per un dato valore di campo magnetico **B** e di potenziale di accelerazione **V** e ciascun valore del rapporto **m/z** corrisponde un raggio di curvatura **r**.

Questa equazione descrive quella parte di ioni che raggiunge il rivelatore, la cui traiettoria corrisponde esattamente alla curvatura del tubo.

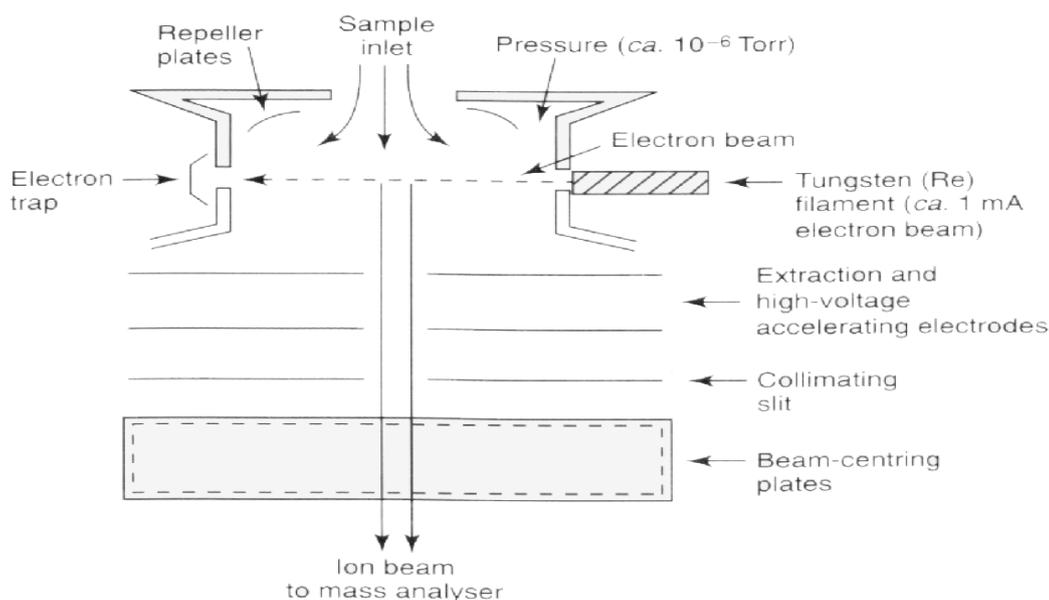
Campo elettrico e campo magnetico non sono costanti ma variano alternativamente nel tempo in modo da raggiungere quell'equilibrio che permetterà al maggior numero di ioni possibili di passare nel rivelatore.

## **RIVELATORE**

Senza un sistema di rivelazione adatto, l'informazione portata da sorgenti ed analizzatori non potrebbe essere registrata. La maggioranza dei rivelatori funzionano ad impatto ionico o per cattura ionica. Tutti i tipi richiedono una superficie che raccolga gli ioni e dove la carica venga neutralizzata sia per la raccolta sia per donazione di elettroni. Si realizza quindi un trasferimento di elettroni ed un flusso di corrente che può essere amplificato ed infine convertito in un segnale registrabile su carta o processabile da un computer.

### 3. ELECTRON IMPACT (E.I)

Nella spettrometria di massa la tecnica più nota (storicamente è la prima tecnica sviluppata) è la ionizzazione per impatto elettronico, una tecnica di ionizzazione hard che, proprio per l'alta energia in gioco, oltre a ionizzare una molecola, generalmente ne provoca anche la frammentazione.



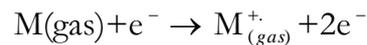
Nella camera di ionizzazione ( $10^{-6}$ – $10^{-7}$  mmHg) le molecole del campione da analizzare, in fase gassosa, interagiscono con un fascio di elettroni generato da un filamento incandescente (Renio o Tungsteno) ed accelerato attraverso un potenziale regolabile dall'operatore. L'energia del fascio è normalmente fissata a 70 eV. Nella sorgente ad impatto elettronico l'analita deve essere allo stato gassoso, il che pone dei limiti all'applicabilità del metodo con alcuni materiali biologici, nonostante la maggior parte delle sostanze possono essere resi più volatili mediante derivatizzazione chimica. L'interazione degli elettroni con le molecole della sostanza può provocare due situazioni diverse:

- perdita di un elettrone dalla sostanza, con la formazione di uno ione radical positivo
- oppure l'elettrone viene ceduto alla sostanza formando un radical anione

L'evento più probabile è che si formi il radical catione per questioni energetiche. Gli spettri E.I. sono registrati, generalmente, con lettura su ioni positivi.

#### **Meccanismo di ionizzazione:**

la molecola allo stato gassoso  $[M(gas)]$  impatta con un elettrone ( $e^-$ ) e dà luogo ad una specie catione radicale  $[M^+(gas)]$  più due elettroni



L'energia cinetica viene trasferita al sistema provocando una transizione elettronica fino ad orbitali di livello così elevato da sfuggire ai nuclei e quindi l'elettrone va via.

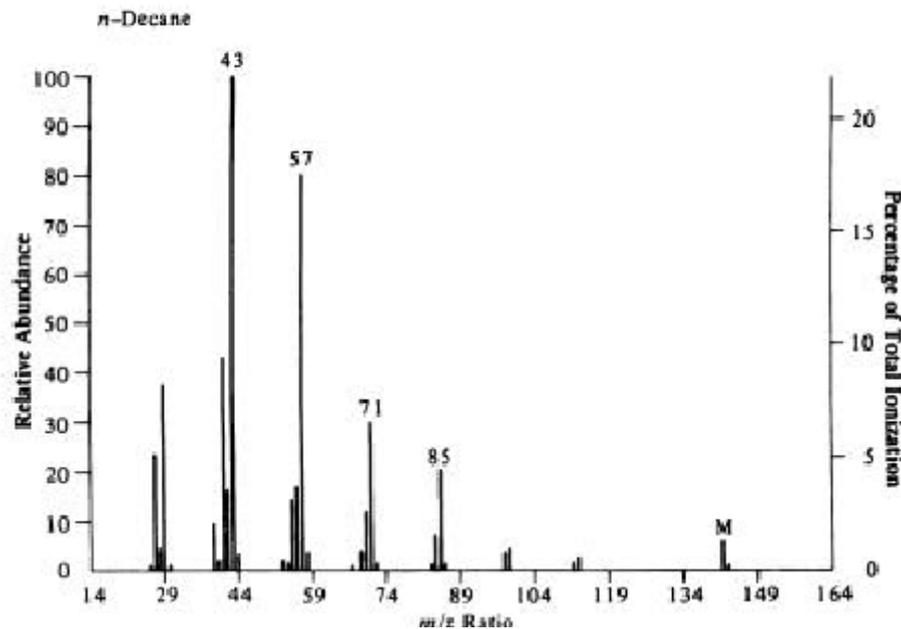
La molecola bombardata ( $M^+$ ) è sia un radicale perché ha un  $e^-$  spaiato, ma è anche un catione perché ha un protone non bilanciato. La specie  $M^+$  viene detta IONE MOLECOLARE ed è molto instabile, a causa dell'eccesso di energia si disintegra ulteriormente in frammenti più piccoli con rapporto  $m/z$  sempre più basso. Anche questi frammenti possono essere instabili e frammentarsi ulteriormente; la frammentazione porta alla formazione di una serie di molecole e/o radicali neutri, che non vengono rivelati dallo strumento, e una serie di ioni figli (cationi e/o radicalcationi) che vengono separati e poi rivelati in uno spettro di massa.

## **4. ANALISI DI UNO SPETTRO DI MASSA**

Questo paragrafo riguarda principalmente l'interpretazione di spettri di massa di semplici molecole ottenuti dopo ionizzazione per impatto elettronico. L'impiego di metodi di ionizzazione alternativi (CI, ES, ecc) e la registrazione di spettri di ioni negativi è sempre più diffusa ma solo in particolari campi. Lo spettrometro "consegna" i risultati sotto forma di uno spettro di massa, cioè di una serie di picchi di intensità variabile, la posizione di ogni picco corrisponde ad un determinato valore di  $m/z$ . In uno spettro di massa, l'asse delle X riporta valori di rapporto  $m/z$  e l'asse delle Y valori di abbondanza relativa degli ioni analizzati.

