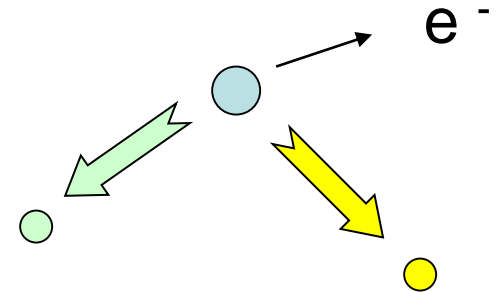


# Spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica di delucidazione strutturale basata sulla ionizzazione di una molecola e sulla sua successiva frammentazione in ioni di diverso rapporto massa/carica ( $M/z$ )

A differenza di altre tecniche spettroscopiche, però, questo è un metodo distruttivo (la molecola non rimane intatta dopo l'analisi), e soprattutto non si basa sull'interazione tra radiazioni e materia.

*Il principio:*



*Una molecola è ionizzata per espulsione di un elettrone.*

Il catione che si forma (*ione molecolare*) in parte si frammenta dando molecole e/o radicali neutri (che lo strumento non rileva), in parte genera cationi e/o radicali cationi (*ioni frammento*).

Lo ione molecolare e i vari ioni che si originano per frammentazione (cationi e radicali cationi) vengono discriminati sulla base del loro rapporto massa/carica e rivelati da un detector.

# Spettrometria di massa

## Le Fasi:

L'esperimento di spettrometria di massa consiste dunque nella:

*ionizzazione* di molecole in fase gassosa

*separazione* dei diversi ioni prodotti

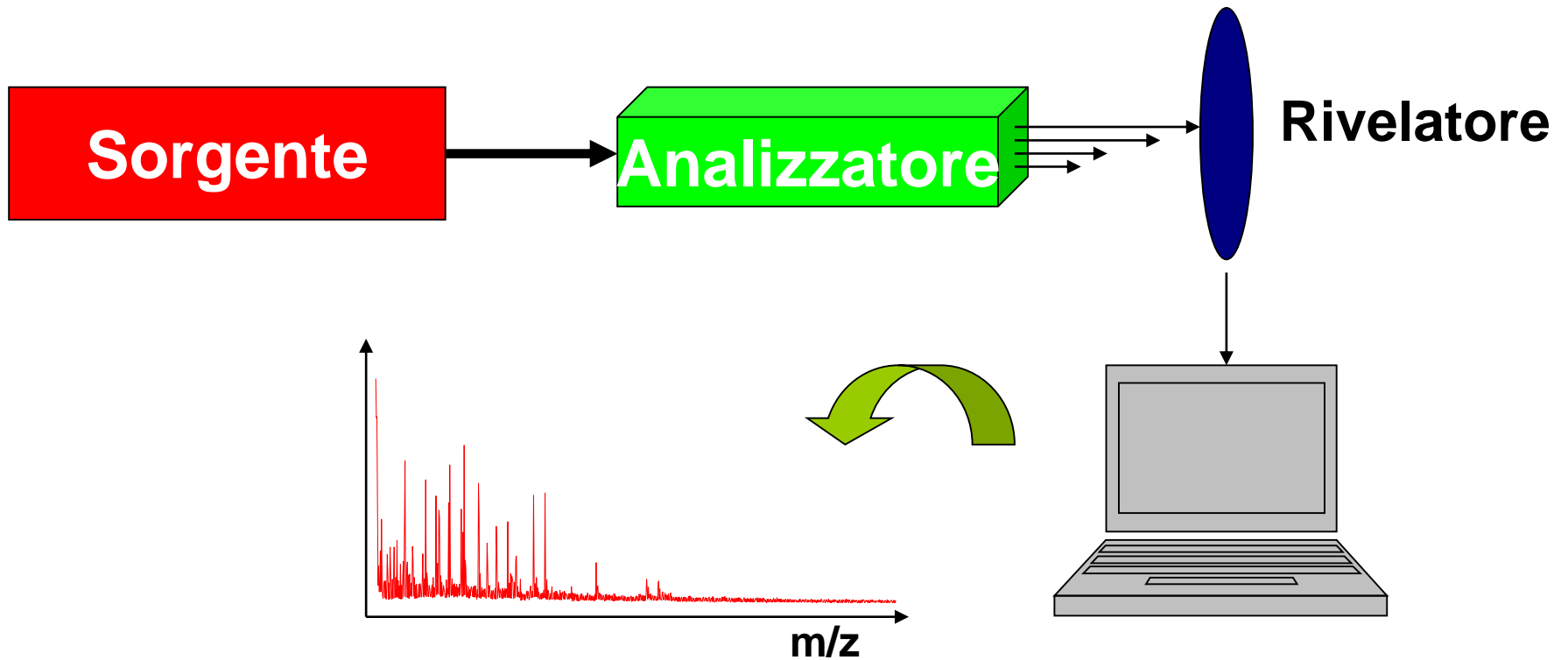
*rivelazione* degli ioni prodotti

## Vantaggi:

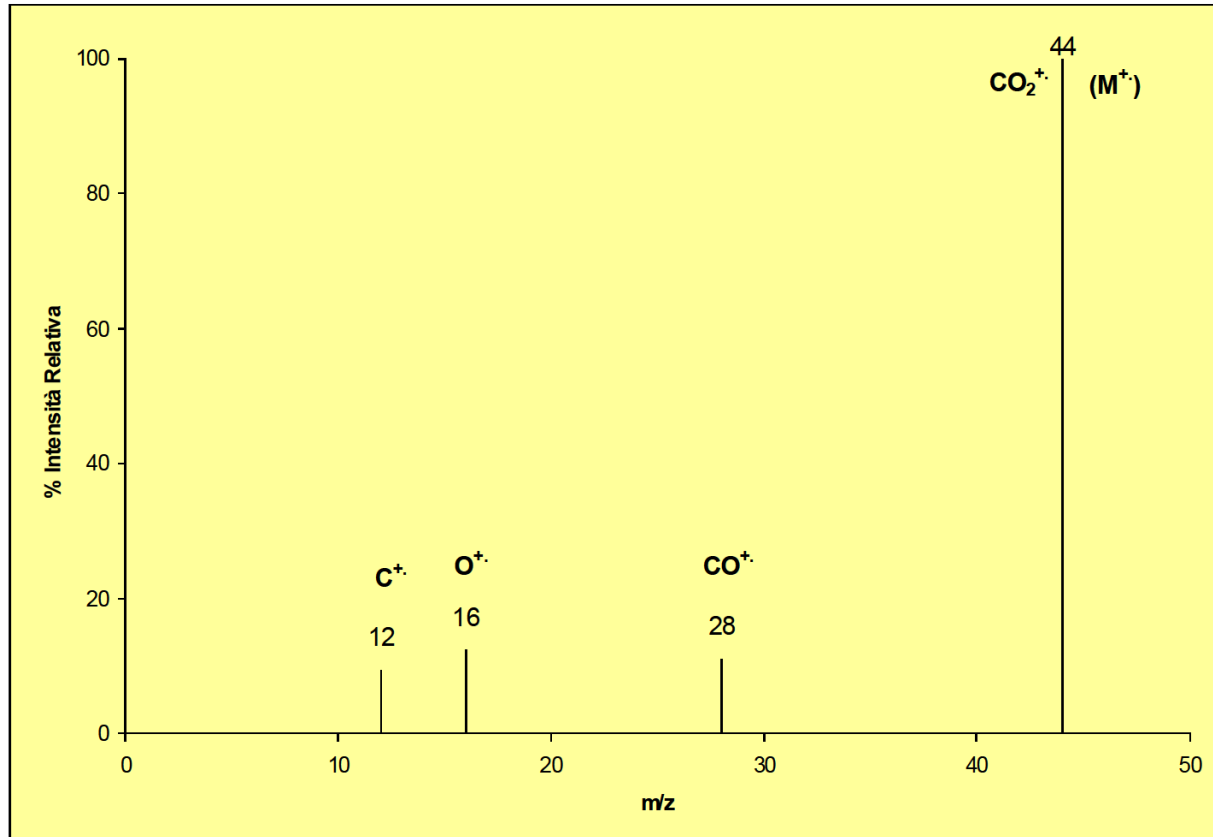
Questa tecnica consente di misurare le masse molecolari (sia nominali che esatte) e di ottenere dei profili di frammentazione che sono specifici per ciascun composto, di cui costituiscono quindi un'impronta digitale.

