

SPETTROMETRIA DI MASSA

Queste tecniche permettono di avere informazioni su:

- Composizione qualitativa e quantitativa di analiti organici in miscele complesse
- Struttura di specie molecolari complesse
- Rapporti isotopici degli atomi
- Struttura e composizione delle superfici solide

SPETTROMETRIA DI MASSA

Si utilizzano diversi analizzatori di massa

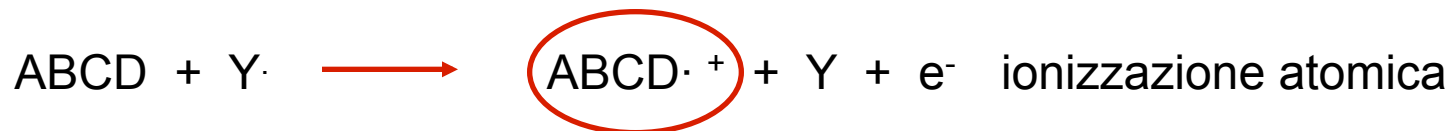
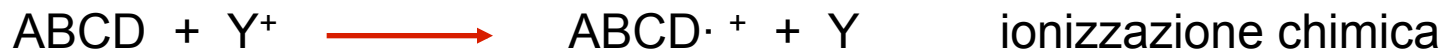
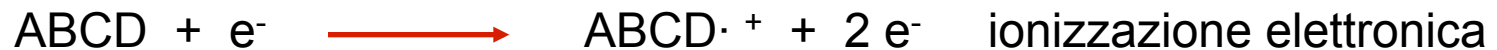
- Settore **magnetico**
- **Quadrupolo** (esapolo, ecc.)
- **Tempo di volo** (TOF)
- Settore **magnetico** accoppiato a settore **elettrostatico**
- a **trappola ionica**
- ...

Diverse prestazioni in termini di risoluzione di massa e caratteristiche (robustezza, facilità d'uso e mantenimento, costo)

PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO

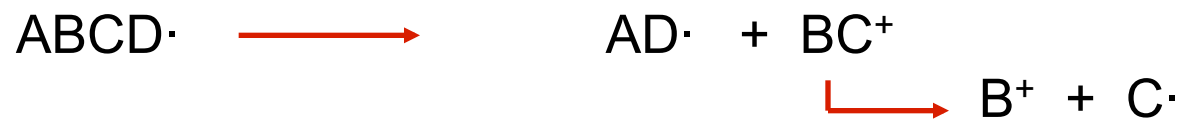
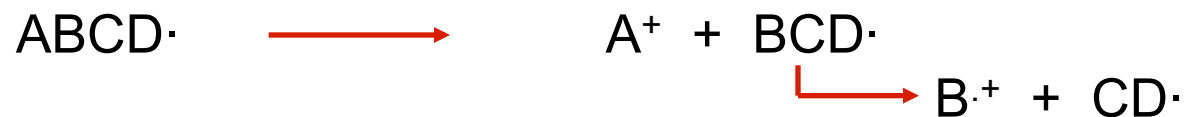
Il campione viene portato allo stato di vapore a bassa pressione, poi viene ionizzato in una **camera di ionizzazione** e ridotto in frammenti dotati di carica elettrica o neutri.

La separazione avviene per mezzo di un campo elettrico, combinato o meno con un campo magnetico (vedi tipi analizzatori slide precedenti), e la separazione è effettuata in funzione del rapporto massa/carica.



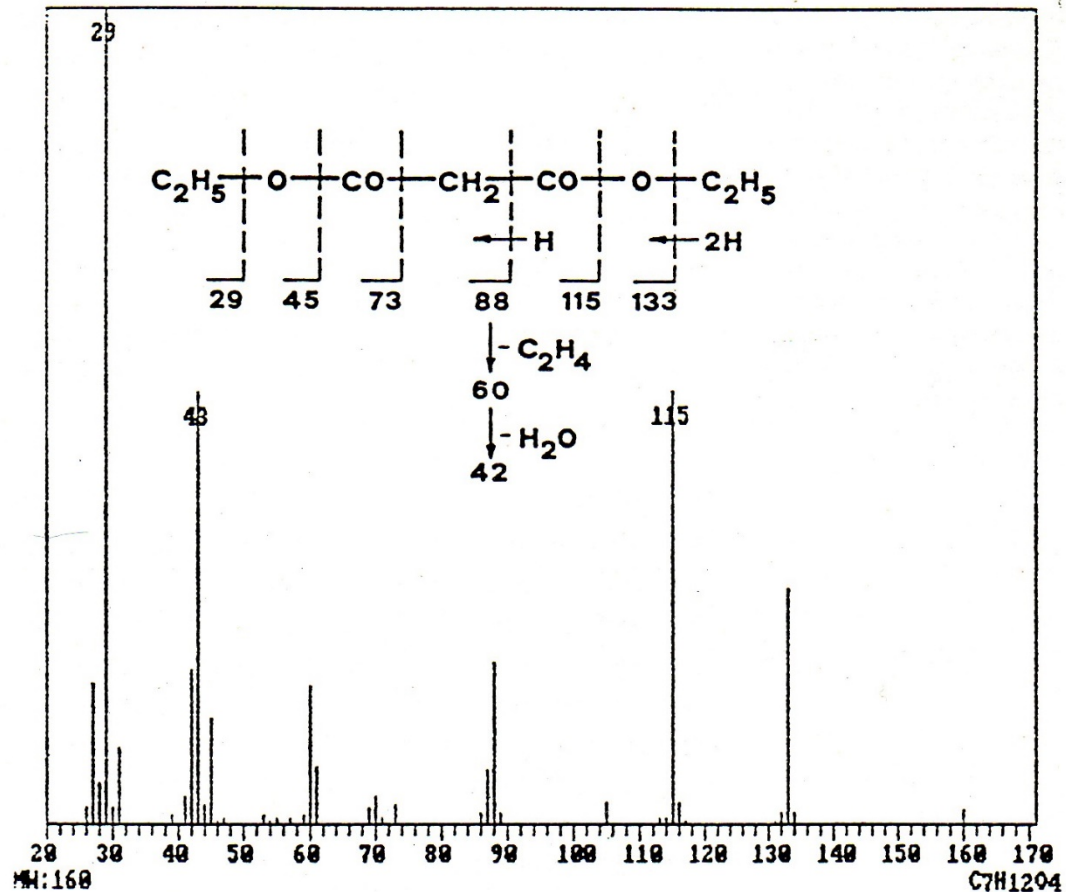
In questo modo si ottiene lo ione primario o molecolare (parent ion)

Reazioni di frammentazione secondaria



Spettri di massa: esempio

Intensità del segnale



massa/carica

Spettro di massa dell'estere dietilico dell'acido propandioico $C_7H_{12}O_4$
(peso molecolare = 160)