Un semplice esempio è rappresentato dal *n*-decano e dai suoi principali prodotti di frammentazione.

**Figure 3.** (A) Electron impact mass spectrum of *n*-decano at 70 eV.



L'intensità dei picchi sono espresse in percentuali del picco più intenso il cosiddetto picco base cui si assegna arbitrariamente il valore 100. Gli spettri prodotti con questa tecnica sono normalizzati, indipendenti dallo strumento impiegato e quindi sono comparabili direttamente. Se la risoluzione dello strumento è sufficientemente elevata, è possibile determinare la massa esatta dei singoli ioni, dalla quale si può dedurre la composizione elementare dello ione stesso. Dallo spettro di massa si può risalire alla struttura di un composto incognito, attribuendo ai singoli ioni una composizione elementare e ricostruendo i meccanismi di frammentazione seguendo schemi tipici per le varie classi di composti.

Nell'interpretazione di uno spettro si segue una procedura abbastanza semplice:

1. Identificazione dello ione molecolare.
2. identificazione di ioni caratteristici.
3. identificazione di processi di frammentazione caratteristici.
4. Ricostruzione della struttura della molecola sulla base della conoscenza di meccanismi di frammentazione standard.

## 5. DETERMINAZIONE DELLA STRUTTURA E DEL PESO MOLECOLARE

Uno spettro di massa ed in particolare la localizzazione del picco molecolare consente di avere il peso molecolare di una sostanza rapidamente e con assoluta esattezza. Inoltre, un apparecchio moderno ad alta risoluzione riesce a determinare la massa sino alla quarta cifra decimale, permettendo quindi di trovare la formula bruta di una sostanza.

Il livello di informazione che possiamo ottenere da uno spettrometro di massa dipende dal suo potere risolutivo. Questo è la capacità di separare due picchi con masse diverse (es.  $M_n$  e  $M_m$ ).

$$R = M_n/M_n - M_m$$

Strumenti a bassa risoluzione forniscono solo la massa nominale (intera) degli ioni fino a circa 2000 dalton ( $R = 2000/2000 - 1999 = 2000$ ).

Strumenti ad alta risoluzione forniscono la massa esatta degli ioni, che in genere definisce univocamente la composizione elementare degli ioni corrispondenti.

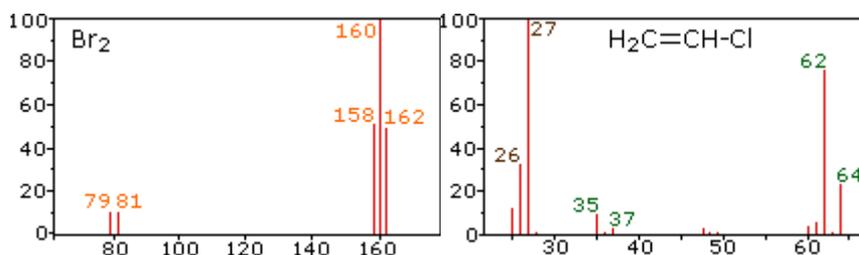
Ad esempio, in uno strumento a bassa risoluzione CO, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> e N<sub>2</sub> forniscono un unico segnale a massa nominale 28; in uno strumento ad alta risoluzione si possono osservare invece tre ioni separati di massa esatta. Uno strumento con risoluzione 20.000, può distinguere tra gli ioni relativi a C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub> (massa esatta 250.1933 dalton) e C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>2</sub> (massa esatta 250.1807 dalton):

$$R = 250.1933/250.1933 - 250.1807 = \text{circa } 20.000$$

Tuttavia, poiché gli apparecchi più semplici e più diffusi distinguono bene solamente i numeri interi di massa, la determinazione della formula bruta molecolare si basa spesso su un altro principio e cioè la valutazione delle intensità dei picchi satelliti isotopi relativi al picco molecolare.

## ISOTOPI

La maggior parte degli elementi che compongono i composti organici possiede diversi isotopi naturali, di cui di solito il più leggero è il più abbondante. Per tre elementi – carbonio, idrogeno e azoto – il principale isotopo pesante è quello la cui massa è superiore di un'unità a quella dell'isotopo più comune. Quando questi elementi sono presenti in un composto organico lo spettro di massa mostra dei piccoli picchi isotopici a M+1. Nel caso di ossigeno, zolfo, cloro e bromo, le masse dei principali isotopi pesanti sono superiori di due unità a quelle degli isotopi più abbondanti. Perciò la presenza di questi elementi è rivelata dai picchi isotopici a M+2. Dallo studio dei picchi isotopici e conoscendo le percentuali di abbondanza naturale dei vari isotopi, è possibile risalire alla formula molecolare. Inoltre la presenza di alcuni atomi come cloro e bromo, che hanno composizioni isotopiche peculiari ( $^{35}\text{Cl}$  e  $^{37}\text{Cl}$  3:1;  $^{79}\text{Br}$  e  $^{81}\text{Br}$  circa 1:1), può facilmente essere ipotizzata osservando le intensità dei picchi isotopici dello ione, che rispecchieranno quelle relative all'abbondanza naturale dell'atomo in questione. (v. esempi)

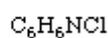
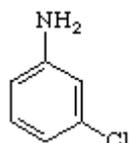


## GRADO DI INSATURAZIONE (G.I.)

La formula molecolare ci permette di calcolare il grado di insaturazione (doppi legami e cicli) di una molecola.

$$G.I. = (2C_n - H_m - X_o + N_p + 2) / 2$$

Es.



$$\text{G.I.} = (12 - 6 - 1 + 1 + 2) / 2 = 4 \quad (\text{3 doppi legami formali pi\`u un ciclo})$$

**Regola dell'azoto:** *i composti in cui \`e presente un numero dispari di atomi di azoto hanno massa nominale dispari, mentre i composti che contengono numero pari o nessun atomo di azoto hanno massa nominale pari.*

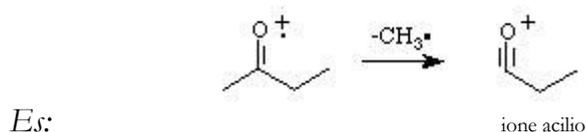
## 6. FRAMMENTAZIONE

Lo ione molecolare \`e una specie estremamente ricca di energia e, specialmente nel caso di molecole complesse, le sue sorti possono essere molto diverse. Lo ione molecolare pu\`o decomporsi in un'ampia variet\`a di modi ed i frammenti prodotti possono subire un ulteriore processo di scissione. Le principali frammentazioni delle molecole organiche sono:

- **Frammentazioni semplici** ( reazioni di frammentazione con rottura di un legame semplice tra due atomi). Quando queste scissioni interessano il catione radicalico producono sempre un catione ed un radicale libero.

Possono essere di vario tipo:

- scissioni in  $\alpha$  attivate, avvengono in  $\alpha$  ad eteroatomi e a gruppi funzionali. I legami carbonio-carbonio adiacenti al gruppo carbonilico di un'aldeide o di un chetone si rompono con relativa facilit\`a in quando si formano ioni acilio stabilizzati per risonanza.

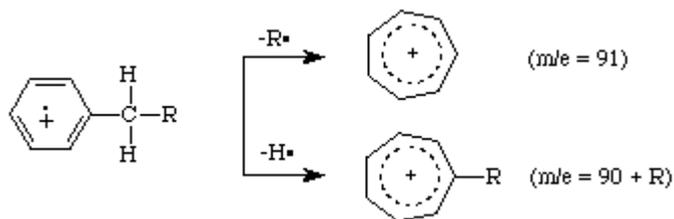


- Scissione benzilica, negli alchilbenzeni si verifica la perdita di un atomo di idrogeno o di un radicale metilico con formazione dello ione tropilio

(ione estremamente stabile). Questa frammentazione si traduce in un picco molto intenso a  $m/z$  91.

-

Es.

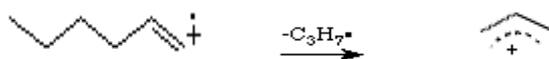


Ione tropilio

- scissione allilica; frequentemente la frammentazione degli alcheni produce carbocationi allilici.

-

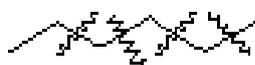
Es.