Si può così individuare la formula di struttura di composti sconosciuti, anche avendone a disposizione piccole quantità.

# Spettrometria di massa



# Spettrometria di massa



# Spettrometria di massa

## Introduzione del campione

L'introduzione del campione nella camera di ionizzazione può essere fatta sia allo stato solido, usando una sonda, che allo stato liquido o gassoso, usando un sistema di valvole che permettono di accedere alla camera di ionizzazione senza che questa venga a contatto con l'esterno.

La quantità di prodotto necessario per registrare uno spettro è dell'ordine dei microgrammi/nanogrammi.

E' possibile utilizzare l'uscita di un sistema GC o HPLC come ingresso dello spettrometro di massa. Queste tecniche, note come GC-MS e HPLC-MS, sono estremamente utili nell'analisi di miscele di prodotti.

# Spettrometria di massa

## Camera di ionizzazione

La camera di ionizzazione è costituita da un cilindro tenuto sotto alto vuoto ( $10^{-6}$  atm); in queste condizioni, ed a opportune temperature, tutti i composti, anche quelli solidi, passano allo stato gassoso.

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.

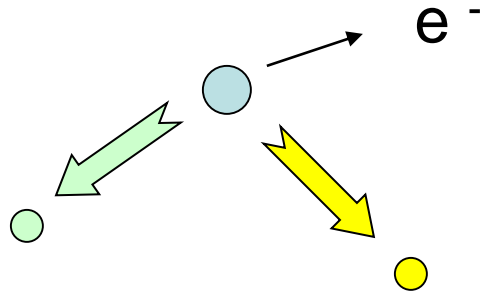
# Spettrometria di massa

## Camera 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, e 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**.



# Spettrometria di massa

## Camera di ionizzazione

Per ionizzare le molecole esistono varie tecniche:

- Espulsione di  $e^-$ :  $M \rightarrow M^{+\cdot} + e^-$
- Protonazione:  $M + H^+ \rightarrow MH^+$
- Cationizzazione:  $M + Cat^+ \rightarrow M Cat^+$
- Deprotonazione:  $MH \rightarrow M^- + H^+$



# Spettrometria di massa

## Sorgenti di ioni

In base al tipo di **sorgente** utilizzata la ionizzazione primaria del campione viene realizzata in vario modo.

Le tecniche più utilizzate sono:

- 1) impatto elettronico (E.I.)
- 2) ionizzazione chimica (C.I.)
- 3) electrospray (E.S.I.)

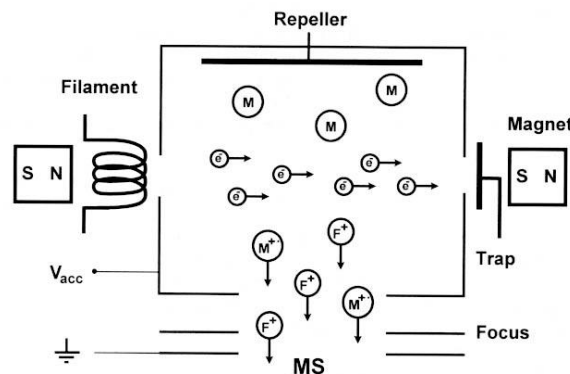
# Spettrometria di massa

## Sorgenti di ioni: *Electronic Impact Ionization (EI)*.

La ionizzazione per impatto elettronico è la tecnica più comune.

Un filamento di tungsteno incandescente emette un fascio di elettroni che, accelerati verso un anodo posto dalla parte opposta al filamento, acquistano un'elevata energia (ca. 70 eV). Quando questi elettroni vengono a contatto con la sfera elettronica di una molecola (impatto elettronico), le trasferiscono la loro energia, provocando l'espulsione di un elettrone con formazione di un **radical catione**.

Tutti i radical cationi sono respinti da una piastra, tenuta ad un potenziale positivo, verso una serie di piastre forate, tenute a potenziale positivo crescente, dette piastre acceleratrici. Nel loro tragitto gli ioni subiscono un'accelerazione proporzionale al potenziale  $V$  delle piastre acceleratrici e vengono espulsi, attraverso una fenditura di uscita, con un'energia cinetica  $\frac{1}{2}mv^2 = zV$  ( $z$  è la carica degli ioni; in genere,  $z = 1$ )



# Spettrometria di massa

## **Sorgenti di ioni: *Chemical Ionization (CI)*.**

La ionizzazione chimica viene utilizzata quando gli ioni molecolari prodotti con il metodo dell'impatto elettronico sono troppo poco stabili e si frammentano completamente.

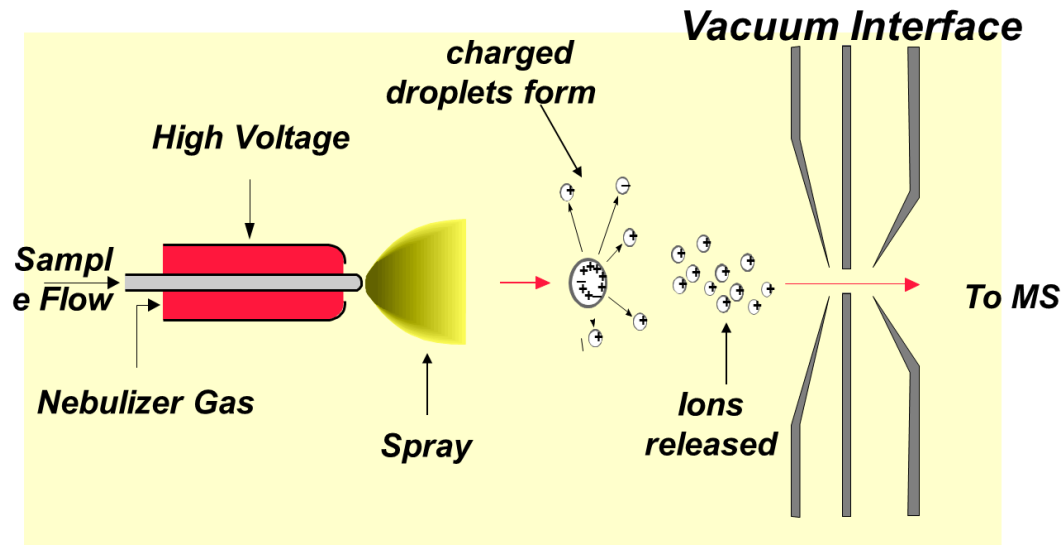
Il metodo consiste nell'introdurre, insieme al campione, del metano in forte eccesso.