Schema a blocchi spettrometro di massa

P = pompa ad alto vuoto

S = sistema di introduzione o interfaccia

C = camera di ionizzazione

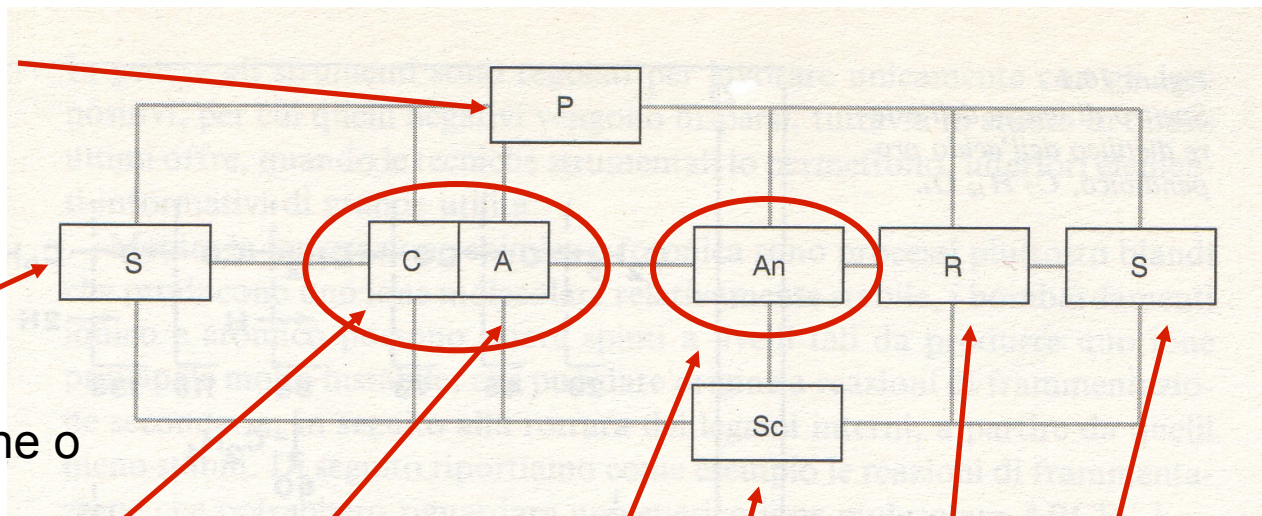
A = acceleratore e focalizzatore di ioni (ion gun)

An = analizzatore

R = rivelatore

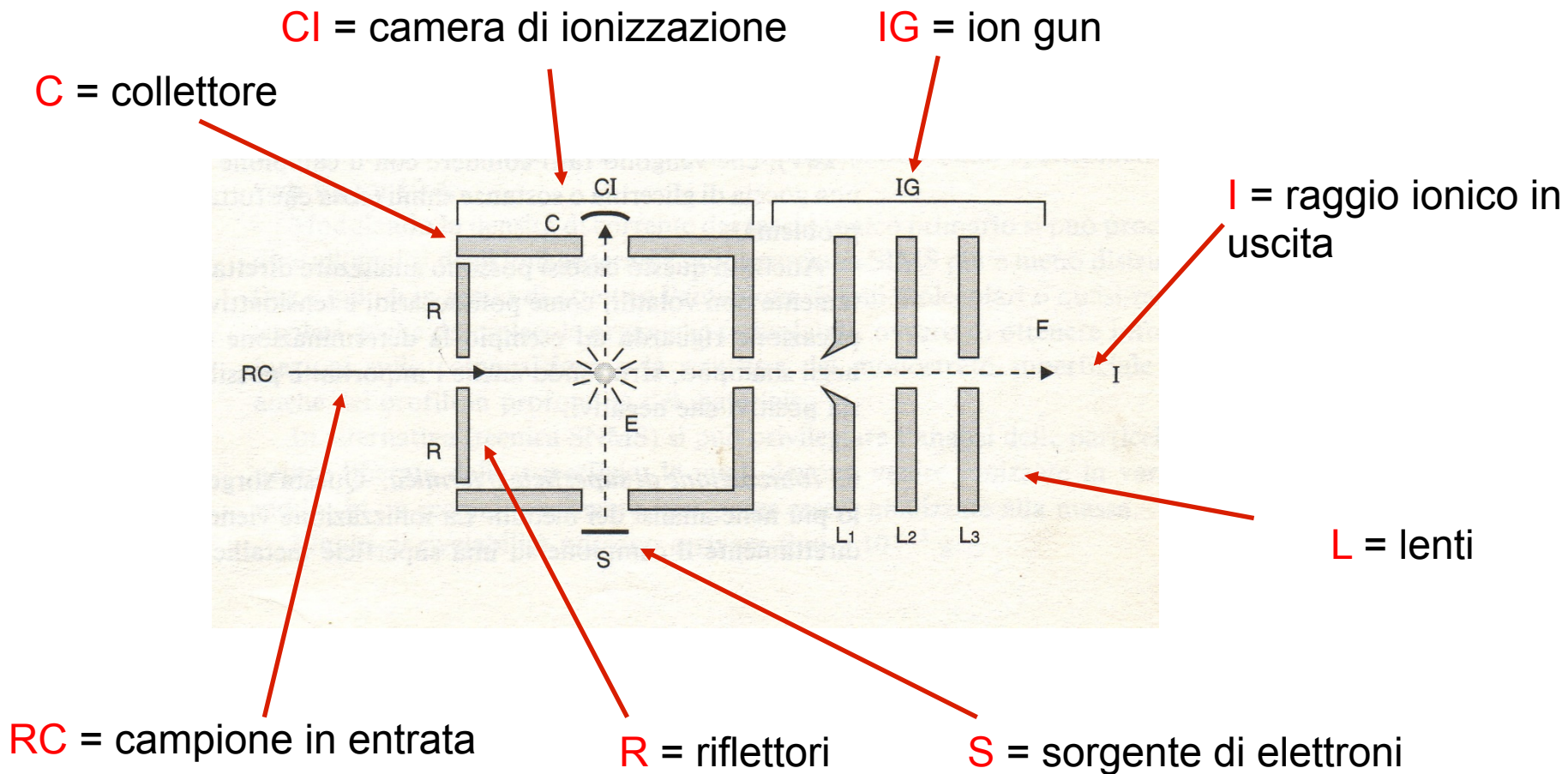
S = sistema di elaborazione del segnale

Sc = sistema di controllo



Sorgente di ionizzazione e camera di ionizzazione

Sorgente a Impatto Elettronico (EI, electron impact): “hard”

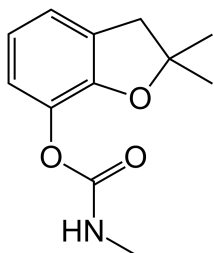


Sorgenti di ionizzazioni “soft”

- Ionizzazione chimica (CI, chemical ionization)
- Ionizzazione di campo (FI, field ionization)
- Desorbimento di campo (FD, field desorption)
- Bombardamento di atomi veloce (FAB, fast atom bombardment)
- Ionizzazione di superficie termica
- Scintilla (SSMS, spark source mass spectrometry)
- Desorbimento con laser (LD, laser desorption)
- Ionizzazione secondaria
- Scarica a incandescenza