- scissioni in  $\alpha$  non attivate, frammentazioni che avvengono in composti che non hanno eteroatomi e non hanno particolari insaturazioni (idrocarburi alifatici).

Es.

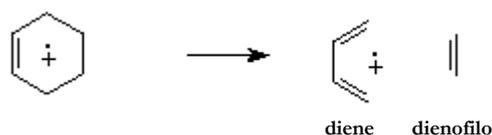
M-15; M -29; M -43; ecc.



- **Frammentazioni multiple o riarrangiamenti** (reazioni di frammentazione con rottura di due legami covalenti). Quando si verificano a carico di uno ione radicale i prodotti sono un altro catione radicale ed una molecola neutra.

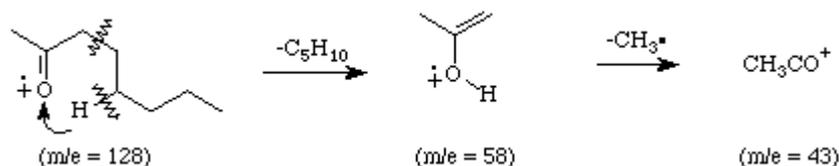
- Cicloversione di Diels-Alder; generalmente sistemi ciclici insaturi a sei termini possono dare una reazione di Diels-Alder inversa, con formazione di un alchene (dienofilo) e di un catione radicale (diene).

*Es.*



- trasposizione di McLafferty; questo riarrangiamento è tipico dei chetoni, degli acidi e degli esteri alifatici. L'idrogeno migrante si deve trovare sull'atomo in  $\gamma$  rispetto a quello portante l'eteroatomo, in modo che si possa avere uno stato di transizione ciclico a sei membri.

*Es.*



**NB.** È possibile riconoscere una scissione multipla da una frammentazione classica.

Scissione classica:  $M^+$  pari  $\rightarrow$  frammentazione dispari (e viceversa)

Riarrangiamento:  $M^+$  pari  $\rightarrow$  frammentazione pari

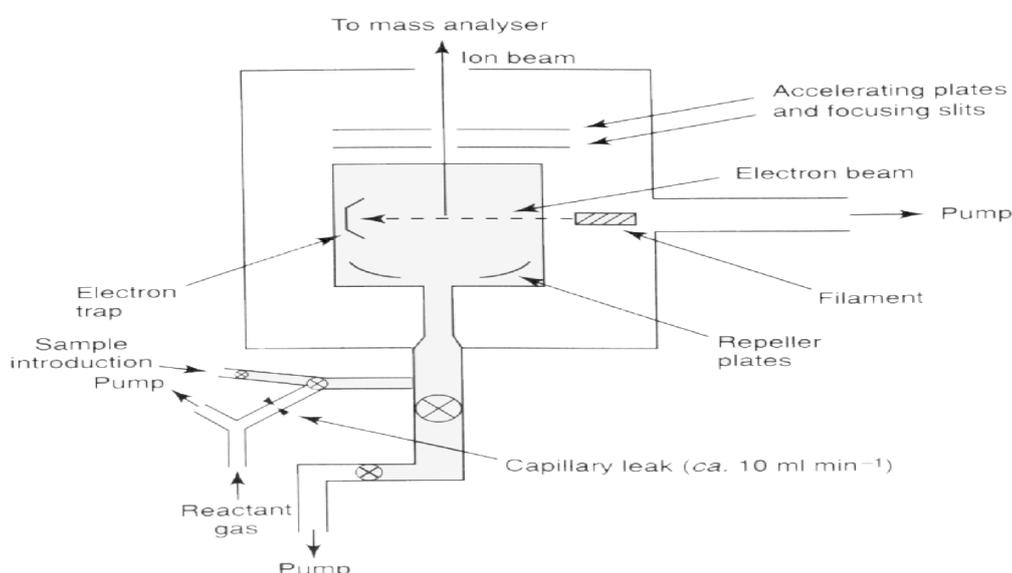
## 7. SORGENTI DI IONIZZAZIONE ALTERNATIVE

Esistono numerose sorgenti di ionizzazione diverse che hanno un vasto impiego nel campo farmaceutico. L'insieme di tutte queste tecniche è in grado di coprire tutte le esigenze richieste.

Gli apparecchi hanno un enorme spettro e gamma di ionizzazione in quanto le sorgenti sono interconvertibili.

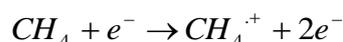
## CHEMICAL IONIZATION (C.I.)

La ionizzazione chimica utilizza una sorgente ad impatto elettronico, ma determina una piccola frammentazione del campione, dando luogo a spettri più chiari. E' particolarmente vantaggiosa nella determinazione delle masse molecolari, dal momento che vengono prodotti ioni molecolari o pseudomolecolari con elevata intensità. Essa si basa su fenomeni chimici e non fisici, non abbiamo elettroni ad alta velocità ma dei reagenti chimici che realizzano la ionizzazione.

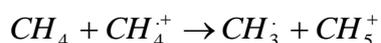


La struttura della sorgente è essenzialmente la stessa usata in E.I., ma la camera viene riempita da un gas idoneo, ad esempio metano, in concentrazione elevata ed inoltre si lavora a pressione più bassa, fino ad 1 torr.

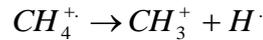
La formazione di ioni per impatto elettrico a partire dal metano origine specie  $CH_4^+$ :



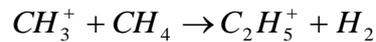
Lo ione molecolare del metano può reagire con l'eccesso di metano formando  $CH_5^+$ :



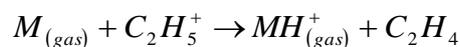
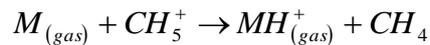
oppure subire una frammentazione e dividersi in catione metile e radicale idrogeno:



Lo ione metile può impattare col metano e formare un etilene protonato  $C_2H_5^+$  liberando idrogeno



Le specie formate nei due percorsi  $CH_5^+$  e  $C_2H_5^+$  sono acidi fortissimi, possono quindi protonare con una reazione acido-base, praticamente qualsiasi molecola organica che viene introdotta nella camera. L'impatto di una molecola gassosa ( $M_{(gas)}$ ) con una delle due specie protonate, provoca il trasferimento di un protone e genera uno ione  $MH^+$  detto pseudomolecolare molto più stabile dello ione molecolare  $H^+$  per cui la sua frammentazione risulta essere molto scarsa:



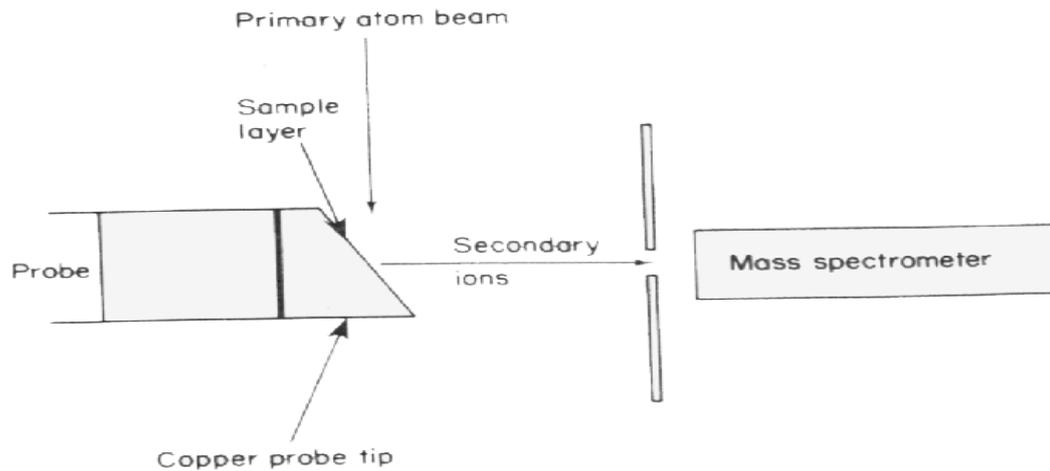
Per questo motivo lo spettro risultante è molto chiaro e possiamo distinguere nettamente il picco molecolare; questa tecnica, infatti, accompagna spesso quella dell' E.I. in cui non è sempre presente il segnale relativo a questo picco.