Statisticamente sarà il metano ad essere ionizzato per impatto elettronico, generando  $\text{CH}_4^+$ ; questo, incontrando un'altra molecola di  $\text{CH}_4$ , forma  $\text{CH}_3^+$  e  $\text{CH}_5^+$ , che funziona da acido per una molecola organica M generando l'acido coniugato  $\text{MH}^+$ . Questa specie non frammenta. La particolarità è che nello spettro vedremo lo ione molecolare + 1.

# Spettrometria di massa

## Sorgenti di ioni: *Electron Spray Ionisation (ESI)*.

Il campione, sciolto in un solvente polare, è nebulizzato a pressione atmosferica dentro alla camera di ionizzazione attraverso un ago tenuto ad un alto potenziale elettrico. Le goccioline di spray, che si sono caricate positivamente per azione del campo elettrico, vengono attratte verso una "lente di estrazione di ioni", che grossolanamente è costituita da un capillare mantenuto sotto vuoto e a un potenziale negativo; in tal modo il sovente evapora e gli ioni carichi sono accelerati verso l'analizzatore. Questa tecnica di ionizzazione è largamente usata negli strumenti HPLC-MS.



# Spettrometria di massa

## Sorgenti di ioni: *Analizzatore*

L'analizzatore consente di differenziare gli ioni generati in base al loro rapporto massa/carica.

I più comuni sono:

- **L'ANALIZZATORE MAGNETICO**
- L'ANALIZZATORE A DOPPIA FOCALIZZAZIONE
- L'ANALIZZATORE A QUADRUPOLO
- L'ANALIZZATORE A TRAPPOLA IONICA

# Spettrometria di massa

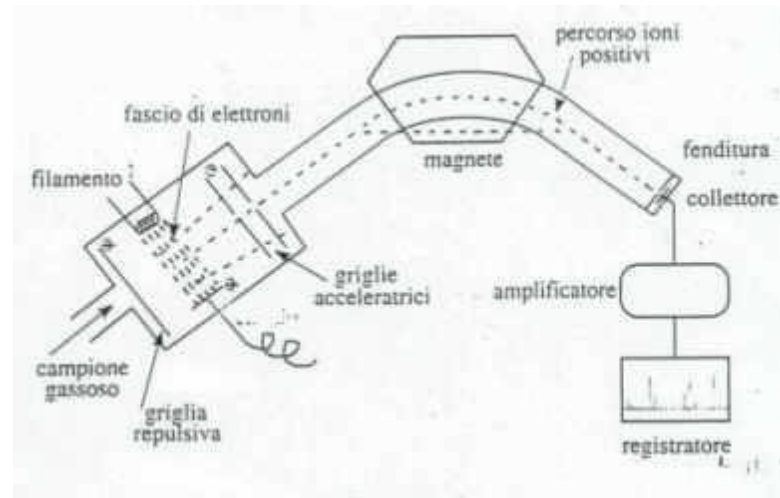
## Sorgenti di ioni: *Analizzatore*

### **Analizzatore magnetico (a tubo).**

E' l'analizzatore più usato, perché consente di ottenere le risoluzioni migliori.

E' costituito da un tubo lungo ca. 1 metro, piegato con un raggio di curvatura  $r$  ed immerso in un campo magnetico  $H$ . Gli ioni che escono dalla camera di ionizzazione entrano nel tubo analizzatore e, per effetto del campo magnetico, subiscono una deviazione dalla loro traiettoria rettilinea (deflessione).

Operando a potenziale  $V$  costante e facendo una scansione di campo  $H$  è possibile fare uscire dal tubo gli ioni a diversa massa in tempi diversi. Gli ioni che escono dal tubo vengono raccolti da un fotomoltiplicatore, che traduce l'intensità degli ioni in corrente elettrica (Rivelatore).



# Spettrometria di massa

## **Sorgenti di ioni: *Rivelatore***

Come collettore e rivelatore degli ioni si usa comunemente un moltiplicatore elettronico, costituito da una serie di elettrodi in cascata.

Quando uno ione arriva sul primo elettrodo questo emette un fascio di elettroni che vanno a colpire il secondo elettrodo, il quale a sua volta emette una quantità maggiore di elettroni e così via.

Il risultato è una forte amplificazione del segnale che viene poi digitalizzato ed elaborato infine dal calcolatore dello spettrometro per la presentazione dello spettro di massa.

Naturalmente nel caso del metodo FTMS il sistema di rivelazione è invece un ricevitore di radiofrequenza, che a sua volta è collegato al calcolatore per l'analisi di Fourier dell'interferogramma, da cui si ottiene lo spettro di massa.

# Spettrometria di massa

## Sorgenti di ioni: *Lo spettro*

Lo spettro di massa si presenta come un insieme di linee verticali (**picchi**) di intensità diversa, ciascuna corrispondente al valore di massa di uno ione frammento.

Il picco a valore di massa più elevato è quello relativo allo **ione molecolare**.

Dallo spettro di massa si può risalire dunque 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:

- identificazione dello ione molecolare.
- identificazione di ioni caratteristici.
- identificazione di processi di frammentazione caratteristici.
- ricostruzione della struttura della molecola sulla base della conoscenza di meccanismi di frammentazione standard



# Spettrometria di massa

## Sorgenti di ioni: *Lo spettro*

### Picco dello ione molecolare

Lo ione molecolare si genera dalla molecola originale M per eliminazione di un elettrone: è un radicale catione contenente un elettrone a spin spaiato, indicato dal simbolo  $M \rightarrow M^{\bullet+} + e^-$

La sua massa è praticamente uguale a quella della molecola originaria, dato che la perdita di massa dovuta all'espulsione dell'elettrone è trascurabile. In pratica, assegnando con certezza il picco dello ione molecolare di una sostanza pura si determina immediatamente la massa molecolare M.

Tuttavia il picco può essere poco intenso o addirittura assente nel caso di molecole facilmente frammentabili (l'intensità del picco dipende dalla stabilità della specie che lo genera).

# Spettrometria di massa

## Sorgenti di ioni: *Lo spettro*

### **Picco dello ione molecolare**

In generale si osserva la seguente graduatoria di intensità per le diverse classi di composti organici:

- Picco molto intenso aromatici > olefine coniugate > alcani a catena lineare corta.
- Picco poco intenso chetoni > ammine > esteri > eteri > acidi, aldeidi, ammidi, alogenuri.
- Picco assente molecole ramificate, alcoli terziari, nitrili, nitrocomposti.

In generale quindi a parità di struttura l'intensità del picco decresce all'aumentare del PM.

In certi casi l'identificazione del picco dello ione molecolare può essere verificata con la cosiddetta REGOLA DELL'AZOTO, secondo cui:

Se la molecola contiene solamente C, H, O, S, Alogeni o un numero pari di atomi di azoto, lo ione molecolare è di massa nominale pari.

Se la molecola contiene un numero dispari di atomi di azoto, la massa nominale dello ione molecolare è dispari.

Lo stesso discorso vale per la massa nominale!

# Spettrometria di massa

## Sorgenti di ioni: *Lo spettro*

### Spettri di massa esatta

Gli spettrometri ad alta risoluzione permettono di determinare la massa con una accuratezza fino alla quarta cifra decimale, ciò che si chiama comunemente la massa esatta. Dato che le masse dei nuclidi non sono intere, la massa molecolare esatta è un parametro che caratterizza univocamente la formula bruta della sostanza.