Spettri di massa ottenuti con diverse sorgenti di ionizzazione

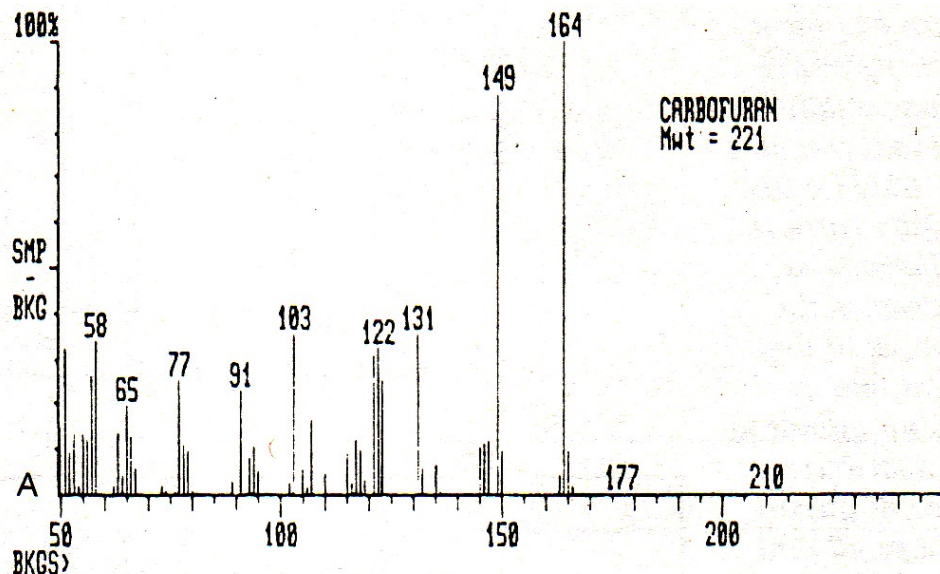
Carbofurano
Massa molare 221



Sorgente a

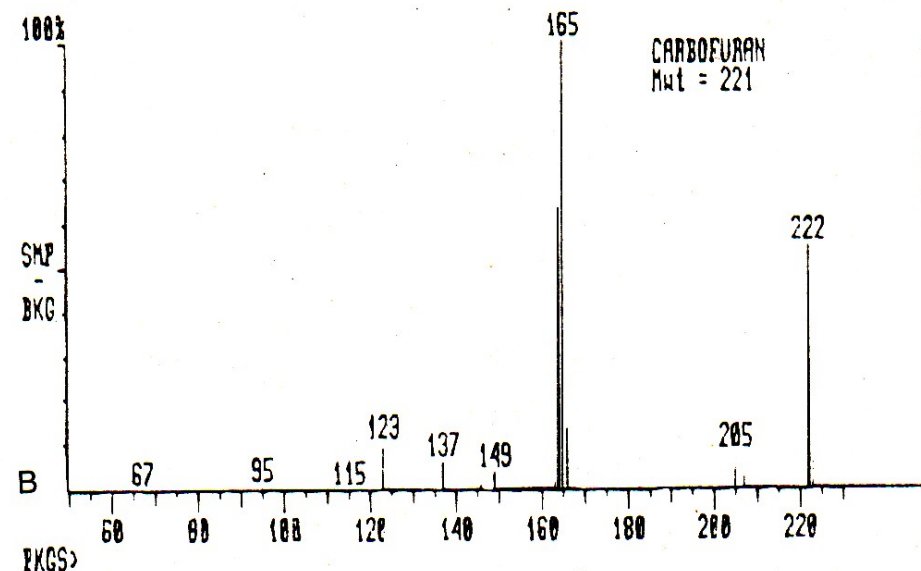
Impatto Elettronico (EI)

o Ionizzazione Elettronica



Sorgente a Ionizzazione
Chimica

(CI - Chemical Ionization)



Risoluzione di massa

E' la capacità di uno spettrometro di massa di **differenziare le masse**

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

dove

Δm = differenza di massa tra due picchi adiacenti risolti

m = massa del primo picco

R può variare da 500 a 500.000 e dipende dall'analizzatore di massa

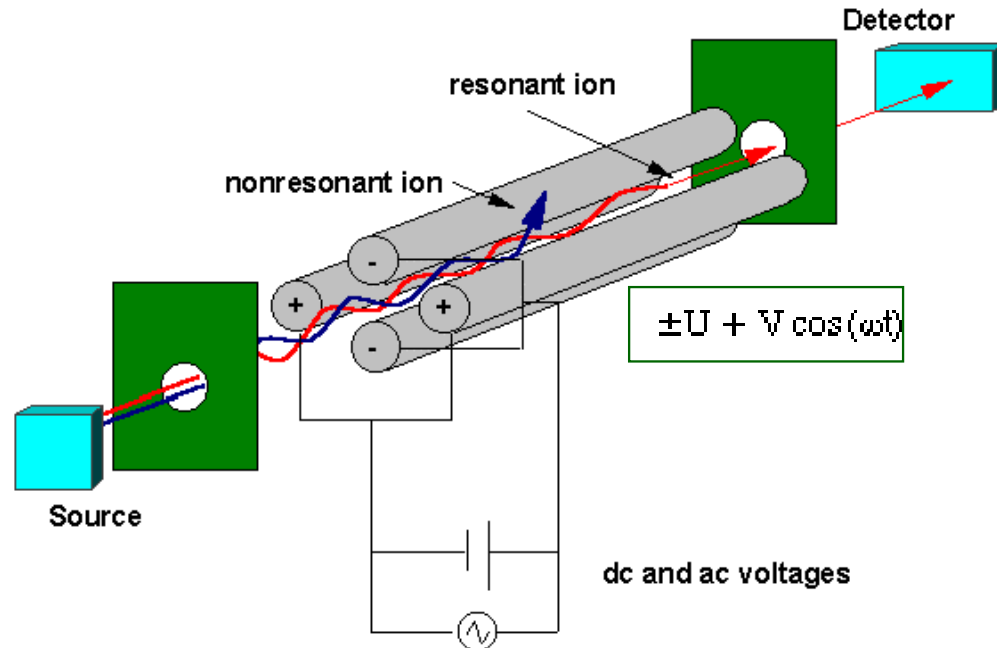
Si hanno analizzatori a risoluzione bassa (indicativamente < 3000 – quadrupolo, trappola ionica) e medio-alta (> 3000, settore magnetico, TOF e a doppia focalizzazione – vedi dopo)

Applicando la formula di sopra che ad es., se $R = 4000$ si separano picchi con masse 400.0 e 400.1 oppure 40.01 e 40.02

Se poi, ad es., consideriamo i frammenti:

$C_2H_4^+$	CH_2N^+	N_2^+	CO^+	→ Occorre distinguere frazioni di unità di massa (centesimo)
28.0313	28.0187	28.0061	27.9949	

Analizzatori di massa: analizzatore a QUADRUPOLO (FILTRO DI MASSA)

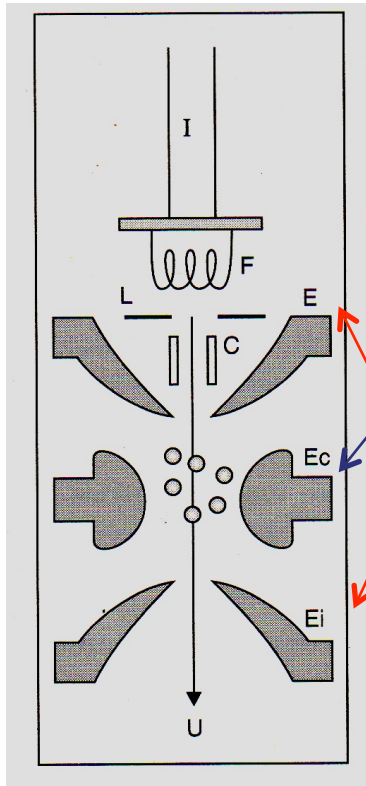


Alle barre opposte del quadrupolo è applicata una differenza di potenziale, generata da una corrente continua ed alternata.

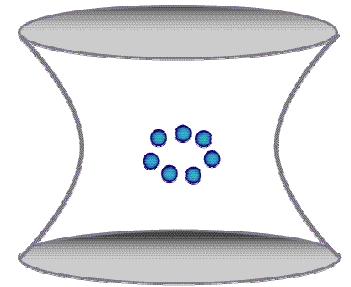
Gli ioni, a causa di questa differenza, subiscono nel loro transito delle oscillazioni, che potranno essere stabili, permettendo così all'ione di uscire dal quadrupolo, o instabili e porteranno alla collisione dello ione con le barre del quadrupolo. Variando nel tempo la tensione applicata, tutti gli ioni saranno messi in condizione di uscire (a tempi diversi) dal quadrupolo.

Analizzatori di massa: analizzatore a TRAPPOLA IONICA

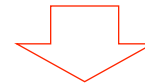
E' un analizzatore simile a quello a quadrupolo, ma in questo il filtro quadrupolare è **sferico** e trattiene tutti gli ioni generati anziché farli passare come il quadrupolo; gli ioni poi vengono rilasciati progressivamente verso il rivelatore, variando il campo elettrico.