### **FAST ATOM BOMBARDMENT (F.A.B.)**

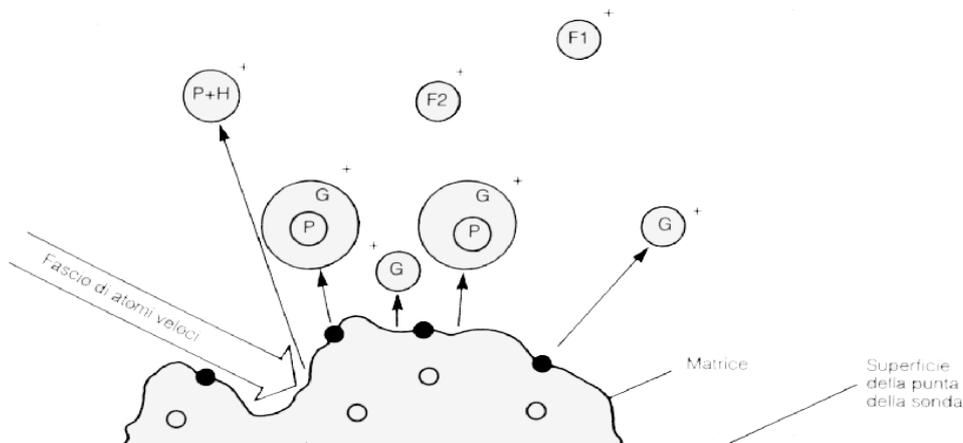
L'avvento del metodo di ionizzazione **F.A.B.** ha rivoluzionato la spettrometria di massa, rendendola utilizzabile nella ricerca biologica (1981). Questa tecnica si basa sul bombardamento con atomi veloci, a differenza delle altre tecniche non utilizza elettroni e neanche una camera riempita di gas e le pressioni utilizzate sono bassissime. Un importante vantaggio per lo studio di campioni biologici è che questi possono essere introdotti nel fascio ionizzante di atomi neutri in soluzione. Questa soluzione è miscelata con una matrice viscosa e poco volatile, come glicerolo (GLY), tioglicerolo (THIOGLY), nitrobenzil alcol (NBA), ammina (DEA).

Queste matrici sono solventi viscosi che solubilizzano bene composti ad alta o media polarità (per sostanze a bassa polarità e di piccole dimensioni si usano EI e CI)

La tecnica FAB risolve il problema degli ioni e il problema delle sostanze funzionalizzate ad alto peso molecolare, molto polari e poco volatili per cui risulta del tutto complementare alle tecniche precedenti.



La miscela (analita-matrice) posta su una sonda opportuna, viene introdotta nella camera della sorgente, dove viene fatto il vuoto e dove viene bombardata con una pistola che spara atomi neutri che si muovono ad alta velocità (atomi pesanti come xenon e ioni cesio). L'impatto degli atomi contro la miscela crea un fenomeno di superficie cioè gli atomi impattano sulle superfici e proiettano via molecole di miscela (e come se volatilizzassimo poche molecole alla volta).



Un altro vantaggio derivato dall'utilizzo di matrici liquide e la cui mobilità determina un continuo ricambio della superficie che viene bombardata.

Gli ioni vengono prima solvatati dalle molecole della matrici limitando il fenomeno della frammentazione. Secondo una valida teoria che cerca di spiegare il processo di ionizzazione, si verifica un elevato innalzamento della temperatura, per un breve periodo, troppo breve per causare la rottura dei legami chimici ma sufficientemente alto da permettere la ionizzazione dei composti da analizzare. La successiva frammentazione della sostanza permette di ottenere uno spettro di massa che contiene molte informazioni di tipo strutturale. Possono essere prodotti spettri di massa positivi e negativi.

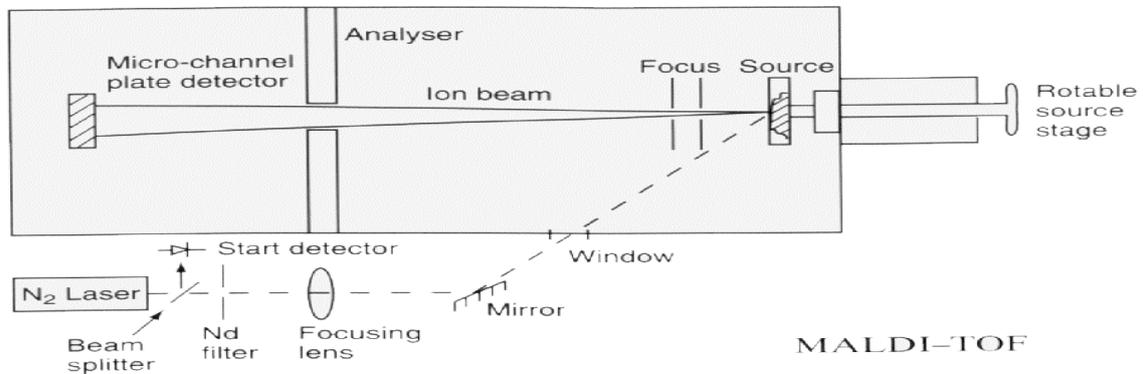
**Vantaggi:**

1. gli ioni possono essere generati da campioni a T ambiente; non è richiesta la volatilizzazione.
2. possono essere prodotte: - molecole  
- quasi molecole  
- frammenti (ioni + o -)
3. una volta ionizzato il campione è attivo per lungo tempo più di 20 minuti e i fasci di corrente sono stabili
4. la sensibilità del campione è alta
5. la tecnica è particolarmente applicabile a biomolecole con alto P.M. (proteine, acidi nucleici, ecc.) e a composti termicamente instabili
6. la sorgente è relativamente semplice, i voltaggi richiesti sono inferiori a 10 KV

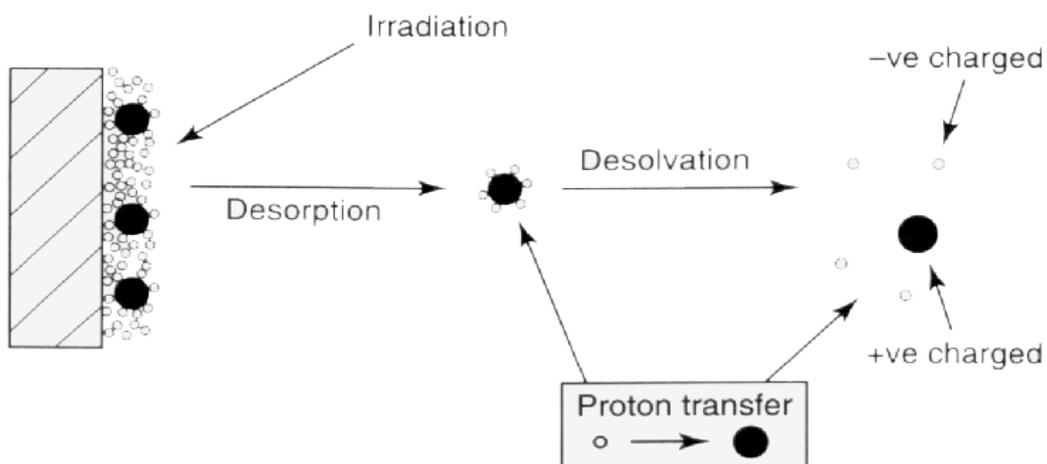
**MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION IONISATION (M.A.L.D.I.)**

Questa tecnica è basata essenzialmente sulla ionizzazione per desorbimento con laser. Concettualmente molto simile al FAB, infatti anche in questa tecnica gli analiti sono associati a matrici. La differenza consiste nel processo di allontanamento dello ione della matrice; mentre nel FAB avviene in seguito ad un bombardamento con atomi veloci, nella MALDI è l'irradiazione con laser che permette ad un numero più ristretto di molecole posta sulla superficie delle matrici di essere proiettata ad alte velocità nell'analizzatore. In genere questa tecnica viene associata a spettrometri basati sul principio del tempo di volo

(Time of Flight, T.O.F.). Il TOF invece di operare una deflessione magnetica, opera un'accelerazione lineare che può essere monitorata e studiata.



Questo tipo di spettrometro separa gli ioni in base al tempo necessario per compiere un determinato percorso. All'uscita dal campo elettrico, gli ioni possiedono la stessa energia cinetica, ma una diversa velocità a seconda del rapporto  $m/z$ . Lasciandoli correre perciò in una regione libera da campi (un tubo sotto vuoto spinto) essi raggiungeranno il rivelatore in tempi diversi. Il tempo di volo è quindi, inversamente proporzionale alla massa.