Es. quattro molecole di massa 44 e differenti formule brute hanno le seguenti masse esatte:

Biossido di carbonio $\text{CO}_2$	$\rightarrow 43.9898$	} $\Delta = 0.0113$
Ossido nitroso $\text{N}_2\text{O}$	$\rightarrow 44.0011$	
Acetaldeide $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$	$\rightarrow 44.0262$	} $\Delta = 0.0251$
Propano $\text{C}_3\text{H}_8$	$\rightarrow 44.0626$	

La differenza minima 0.01 è facilmente misurabile con uno spettrometro avente una risoluzione di almeno  $44/0.01 = 4400$ .

# Spettrometria di massa

## Frammentazioni

Lo ione molecolare è una specie estremamente ricca di energia e, specialmente nel caso di molecole complesse, le sue sorti possono essere diverse.

Lo ione può decomporsi in un'ampia varietà di frammenti che possono subire anch'essi scissione.

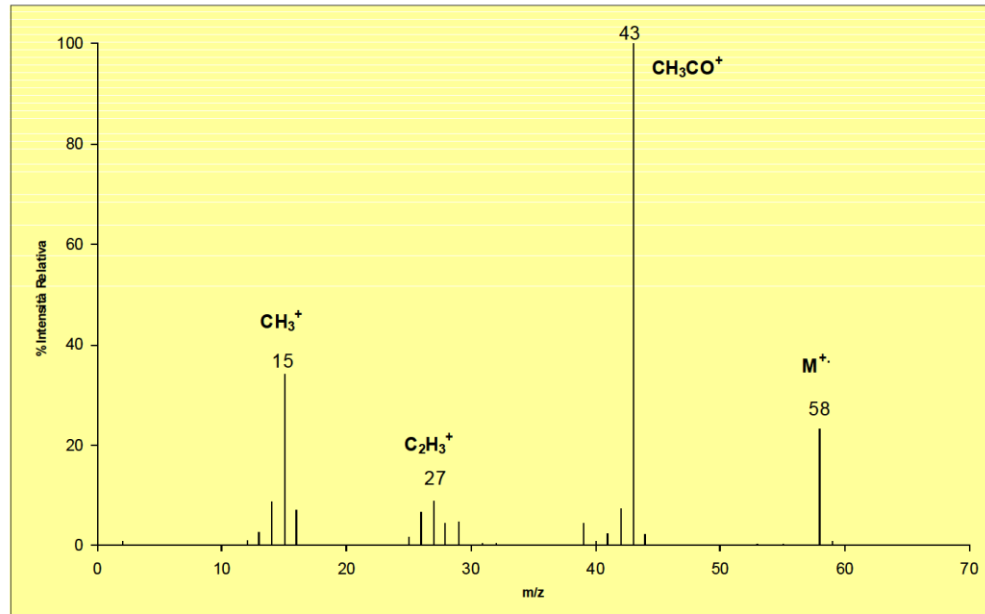
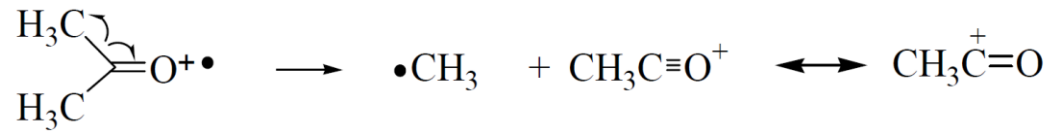
Le principali frammentazioni sono:

- Scissioni primarie (che avvengono sullo ione molecolare)
- Scissioni secondarie (che avvengono sui frammenti)
- Scissioni semplici (che avvengono con rottura di un legame semplice tra i due atomi)
- Scissioni multiple o riarrangiamenti (reazioni di frammentazione con rottura di due legami covalenti)

La scissione di un legame può anche essere omolitica, cioè con separazione dei due elettroni del legame oppure eterolitica senza separazione.

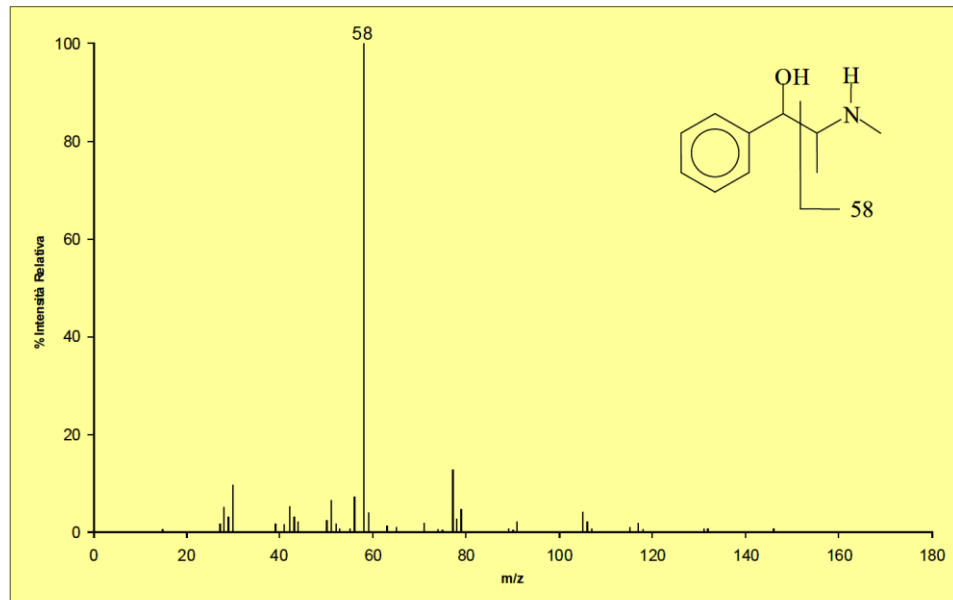
# Spettrometria di massa

## Frammentazioni



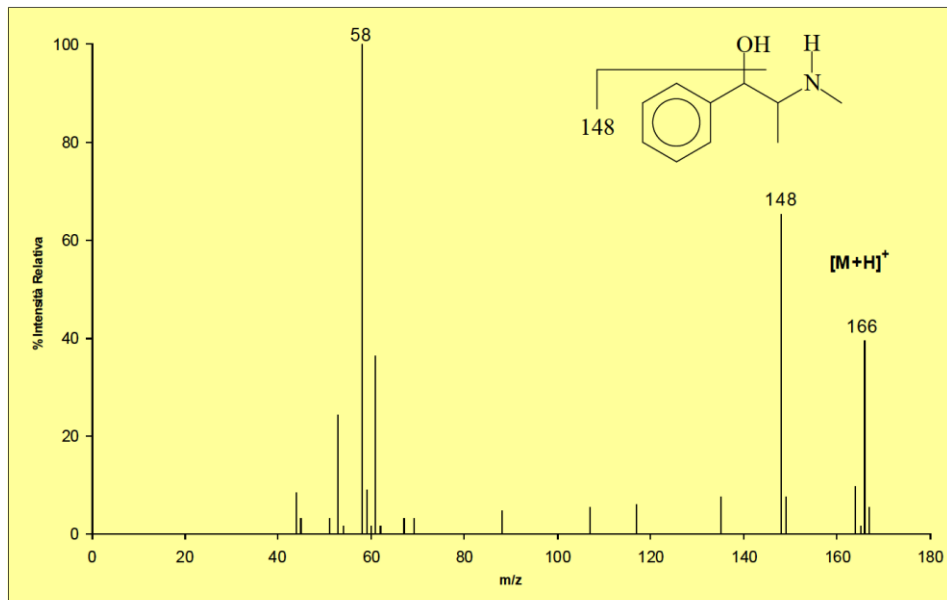
# Spettrometria di massa

Spettro di massa per ionizzazione elettronica dell'efedrina a 70 eV.  
Non si osserva alcun picco dovuto allo ione molecolare ( $m/z$  165).