E' costituita da **3 elettrodi in acciaio inossidabile** le cui superfici interne sono di forma iperbolica. Gli elettrodi sono disposti in una geometria a "sandwich" :



- elettrodo ad anello nel centro (**ring electrode**)
- due elettrodi laterali (end-cup), uno di entrata e uno di uscita degli ioni

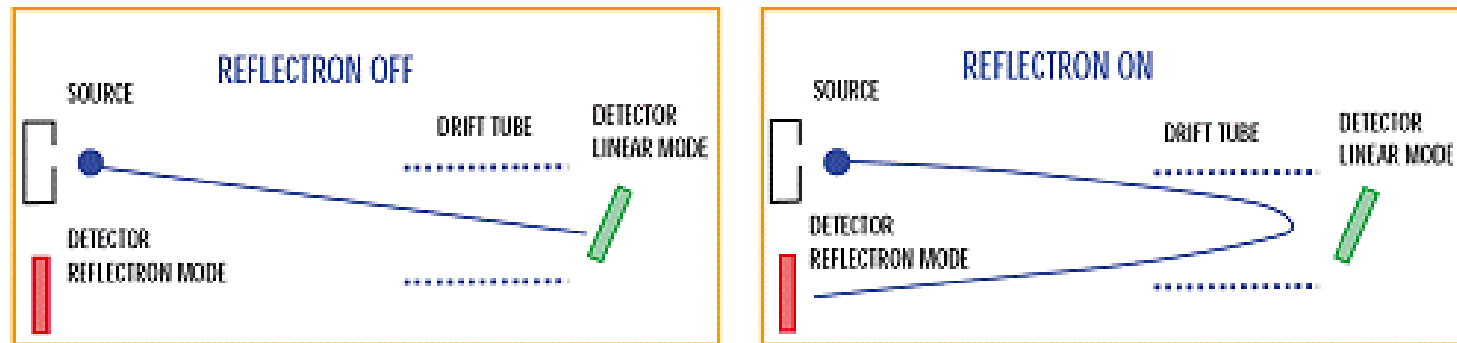


Gli elettrodi creano un **campo elettrico iperbolico** tridimensionale, che intrappola gli ioni con un dato intervallo di m/z , determinato dai potenziali applicati (voltaggio RF).

Analizzatori di massa: analizzatore a TEMPO DI VOLO (TOF – Time of Flight)

Separa gli ioni in base al TEMPO da essi impiegato nel percorrere una certa distanza nota. Si basa sul fatto che ioni con diverso valore m/z e uguale energia cinetica impiegano tempi differenti a percorrere una certa distanza

1. Gli ioni prodotti dalla sorgente vengono accelerati da un potenziale di accelerazione che conferisce a tutti la stessa energia cinetica.
2. Gli ioni vengono focalizzati verso un tubo di volo (fly tube o drift tube)



Gli ioni più pesanti (m/z più alto) raggiungono il rivelatore dopo quelli piccoli!

Analizzatori di massa: analizzatore a TEMPO DI VOLO (TOF – Time of Flight)

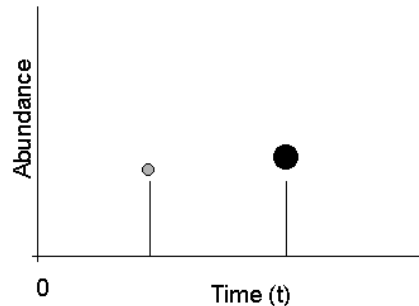
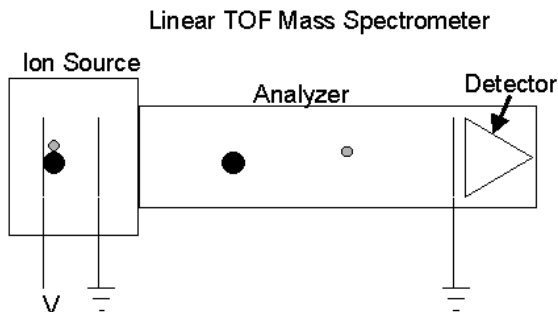
Infatti, Dato che l'energia cinetica è: $E_c = \frac{1}{2} m \cdot v^2 = z \cdot V$

$$v^2 = \frac{2 \cdot z \cdot V}{m} \quad \Rightarrow \quad v = (2zV/m)^{1/2}$$

Minore sarà la massa dello ione, maggiore sarà la sua velocità

Se lo strumento possiede un tubo di volo di lunghezza L : $v = L/t$

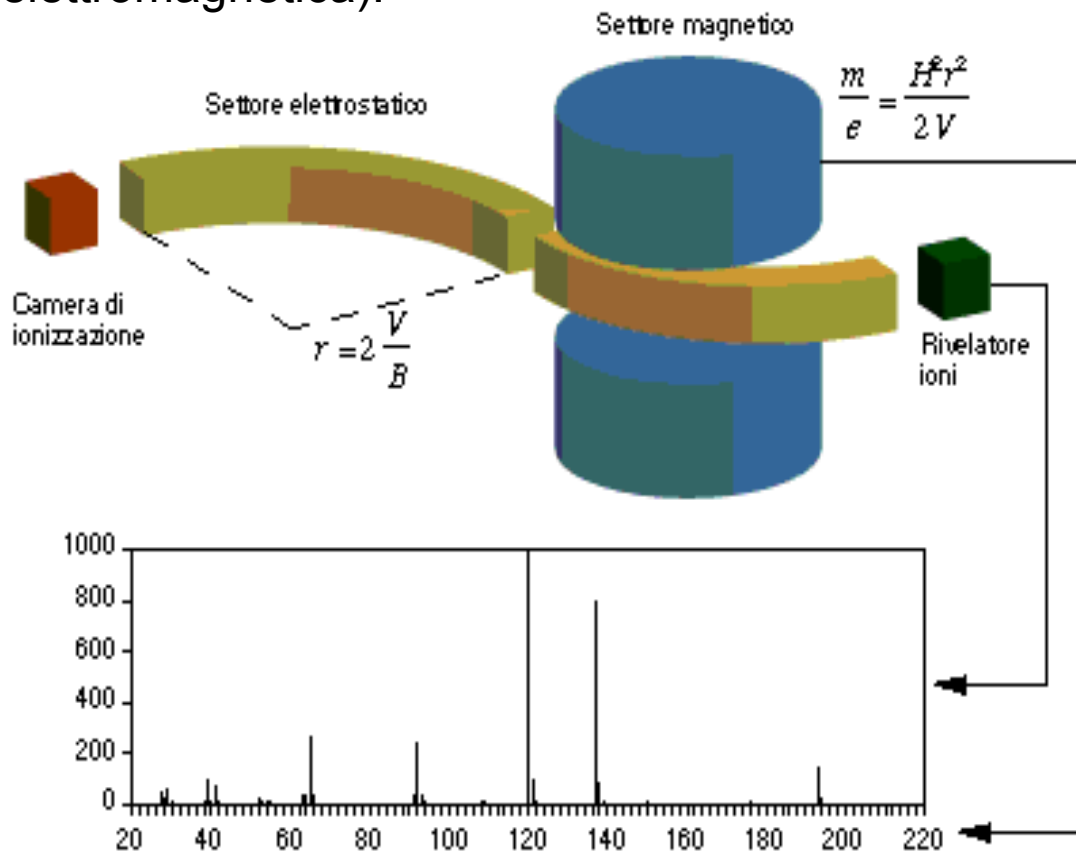
$$t = L / v \quad t = L / (2V/m/z)^{1/2}$$



Gli ioni più **leggeri** percorrono il tubo di volo e raggiungono il rivelatore prima di quelli pesanti.