Il campione è dissolto in un'adatta matrice solvente.

- Irradiazione mediante laser delle molecole della miscela (matrice - analita).
- Espulsione di un aggregato di analita solvatato dalle molecole di matrice.

- c) Desolvatazione con conseguente trasferimento di un protone (reazione acido-base tra matrice e analita).

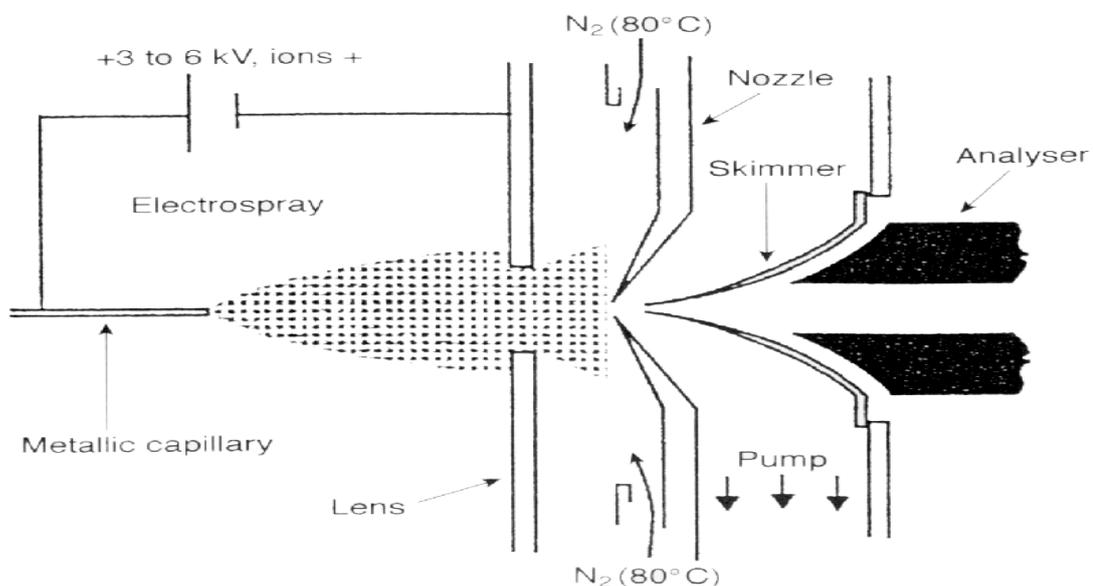
Il processo ora può andare in due direzioni potremo analizzare molecole cariche positivamente o negativamente a seconda del processo avvenuto. In genere si ha il trasferimento di un protone dalla matrice all'analita ; come nella tecnica FAB anche nella tecnica MALDI il processo di osservazione in modo positivo è quello più frequente.

### **ELECTROSPRAY (E.S.)**

Si tratta di una sorgente di ionizzazione che utilizza un gas inerte (di solito azoto) per provocare un processo di nebulizzazione.

Le due caratteristiche essenziali dell'ES sono:

- la ionizzazione si verifica a pressione atmosferica
- sulla specie molecolare si può depositare una carica multipla



Questo processo avviene in soluzioni (metanolo e acqua), che vengono poi nebulizzate in una camera a cui è applicato un campo elettrico (ottenuto applicando una differenza di potenziale di 3.6 KV). La nebulizzazione comporta la formazione di piccole goccioline di solvente che contengono delle specie ionizzate( analita carico). La ionizzazione di solito è spontanea, ma può essere indotta con l'aggiunta di reagenti adatti. Nella sorgente il gas fluisce a bassa velocità per facilitare l'evaporazione del solvente, questo permette di trattare

anche composti termicamente labili. Man mano che il solvente contenuto nelle goccioline evapora, queste si rimpiccioliscono fino a che la repulsione elettrica, aumentata a causa della forte densità elettrica, supera la tensione superficiale della goccia; a questo punto la gocciolina “scoppia”, creando una corrente di ioni nudi che vengono poi indirizzati da un gradiente di campo verso l’analizzatore. Una caratteristica peculiare di questa tecnica di ionizzazione è di essere capace di provocare la formazione di **specie multicarica**. Ricordando l’equazione della spettrometria di massa:

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2}{2v}$$

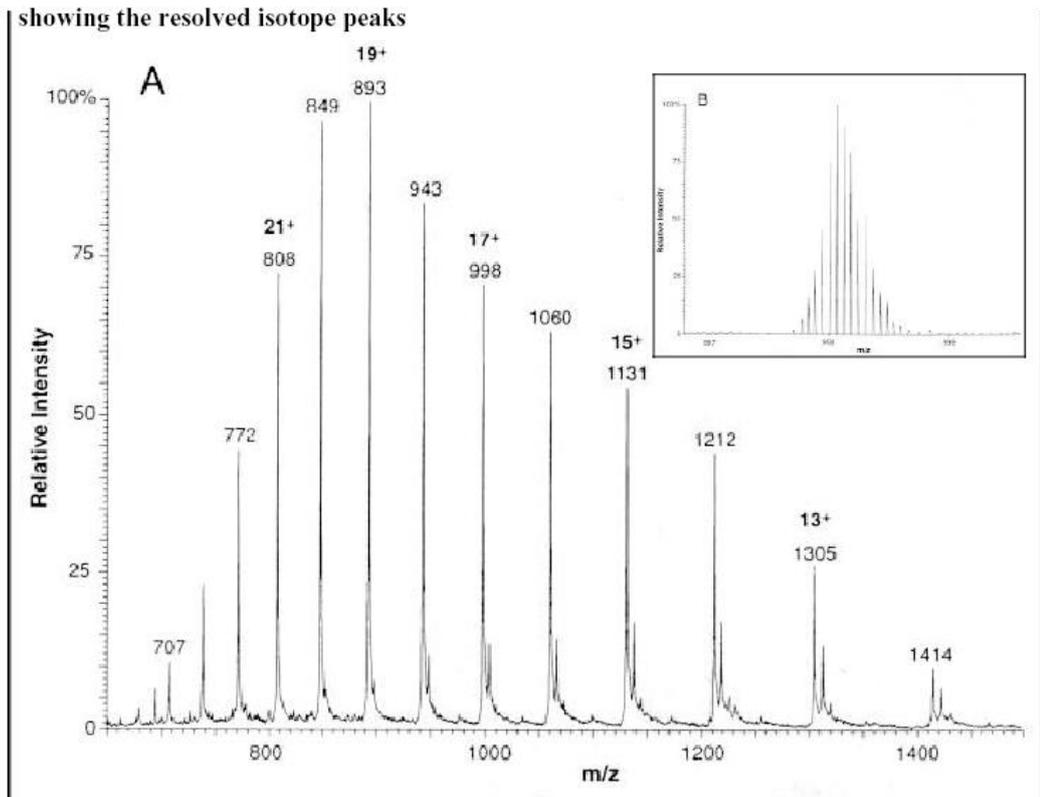
nelle tecniche precedenti  $z$  era sempre uguale ad 1, mentre nella tecnica ESI è possibile variare anche la carica ( $z$ ), per cui se voglio osservare molecole molto grandi vado a favorire le specie poliariche.

Un analizzatore funziona sul principio di separare le specie secondo il loro rapporto  $m/z$ . Se la specie è poliarica, dal punto di vista dello spettrometro di massa si comporta come una specie “a massa più bassa”. In questo caso il rapporto  $m/z$  non sarà uguale a 1.