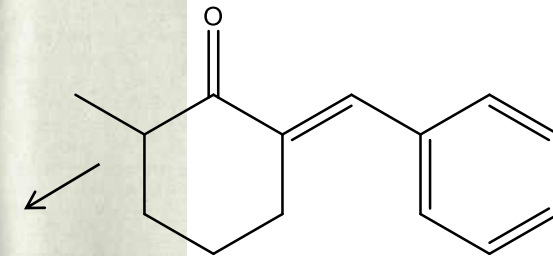
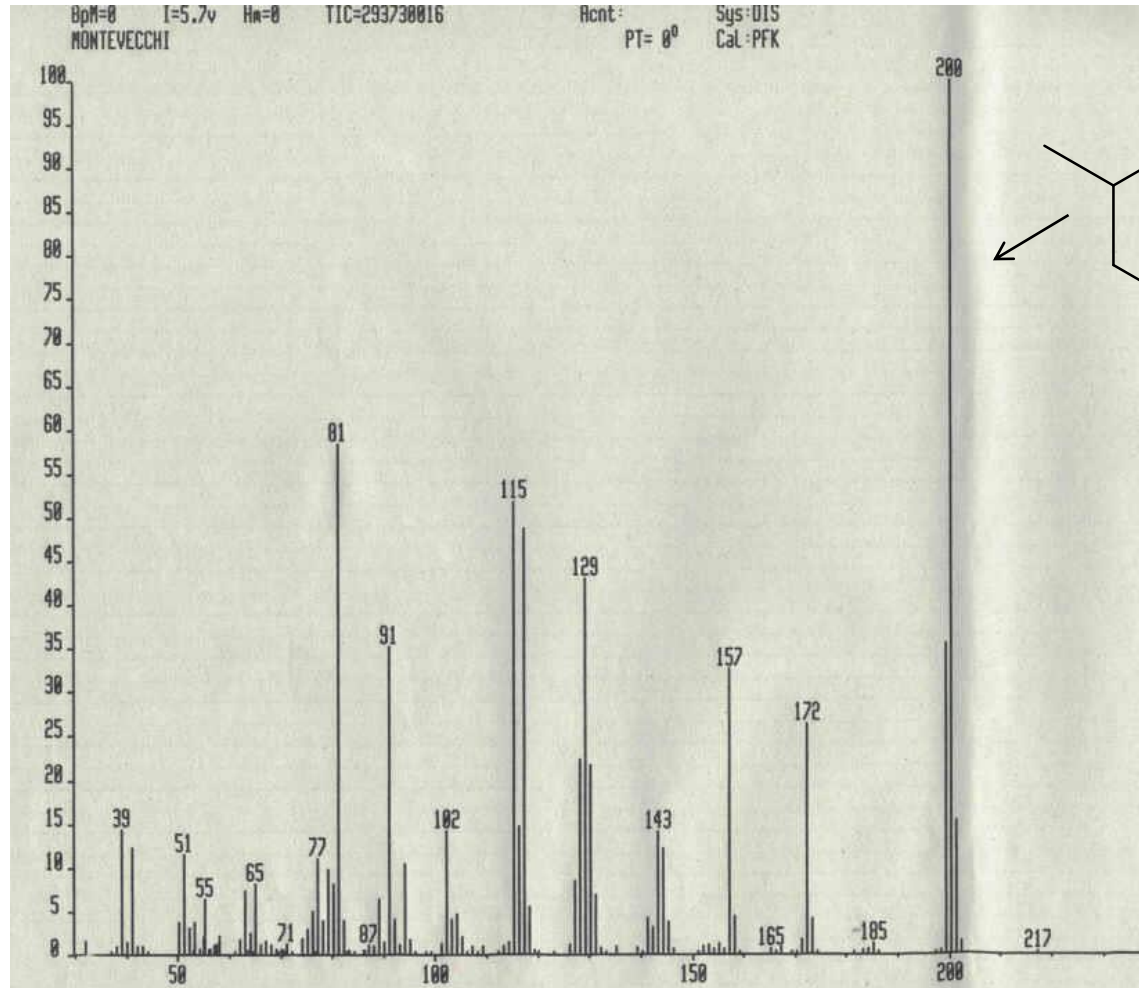
# Spettrometria di massa

Spettro di massa per ionizzazione chimica con metano dell'efedrina.  
Si osserva un intenso picco a  $m/z$  166 attribuibile alla molecola protonata



# Spettrometria di massa

## Sorgenti di ioni: *Lo spettro*

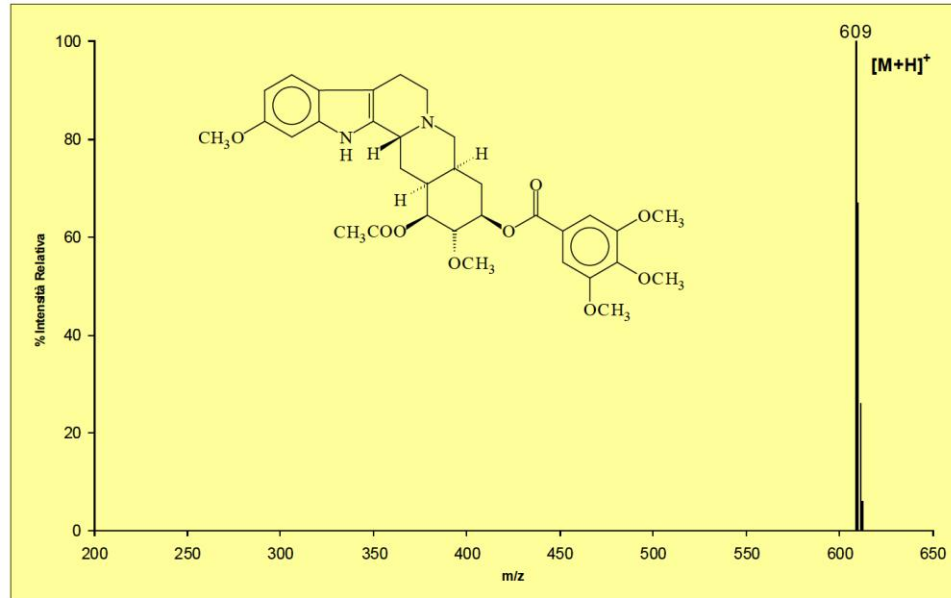


m/z: 200.12 (100.0%),



# Spettrometria di massa

Spettro di massa della reserpine registrato durante un esperimento LC/MS.