Analizzatori di massa: analizzatore a DOPPIA FOCALIZZAZIONE SETTORE ELETTROSTATICO + MAGNETICO

La scansione dei diversi rapporti m/z viene ottenuta ricorrendo a campi **elettrici accoppiati a campi magnetici** (spettrometro a doppia focalizzazione elettromagnetica).

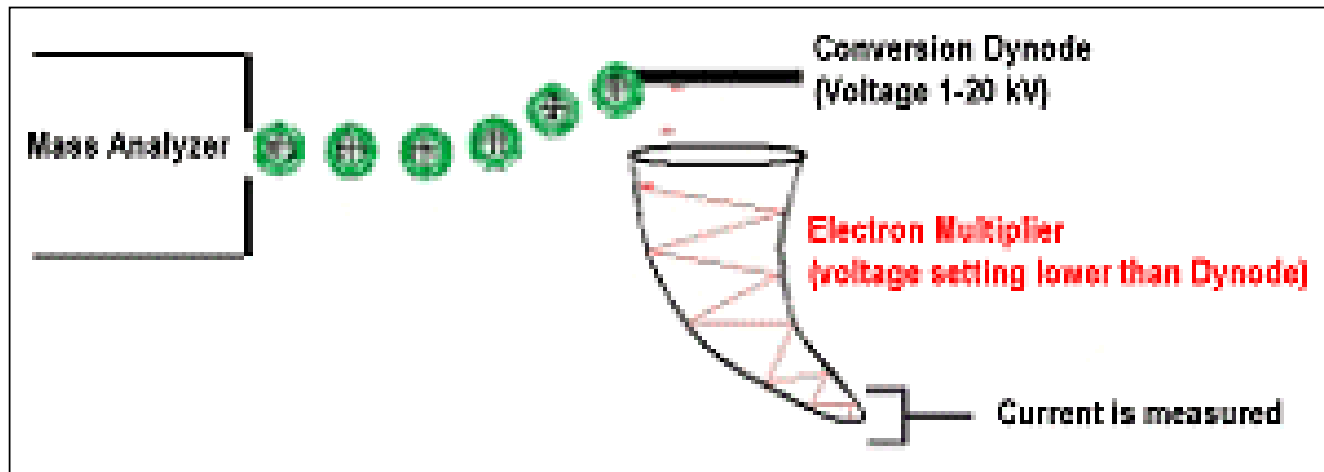


Il campo elettrico accelera gli ioni ad una velocità molto elevata, inviandoli in un condotto ricurvo, e il campo magnetico induce una deflessione del percorso degli ioni accelerati in base alla loro massa

L'analizzatore ha R molto elevati, dell'ordine di 10^4 - 10^5

Rivelatori

Sono dispositivi che all'arrivo di un fascio di ioni, danno un segnale elettrico proporzionale alla quantità degli ioni, segnale che viene amplificato e registrato.



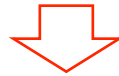
Quelli più comuni sono costituiti da:

- un dinodo di conversione
- un moltiplicatore di elettroni a dinodo continuo (“Channeltron”)

Rivelatori

Il **dinodo di conversione** è una superficie metallica concava localizzata ad angolo retto rispetto al fascio di ioni che giungono dall'analizzatore, ed è posta ad un potenziale negativo

Quando uno ione positivo lo colpisce, si osserva l'emissione di particelle secondarie (ioni negativi ed elettroni) che vengono focalizzati dalla superficie curva del dinodo e accelerati verso il moltiplicatore di elettroni



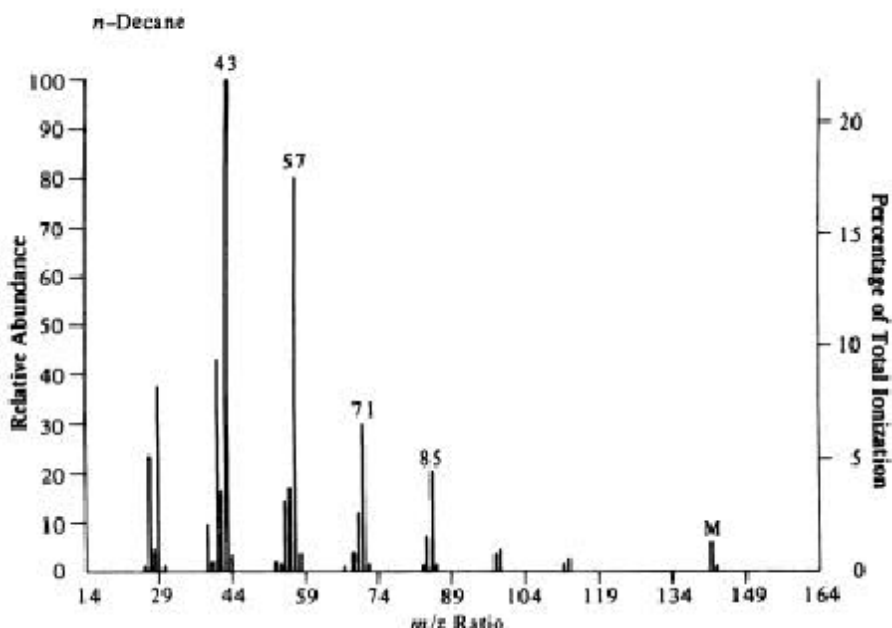
Gli ioni trasformati in elettroni dal dinodo di conversione vengono amplificati attraverso un effetto a cascata in un moltiplicatore di elettroni a forma di corno ricurvo per produrre un segnale elettrico. Questo dispositivo, chiamato anche channeltron, è largamente impiegato in strumenti a quadrupolo e a ion trap.

Grazie alla **forma ad imbuto** gli elettroni emessi non percorrono molto spazio prima di colpire nuovamente la superficie interna del moltiplicatore, causando così l'emissione di nuovi elettroni. Alla fine si forma una **cascata di elettroni che si traduce in una corrente misurabile**

Interpretazione degli spettri

- Identificazione dello **ione molecolare**
- Identificazione di **ioni** caratteristici
- Identificazione di **processi di frammentazione** caratteristici
- Ricostruzione della **struttura** della molecola sulla base della conoscenza dei meccanismi di frammentazione