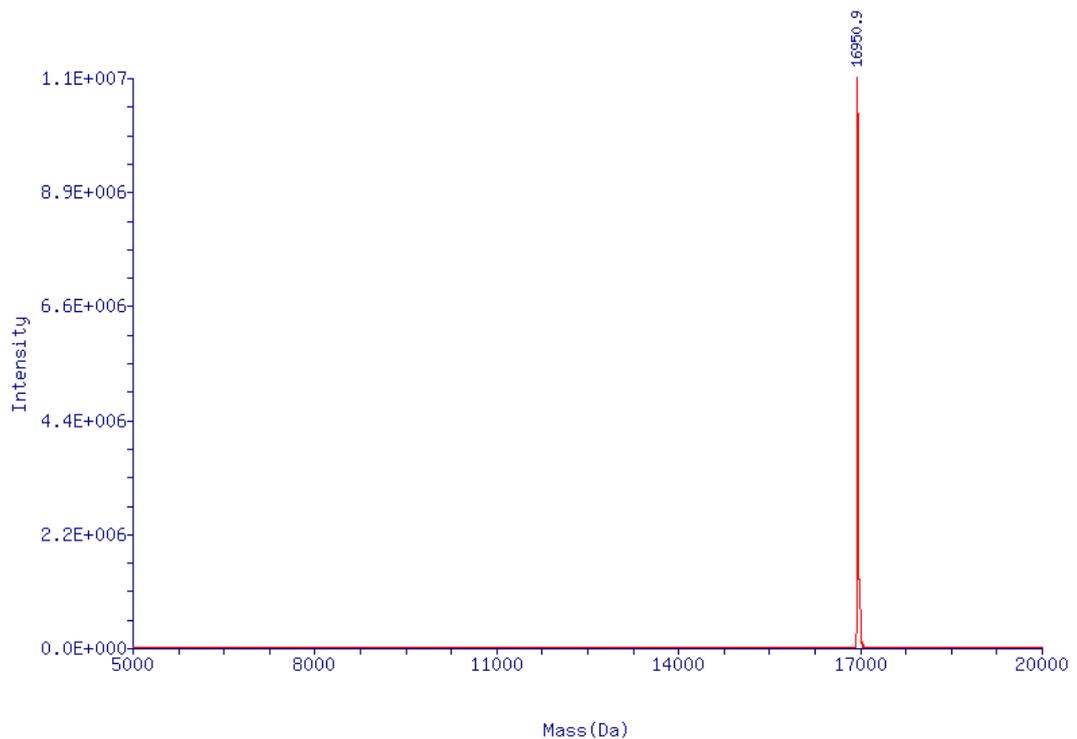
Con  $z = 1$  lo spettro è effettivamente lo spettro di massa. La velocità alla quale vengono accelerati gli ioni dipende esclusivamente dalla loro carica complessiva e dalla forza di accelerazione. Il momento di uno ione è dato dal prodotto della sua massa per la sua velocità. Di conseguenza, a parità di forza di accelerazione, maggiore è il numero di cariche, maggiore sarà anche la velocità raggiungibile. Inoltre, all’aumentare di  $z$ , il rapporto  $m/z$  diminuisce e quindi in queste condizioni possono essere analizzate specie a massa maggiore.

Lo spettro ESI si presenta come una distribuzione di picchi tutti derivanti dalla stessa molecola, dove  $m_1$  e  $m_2$  sono i valori di  $m/z$  (corrispondenti ai picchi dello spettro) per due diversi ioni aventi la stessa natura chimica ma con cariche multiple diverse.

Nello spettro della mioglobina, mostratosotto, si vede chiaramente la distribuzione gaussiana degli ioni multicarica ed i corrispondenti valori di  $m/z$ .



Spettro ESI della mioglobina da cuore di cavallo (PM: 16950.7)



Deconvoluzione dello spettro ESI multicarica della mioglobina.

Successivamente lo spettro multicarica viene trasformato matematicamente (deconvoluzione) dal computer per generare lo spettro “deconvoluto”, in cui appare il valore del PM della proteina.

## **ANALIZZATORI**

L'analizzatore è quel settore dello spettrometro di massa in cui avviene la selezione degli ioni, formati nella sorgente di ionizzazione, sulla base del rapporto  $m/z$ . Gli ioni con differente  $m/z$  arriveranno al rivelatore in tempi diversi, aparendo nello spettro a valori differenti. Così come per le sorgenti di ionizzazione, la tecnologia in questo settore ha sviluppato vari tipi di analizzatori, dotati di caratteristiche diverse, ma con performance sempre maggiori.

Gli analizzatori possono essere classificati in base al modo in cui effettuano la selezione ionica in:

- 1) Analizzatori a deflessione magnetica.
- 2) Analizzatori a quadrupolo
- 3) Analizzatori a trappola ionica
- 4) Analizzatori a tempo di volo (TOF)
- 5) Analizzatori a risonanza ciclotronica ionica (FT ICR)

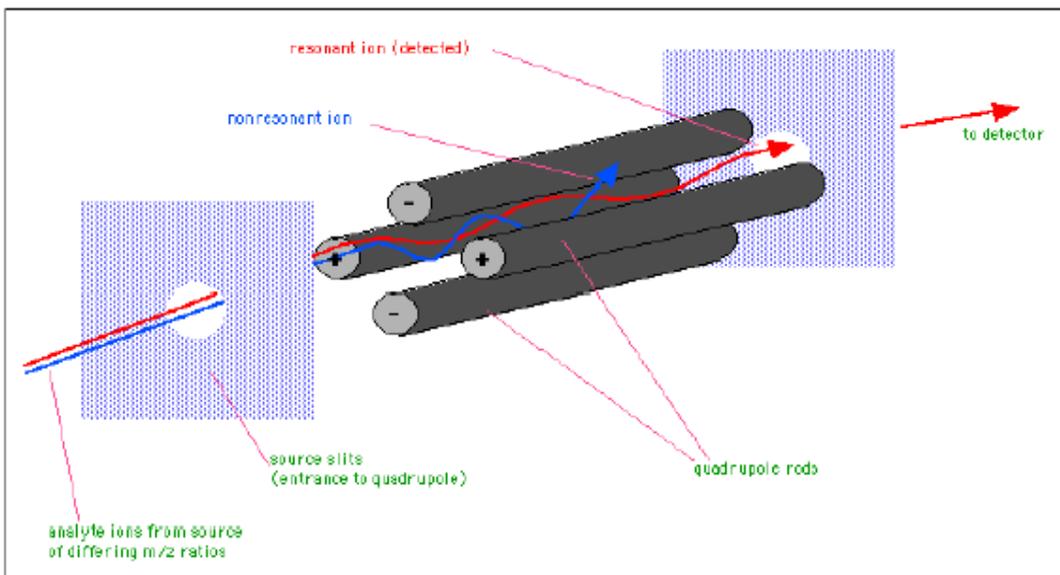
### **Deflessione magnetica.**

Negli analizzatori a focalizzazione magnetica si parla di settori a singola focalizzazione quando l'analizzatore sfrutta il solo campo magnetico per effettuare la selezione degli ioni in base al rapporto  $m/z$ . Questi strumenti non riescono a raggiungere un'elevata risoluzione (circa 4-5000). Invece gli analizzatori a doppia focalizzazione sono composti da un settore elettrostatico, all'interno del quale gli ioni provenienti dalla sorgente sono focalizzati in base alla loro energia traslazionale, e dal settore magnetico, in cui gli ioni sono separati in base al rapporto  $m/z$ . Essendo stati gli ioni focalizzati nel settore elettrostatico, ciò vuol dire che ioni con stesso rapporto  $m/z$  hanno la stessa energia traslazionale: per tale motivo questi analizzatori sono definiti ad alta risoluzione (circa 150.000). A pag. 5 è mostrato lo schema di un

analizzatore magnetico a doppia focalizzazione e ne è descritto dettagliatamente il funzionamento.

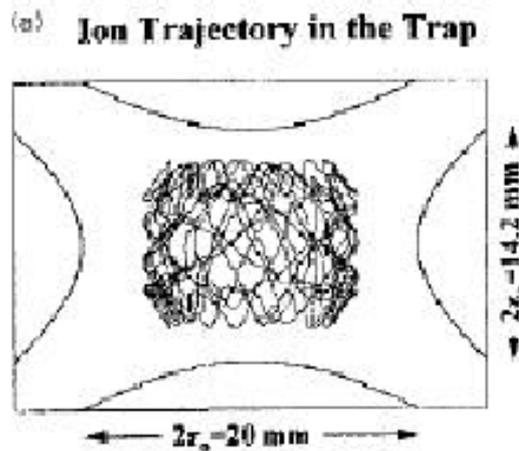
### **Quadrupolo.**

L'analizzatore quadrupolare è schematicamente costituito da quattro barre di metallo (v. figura sotto). Alle barre opposte del quadrupolo è applicata una differenza di potenziale, generata da una corrente continua ed alternata. Gli ioni, a causa di tale differenza, subiranno nel loro transito delle oscillazioni, che potranno essere stabili, permettendo così allo ione di uscire dal quadrupolo, o instabili e porteranno alla collisione dello ione con le barre del quadrupolo. A determinati valori della tensione applicata, solo ioni aventi un certo rapporto  $m/z$  usciranno dal quadrupolo stesso. Variando nel tempo la tensione applicata, tutti gli ioni saranno messi in condizione di uscire (a tempi diversi) dal quadrupolo. La risoluzione di questi analizzatori generalmente è nell'ordine di 5-10.000).