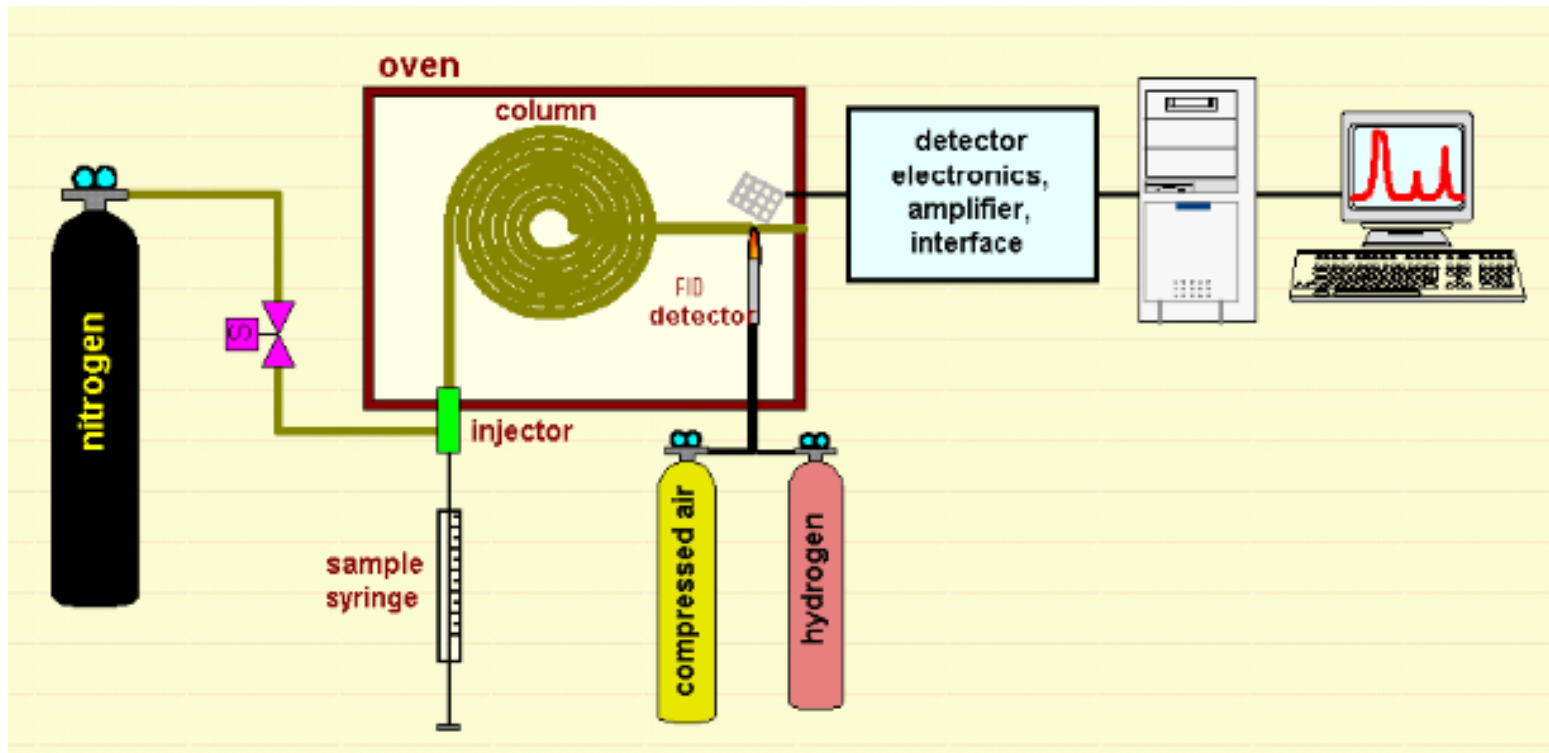


# Cromatografia: Gascromatografia (Gas Chromatography, GC)

Tecnica utilizzata per l'identificazione e quantizzazione di molecole volatili.

Fase mobile: gas di trasporto (carrier, He, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>) che fluisce in una colonna in cui è posta la fase stazionaria.

La separazione dei componenti dipende solo dalla fase stazionaria.

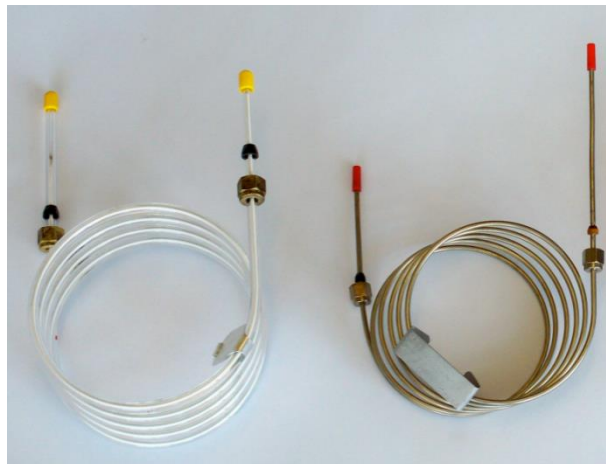


# Cromatografia: Gascromatografia (Gas Chromatography, GC)

## Colonne

Colonne impaccate - lunghezza di 1-2m (anche fino a 10m) e un diametro interno di pochi millimetri. Sono avvolte a spirale, per ridurre l'ingombro. Il materiale più usato per le colonne impaccate è l'acciaio inossidabile; per sostanze molto reattive si usa il vetro.

Sono riempite con un solido di supporto (gel di silice, allumina o carbone) impregnato del liquido (poco volatile) che costituisce la fase stazionaria. La scelta del liquido dipende dai composti da separare. In genere si usa squalano, olio o grasso di silicone, glicoli polietilenici (Carbowax), oli di vaselina o trietanolammina.



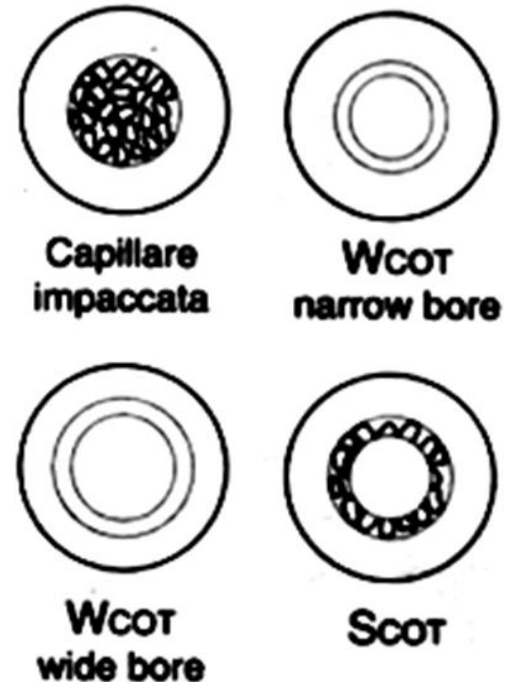
# Cromatografia: Gascromatografia (Gas Chromatography, GC)

## Colonne

Colonne capillari: sottilissimi tubi di silice di diametro inferiore a 0,5 mm e lunghe fino a 150–200 m, avvolte a spirale su un supporto metallico. La fase stazionaria è spalmata in maniera uniforme sulla superficie interna della colonna, dove forma un film di spessore costante tra 0,5 e 2,5  $\mu\text{m}$ .

WCOT (Wall Coated Open Tubular):  
il liquido di ripartizione viene posto direttamente all'interno sotto forma di un sottilissimo microvelo aderente alle pareti della colonna;

SCOT (Support Coated Open Tubular):  
fase stazionaria adsorbita ad un supporto.



In relazione al diametro interno le colonne capillari si classificano in Narrow bore ( 0,25 mm), Wide bore ( 0,53 mm) e Mega bore ( 0,80 mm).