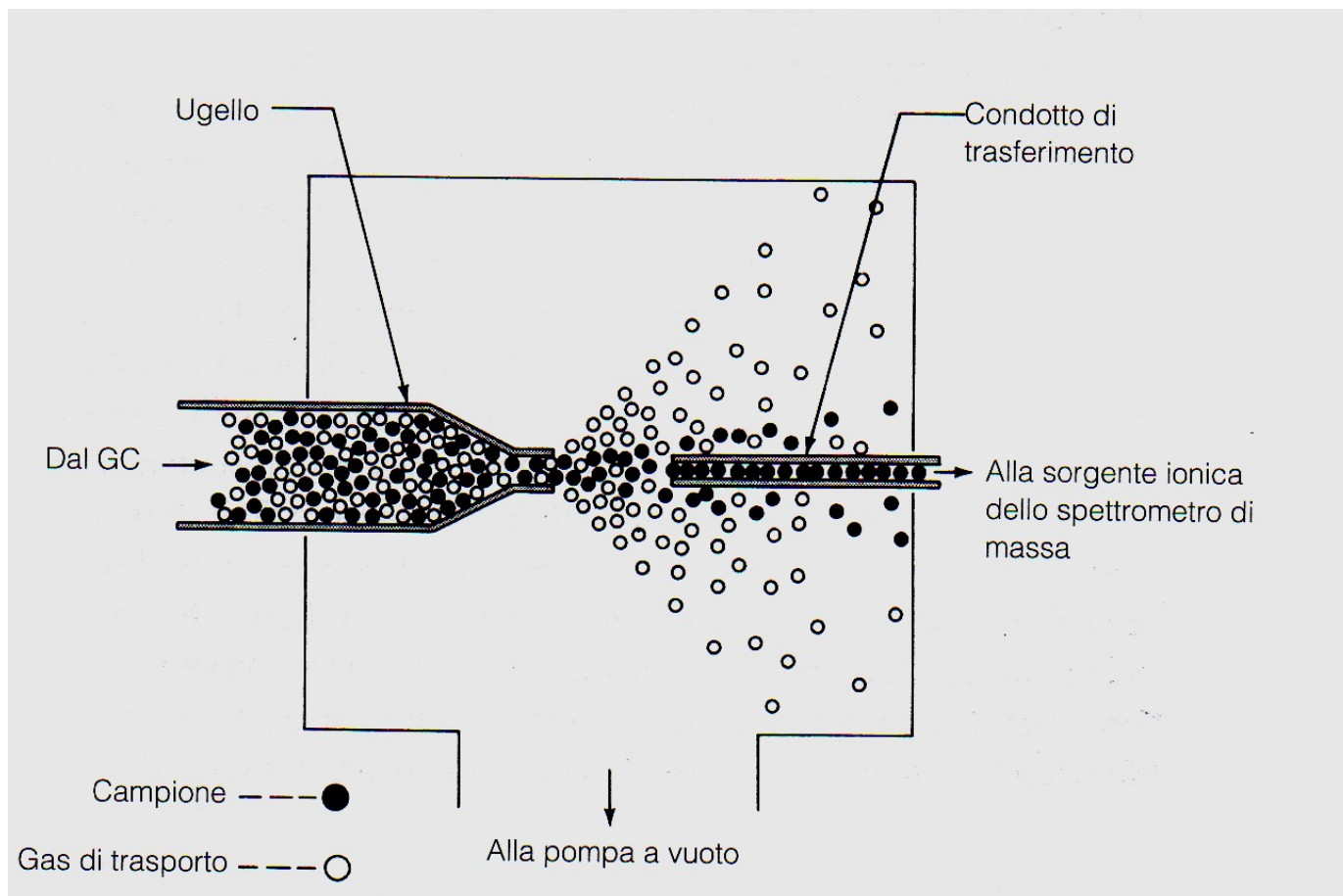
Figure 3. (A) Electron impact mass spectrum of *n*-decane at 70 eV.



Le intensità dei picchi sono espresse come percentuali del picco più intenso il cosiddetto picco base cui si assegna arbitrariamente il valore 100

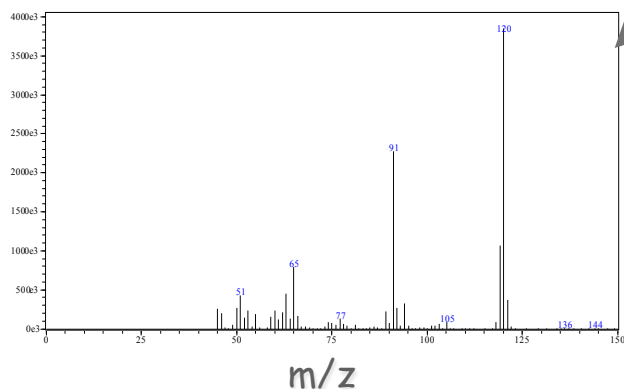
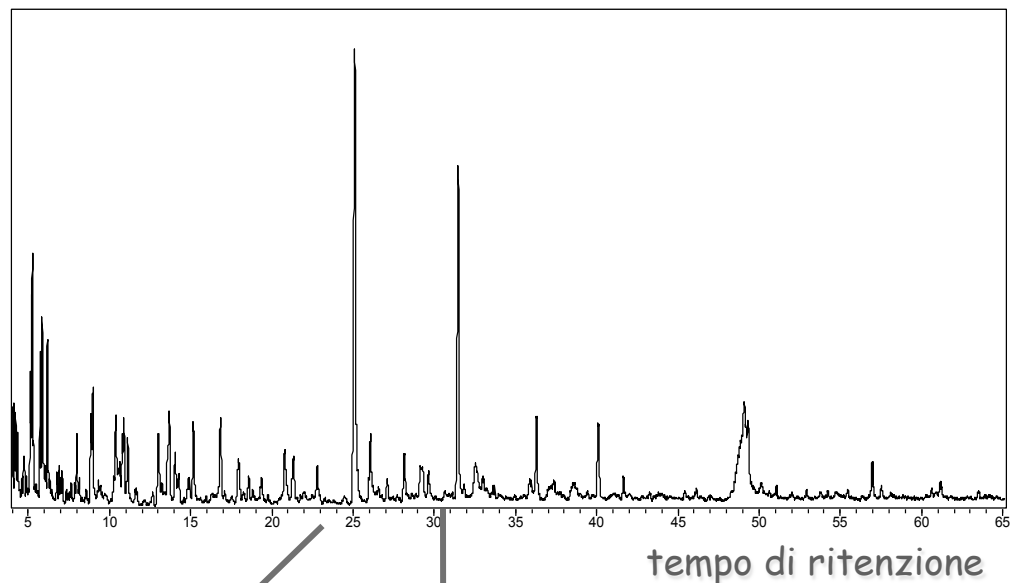
Accoppiamento GC/MS (Gas Chromatography – Mass Spectrometry)

Il gascromatografo separa i composti presenti nel campione mentre lo spettrometro di massa funziona da rivelatore

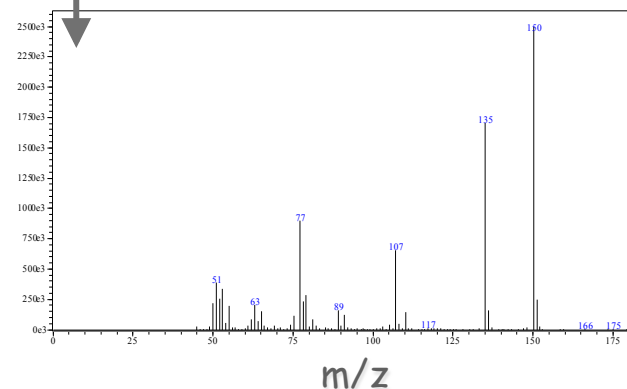


Accoppiamento GC/MS (Gas Chromatography – Mass Spectrometry)

Esempio di separazione e determinazione con GC-MS. I database di cui dispongono i moderni strumenti GC-MS contengono gli spettri di massa di circa 400.000 composti, tra cui quasi tutti quelli di interesse in chimica degli alimenti. Per confronto, è sempre possibile riconoscere i composti separati