### Trappola ionica (ion trap).

È un analizzatore simile a quello quadrupolare, ma in esso il filtro quadrupolare è sferico e trattiene tutti gli ioni generati, i quali poi vengono rilasciati progressivamente verso il rivelatore, variando il campo elettrico. Il potere risolutivo di tali analizzatori è tra  $10^3$  e  $10^4$ .



### Tempo di volo (TOF)

Il principio su cui si basa questo analizzatore è che ioni di differente valore  $m/z$  hanno uguale energia cinetica ( $1/2 mv^2$ ), ma differente velocità dopo l'accelerazione subita nella camera di ionizzazione. Ne deriva che il tempo che ciascuno impiega ad attraversare l'analizzatore è differente:  **$t = a(m/z)^{1/2} + b$** .

In pratica, gli ioni provenienti dalla sorgente, vengono accelerati da un forte campo elettrico, e percorrono l'analizzatore, che ha la forma di un tubo in cui è fatto un alto vuoto, in base alla velocità dovuta alla loro energia cinetica. Così gli ioni che hanno il rapporto  $m/z$  minore arriveranno al rivelatore prima di quelli più pesanti.

Questo analizzatore, a differenza degli altri, riesce a coprire un'ampia regione spettrale ed ha un'alta sensibilità. (v. figura succ.) Il potere risolutivo, che fino a pochi anni fa rappresentava il punto debole di questi analizzatori, può raggiungere anche valori nell'ordine di  $10^4$  (reflectron TOF).

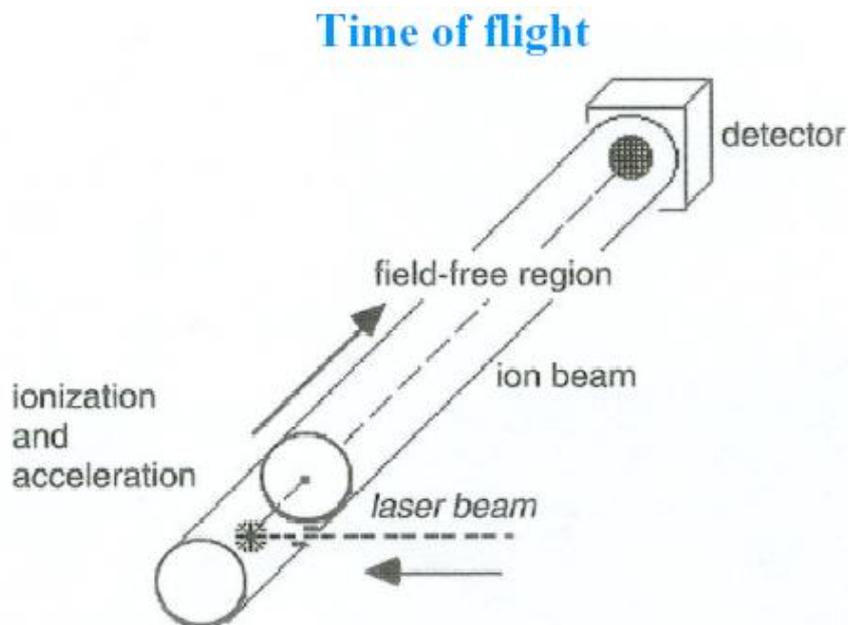
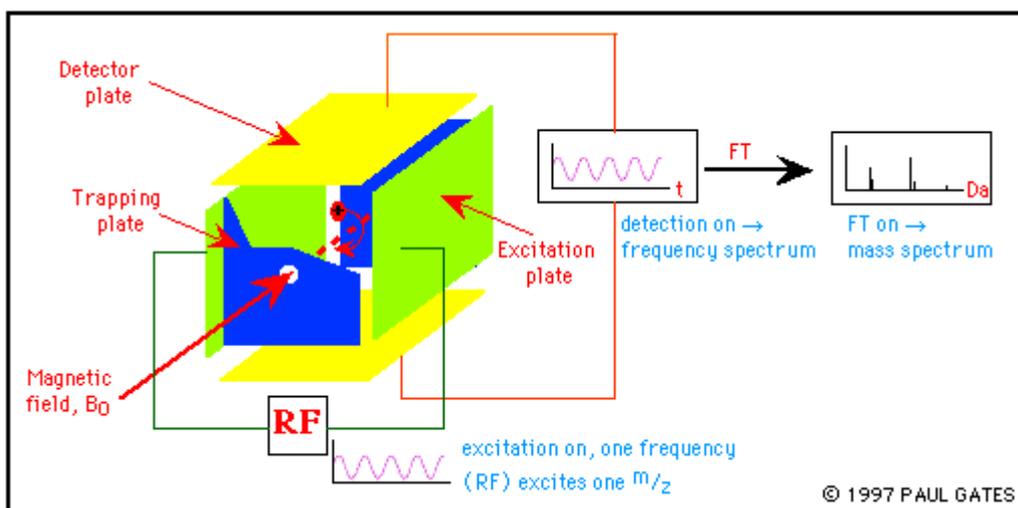


Figure 2.9 Time-of-flight mass analyzer.

### Risonanza ciclotronica ionica (FT ICR)

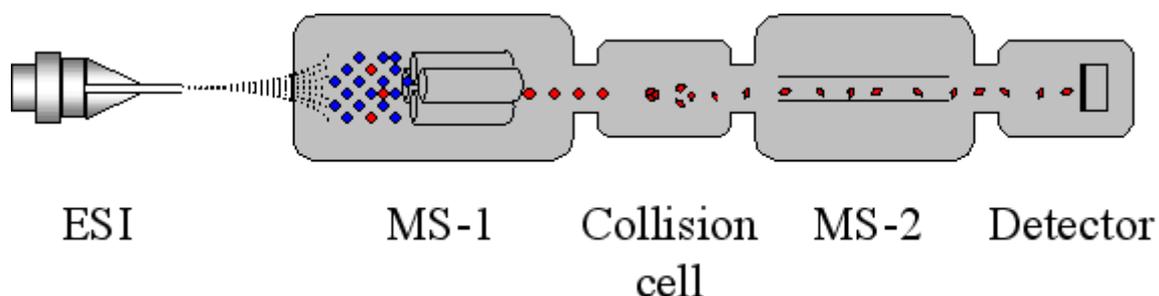
Gli ioni generati in una sorgente, vengono intrappolati in una cella cubica in cui per opera di un campo magnetico elevatissimo (criomagnetri: 4-12 Tesla) unitamente ad un campo elettrico, assumono un'orbita elicoidale con frequenza dipendente dal rapporto  $m/z$ . Quest'analizzatore è in questo momento al top della tecnologia, ad alta sensibilità, accuratezza e potere risolutivo elevatissimo ( $10^5$ - $10^7$ ).



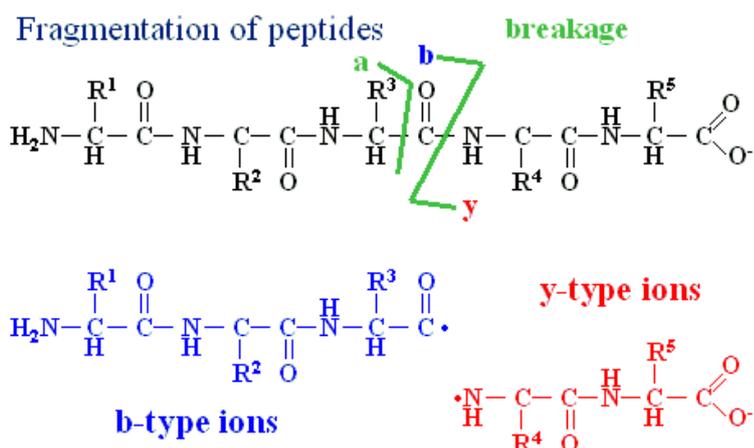
## Spettrometria di massa TANDEM (MS/MS).