# **Cromatografia: Gascromatografia (Gas Chromatography, GC)**

## **GS-MS**

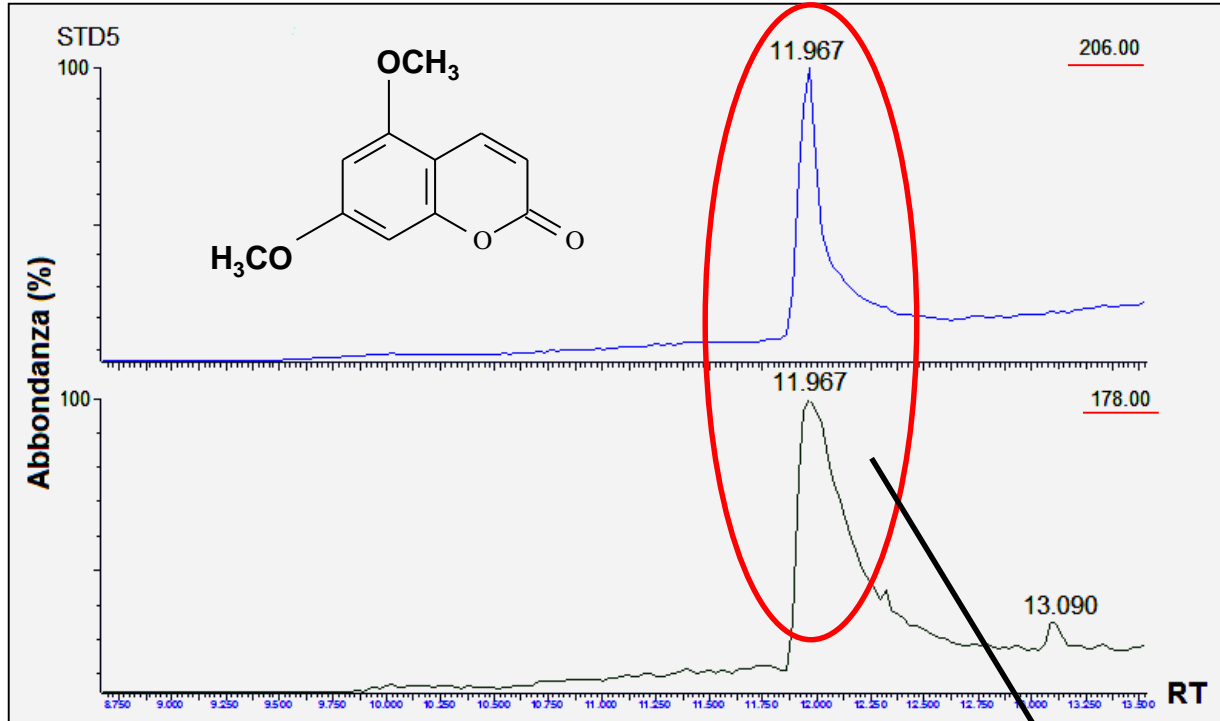
Nelle analisi GC – MS, sono alla fine disponibili due dati

sufficienti e fondamentali per l'identificazione e la

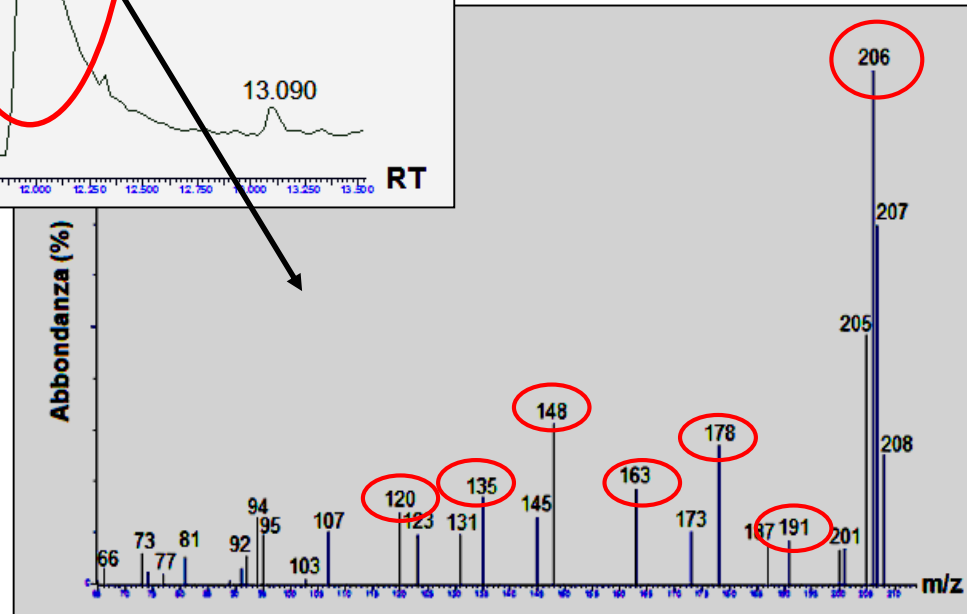
quantificazione di un composto incognito:

- 1) il tempo di ritenzione
- 2) lo spettro di massa

# Cromatografia: Gascromatografia (Gas Chromatography, GC)



Analisi GC-MS della 5,7-dimetossicumarina standard



# **Cromatografia: Gascromatografia (Gas Chromatography, GC)**

## **Applicazione GS-MS nella ricerca di impurezze**

Identificazione di impurezze presenti in quantità superiori allo 0,1%

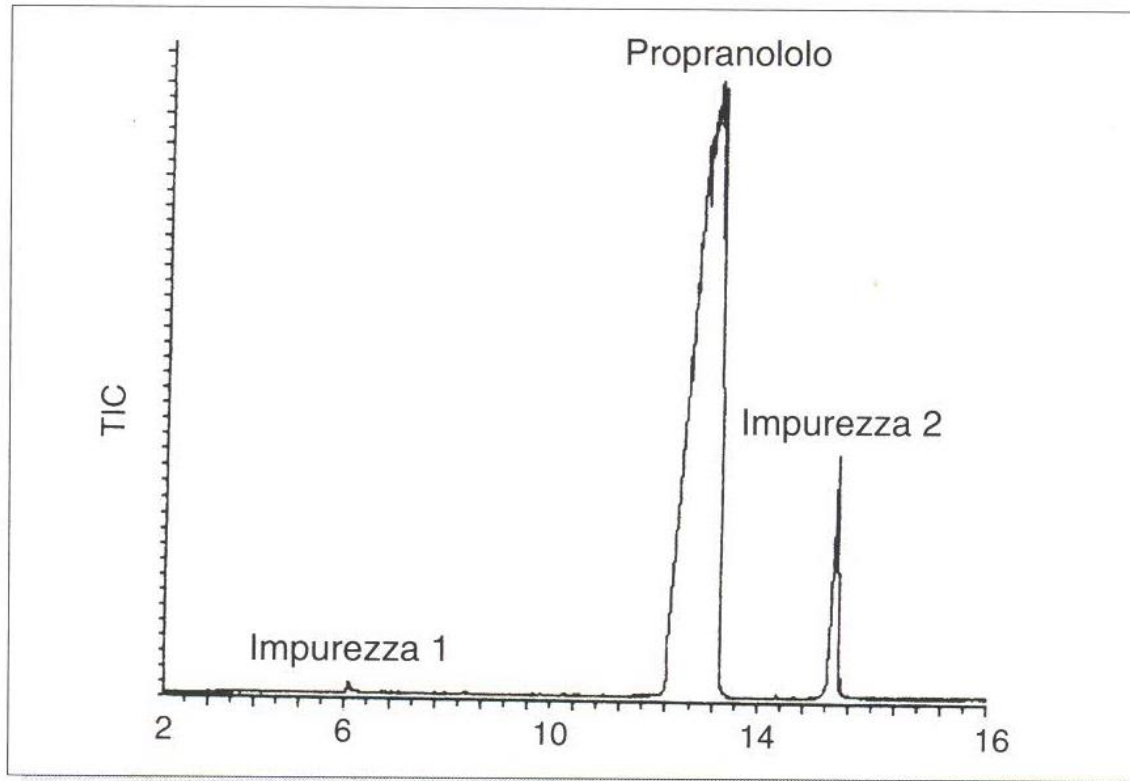
Nei prodotti farmaceutici secondo i requisiti stabiliti dalla FDA → deve essere identificato qualsiasi tipo di impurezze presente in quantità superiore a quello indicato

Le impurezze possono generate sia nel corso del processo di produzione sia per degradazione del farmaco.