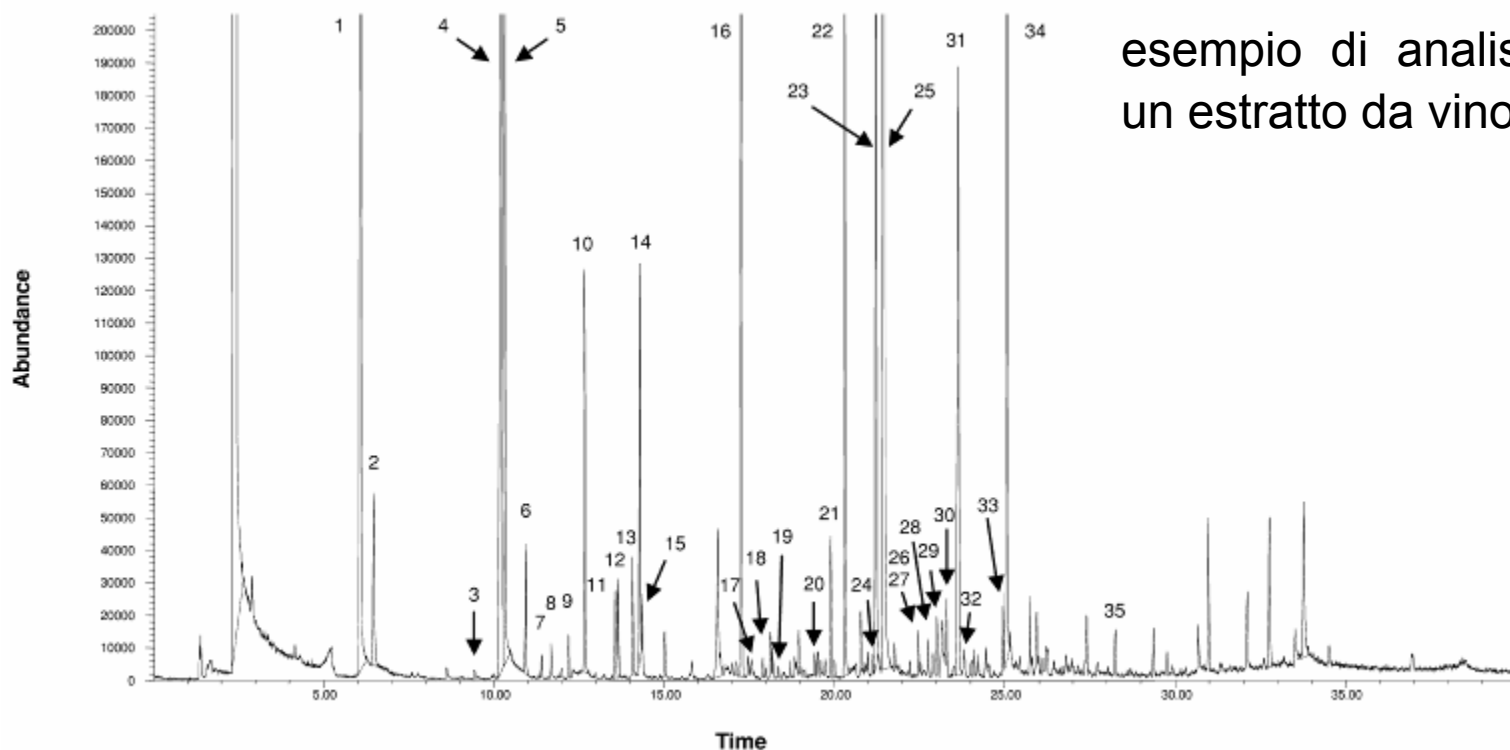
spettri
di massa



Accoppiamento GC/MS

Esempio di applicazione all'analisi di un vino

Qualunque sia il tipo di pretrattamento, l'analisi GC-MS dei composti volatili permette di determinare un numero elevato di sostanze, quindi di avere un set di dati molto ampio. Ad es. in un vino sono determinabili 50-100 sostanze aventi caratteristiche di volatilità, in prevalenza alcoli, terpeni ed esteri. Con opportuni trattamenti, è possibile ampliare ulteriormente il gruppo di composti, a vantaggio della possibilità di caratterizzare le varietà.



esempio di analisi GC-MS di un estratto da vino Nebbiolo

Accoppiamento HPLC/MS

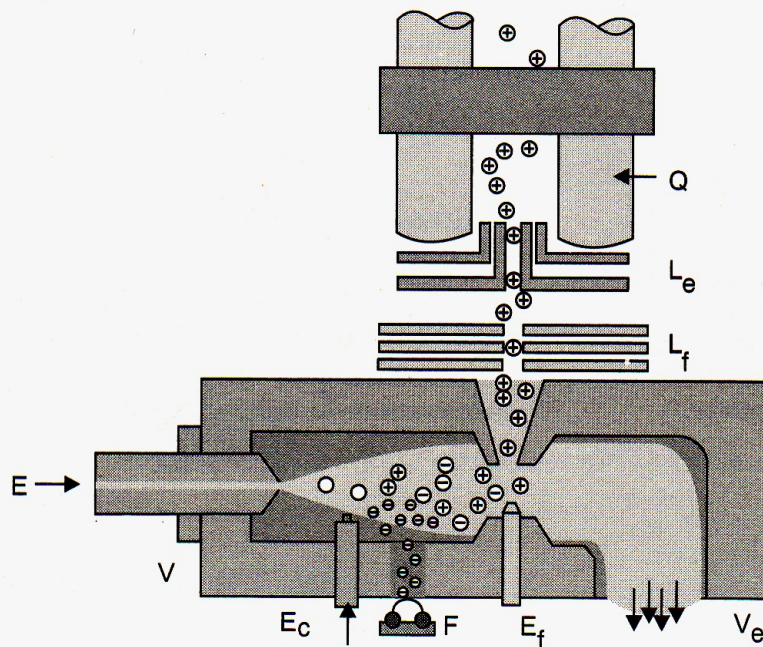
Il problema da considerare negli accoppiamenti con spettrometri di massa (MS) è la necessità di interfacciare la camera di ionizzazione, che è sotto vuoto spinto, e l'apparecchio HPLC a pressione ordinaria

Interfaccia thermospray

Il campione viene inviato alla camera di ionizzazione mediante l'impiego di un tubo capillare riscaldato. Il campione è nebulizzato e si ha una parziale evaporazione del solvente. Si producono goccioline fini che vengono ionizzate da un filamento sottoposto a tensione

Figura 10.13

Schema di interfaccia thermospray. E = Eluente dalla colonna HPLC. V = Vaporizzatore. Ec = Elettrodo collettore. F = Filamento. Ef = Elettrodo di frammentazione. Ve = Vapori in eccesso, verso la pompa. Lf = Lenti focalizzatrici. Le = Lenti di entrata nel quadrupolo. Q = Quadrupolo.



Accoppiamento HPLC/MS

Interfaccia Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)

È sia una tecnica di ionizzazione a pressione atmosferica e un'interfaccia ionizzante per HPLC. Produce poca frammentazione, è una tecnica di ionizzazione *soft*. Può essere accoppiata con flussi fino a 1-2 mL/min, ed è adatta per composti di bassa e media polarità

Figura 10.14

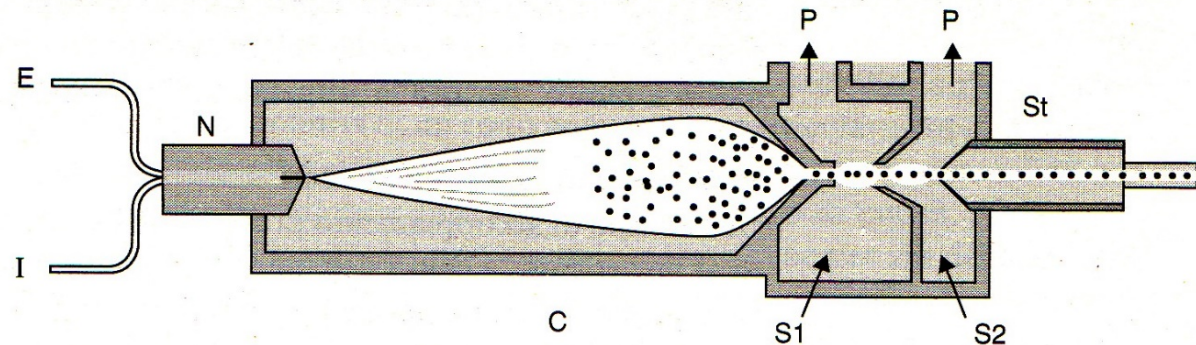
Schema di interfaccia particle beam.

E = Eluente dalla colonna HPLC. I = Ingresso elio.

N = Nebulizzatore.

C = Camera di desolvatazione. S1 = 1° separatore.

S2 = 2° separatore. St = Sonda di trasferimento. P = Pompa per il vuoto.