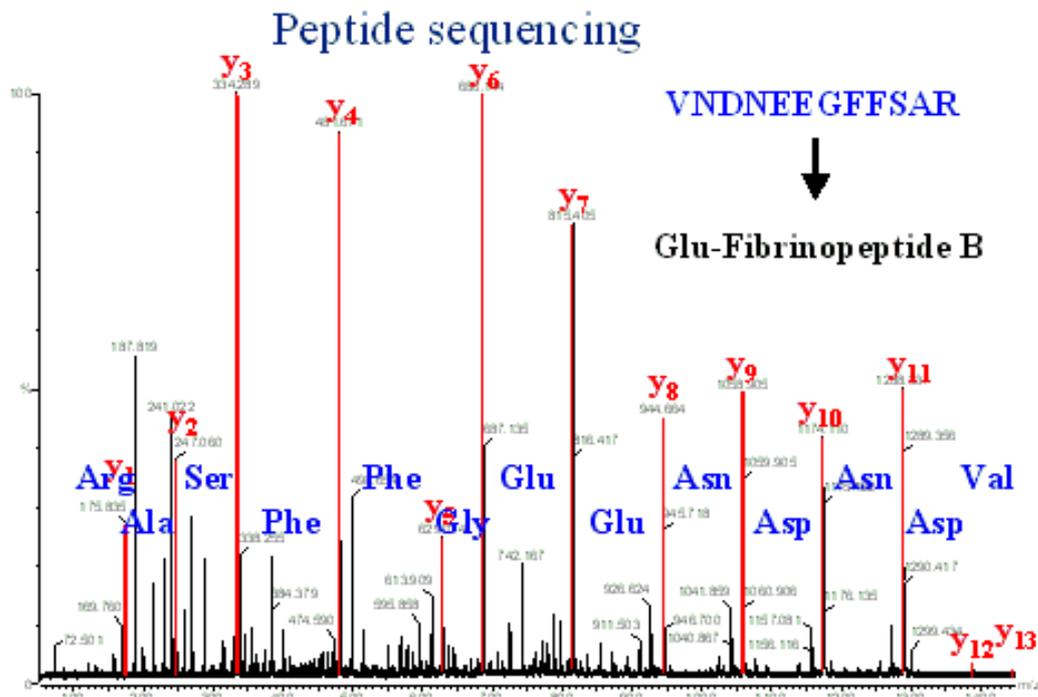
LA spettrometria di massa tandem è utile alla determinazione strutturale di molecole. Uno spettrometro tandem è costituito da due analizzatori disposti in serie. Il primo analizzatore (MS1) ha la funzione di selezionare (filtrare) tra i vari ioni presenti in uno spettro lo ione desiderato. Lo ione selezionato (ione padre o genitore) viene successivamente fatto collidere con un opportuno gas di collisione (He, Ar) in una cella di collisione, e i frammenti (ioni figli), generati dalla dissociazione dello ione molecolare a causa degli urti con il gas, vengono separati dal secondo analizzatore (MS2) in base al loro rapporto  $m/z$ . In questo modo si possono avere informazioni alle volte determinanti per la risoluzione di problemi strutturali.

Un esempio di un sistema tandem è qui riportato:



Questa tecnica è molto utile, ad esempio, per la caratterizzazione della struttura primaria di oligopeptidi, perché consente di avere informazioni sulla composizione aminoacidica. L'analisi dello spettro MS/MS di un peptide consente, sulla base di noti meccanismi di frammentazione, l'interpretazione dei frammenti e l'identificazione della sequenza aminoacidica (v. fig seguenti):





Gli spettrometri Tandem si dicono a geometria ibrida o non ibrida, a seconda che accoppiano due analizzatori diversi o meno. I classici accoppiamenti sono:

Q1-Q<sub>coll</sub>-Q2 doppio quadrupolo + quadrupolo per la collisione

Q-TOF quadrupolo accoppiato con TOF

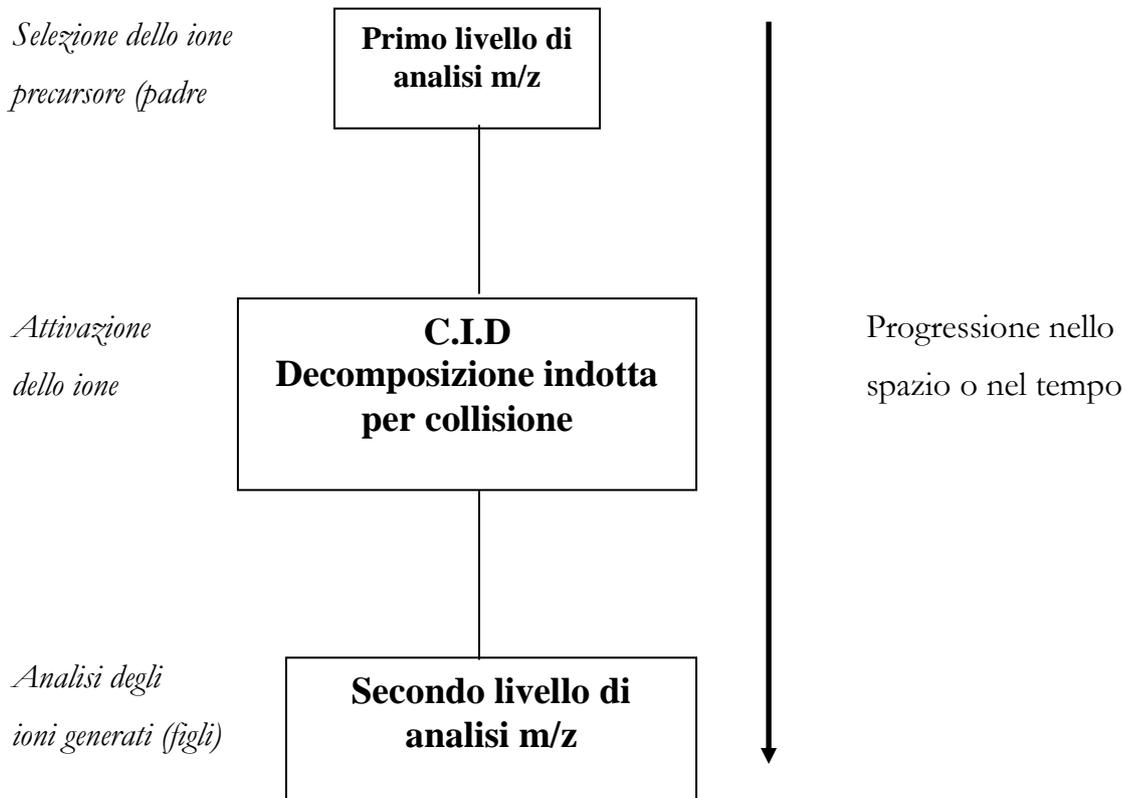
Magnetico/TOF

TOF/TOF

### Trappola ionica

La presenza della trappola ionica (ion trap) tra i sistemi Tandem sembrerebbe strana, essendo un unico analizzatore. In realtà si può immaginare di eseguire un esperimento spettrometrico Tandem con “progressione nello spazio o nel tempo”.  
(v. figura seguente)

## Spettrometria TANDEM



*Progressione nello spazio* significa che la selezione dello ione, la sua dissociazione indotta e l'analisi dei frammenti generati avvengono in spazi diversi (cioè in diversi settori dello spettrometro). *Progressione nel tempo* invece vuol dire che queste operazioni sono fatte nello stesso spazio (l'analizzatore a trappola ionica) ma in tempi successivi. Infatti, nell'ion trap è possibile inizialmente intrappolare tutti gli ioni presenti nello spettro primario, successivamente isolare lo ione desiderato (espellendo gli altri dalla trappola), poi indurre la dissociazione dello ione isolato, e infine analizzare i frammenti generati all'interno della stessa trappola. Con un analizzatore a trappola ionica, con lo stesso schema, si può pensare di isolare uno ione figlio e dissociarlo per studiarne la frammentazione, ottenendo così ioni di seconda generazione. Il processo potrebbe essere ripetuto varie volte. Si parla in questi casi di Tandem MS<sup>n</sup>.