# Cromatografia: Gascromatografia (Gas Chromatography, GC)

## Applicazione GS-MS nella ricerca di impurezze

Es: campione commerciale propranololo.

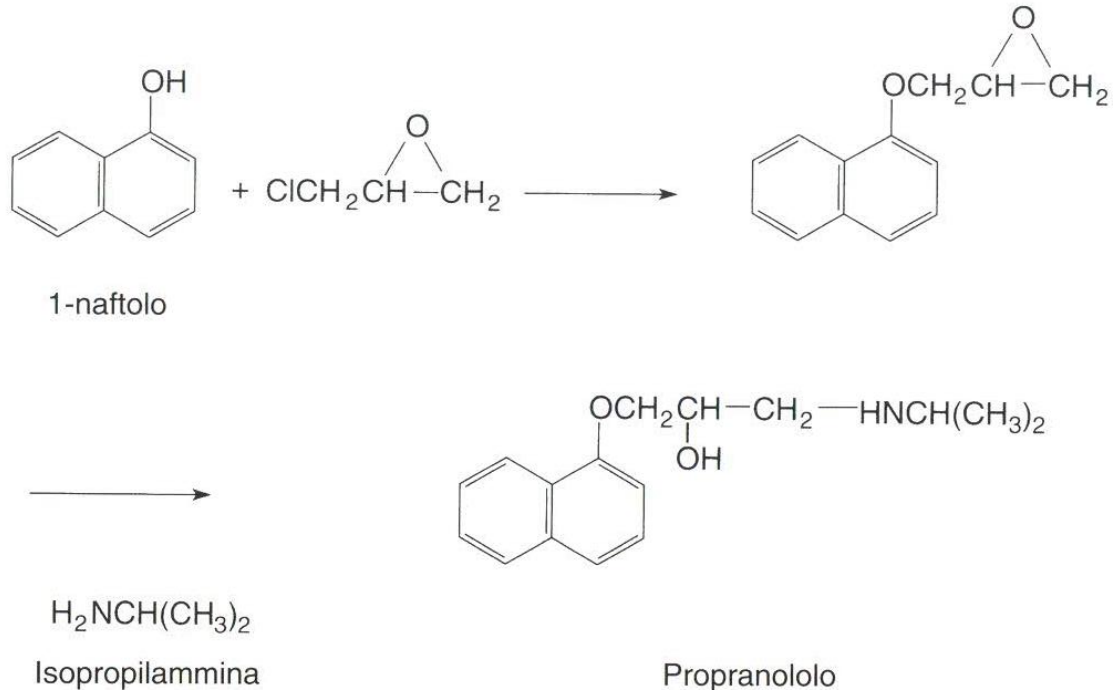




# Cromatografia: Gascromatografia (Gas Chromatography, GC)

## Applicazione GS-MS nella ricerca di impurezze

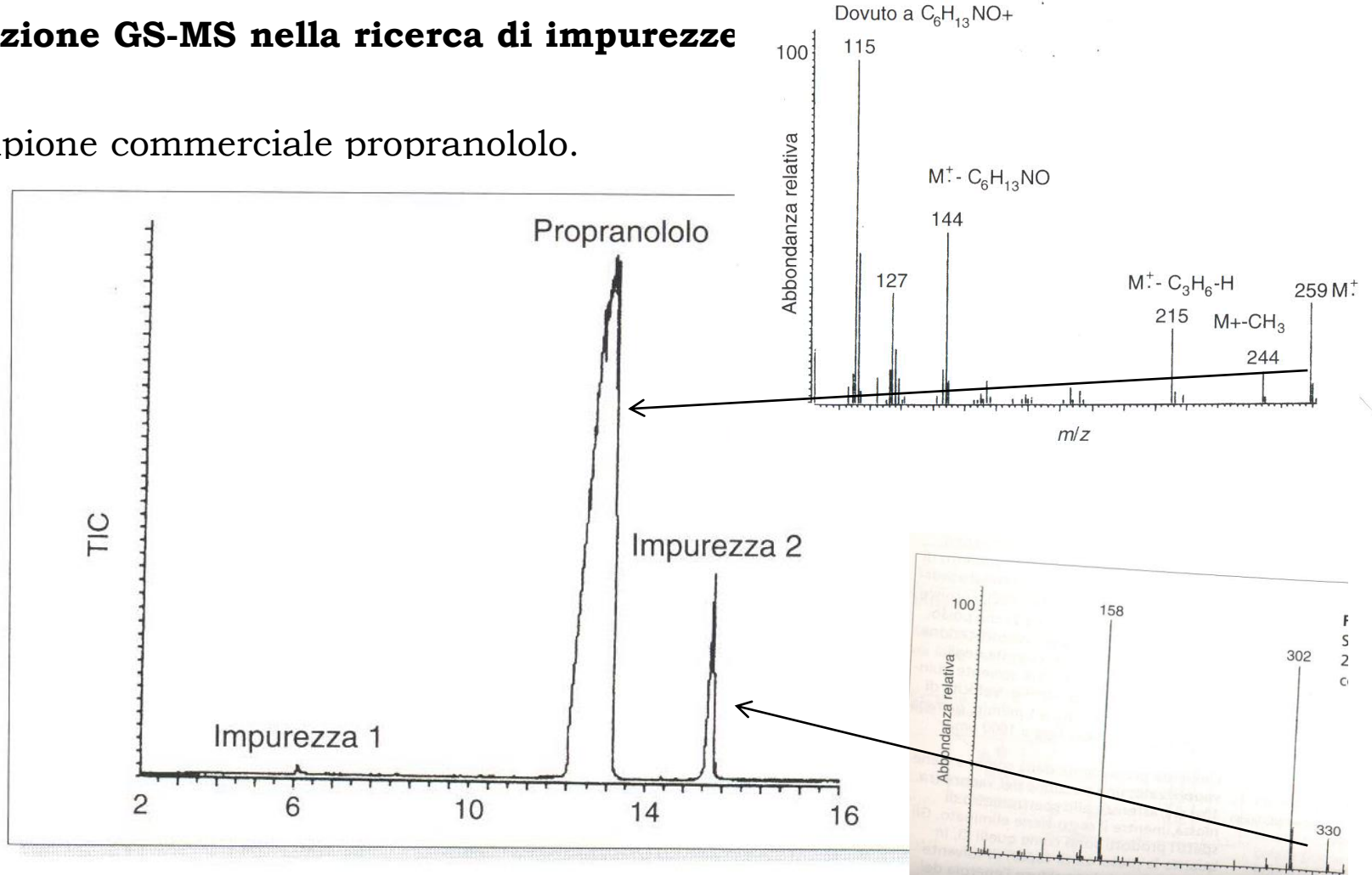
Es: campione commerciale propranololo.



# Cromatografia: Gascromatografia (Gas Chromatography, GC)

## Applicazione GS-MS nella ricerca di impurezze

Es: campione commerciale propranololo.



# **Cromatografia: Gascromatografia (Gas Chromatography, GC)**

## **Analisi di fluidi biologici per la ricerca di sostanze di abuso**

### **MATRICI:**

- Urina
- Saliva
- Sudore
- PLASMA/SIERO/SANGUE
- Matrice cheratinica (capelli/peli)

# Cromatografia: Gascromatografia (Gas Chromatography, GC)

## Analisi di fluidi biologici per la ricerca di sostanze di abuso