Il campione è nebulizzato con l'aiuto di un gas ausiliario (aria o N_2) e fatto evaporare in una zona a 500-600 °C per un tempo molto breve (simile a ICP), in modo da non far degradare composti termolabili. Il campione è poi ionizzato in un ago sottoposto a un voltaggio (circa 2-3 μA) che produce una scarica **effetto corona**: prima sono ionizzati i gas ausiliari e si formano gli **ioni primari** che ionizzano il solvente formando **ioni reagenti**, che a loro volta ionizzano il campione.

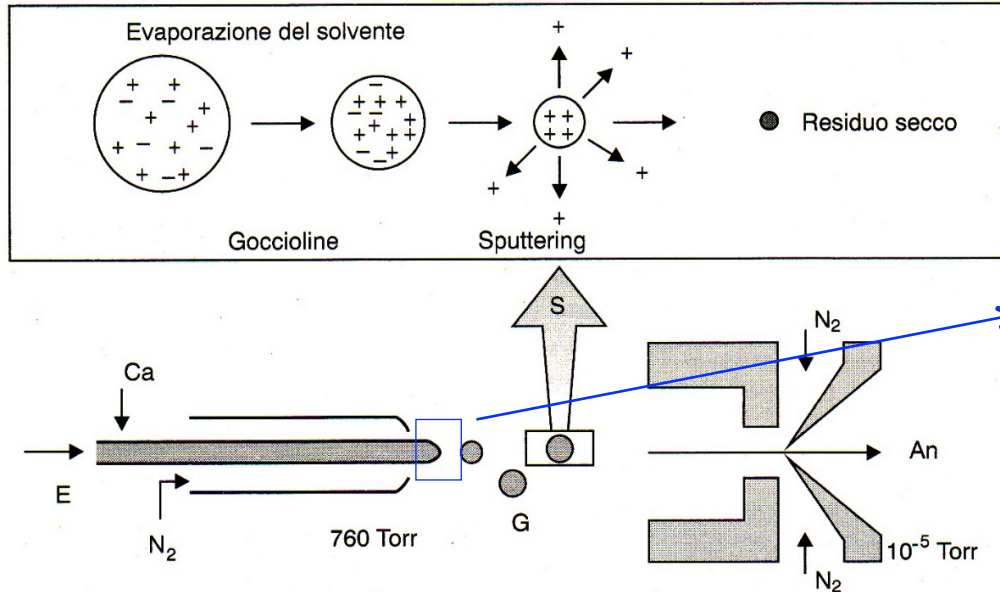
Accoppiamento HPLC/MS

Interfaccia Elettrospray

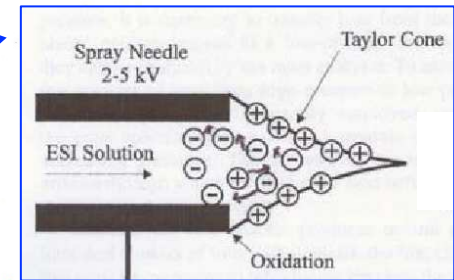
L'elettrospray (electrospray) è sia una tecnica di ionizzazione evaporativa che un'interfaccia per HPLC/MS

Figure 10.16

Schema di interfaccia elettrospray. E = Eluente dalla colonna HPLC. N₂ = Corrente di azoto. Ca = Capillare sottoposto ad alta tensione. G = Goccioline cariche. I = Ioni. An = All'analizzatore. S = Particolare del processo di sputtering. La carica delle goccioline dipende dalla polarità del campo elettrico applicato al capillare.



Taylor cone



Il campione viene fatto passare in un tubo capillare sottoposto a tensione. Il campione è nebulizzato e ionizzato: si forma un cono di Taylor e poi gocce che contengono ioni con cariche positive e negative si staccano dal capillare. Man mano che il solvente evapora le gocce aumentano la propria densità di carica fino a un soglia critica. A questo punto si ha la cosiddetta “esplosione coulombiana” e gli ioni vengono espulsi dalla goccia

Esempio applicazione HPLC-MS

Determinazione dei pesticidi

EN 15662:2009

Indice delle applicazioni



Matrice/campione	Parametro	Tecnica	Norma
Pomodoro	Pesticidi	LC-MS/MS	EN 15662:2009

Merck KGaA, Darmstadt, Germania
www.merckmillipore.com/food-analysis

3

Preparazione dei campioni (pomodori)

1. Prendere un campione rappresentativo (10 g) e introdurlo in un contenitore adatto
2. Aggiungere 10 ml di acido formico: acetonitrile (1:1 volume/volume-%) e omogeneizzare
3. Aggiungere una miscela di sali-tampone, omogeneizzare
 - Solfato di magnesio (4 g)
 - Cloruro di sodio (1 g)
 - Centrifugare a 4.200 rpm, 2,5 min
4. Prelevare la maggior parte possibile della fase superiore (4 mL)
5. Aggiungere a questa fase la miscela salina di adsorbimento, omogeneizzare
 - Carbone per SPE (35,0 mg)
 - Bondesil-PSA (113,0 mg)
 - Solfato di magnesio (652,0 mg)
 - Centrifugare a 4.200 rpm, 2,5 min
6. Trasferire 1 ml della fase superiore in una fialetta

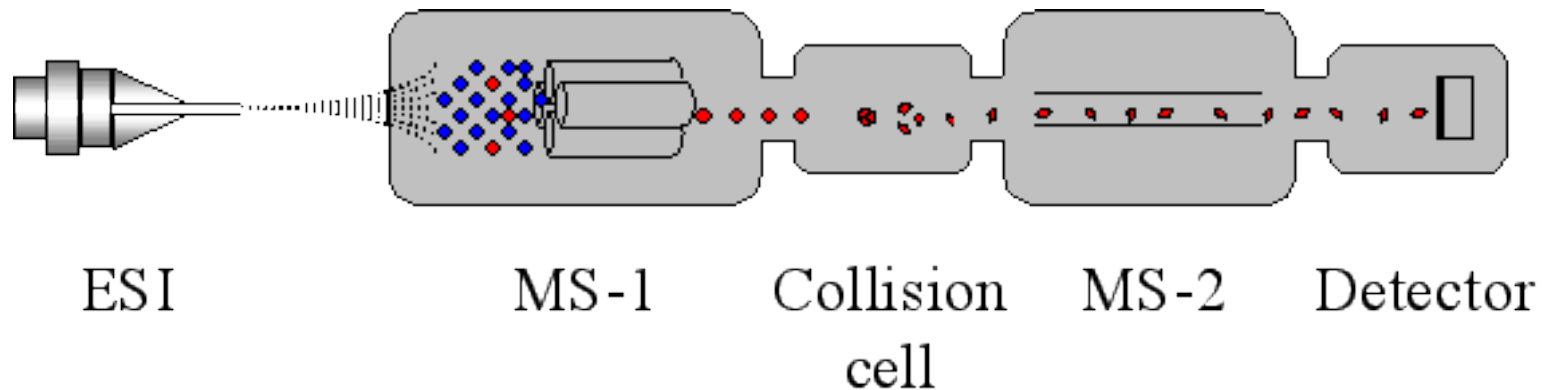
Analisi LC-MS/MS (utilizzare un sistema UHPLC appropriato)
Rivelatore MS-MS: sistema Q Trap MS/MS o simile

Colonna HPLC: "fused core" C18 (10 cm x 3,0 mm, 2,7 µm)
Precolonna: "fused core" C18 (0,5 cm x 3,0 mm, 2,7 µm)
Eluente: A: formiato d'ammonio 1 mmol/l con acido formico allo 0,1% in acqua
B: metanolo

Velocità di flusso: 500 µL/min
Iniezione: 20 µL
Temperatura: 40 °C
Gradiente:

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
2,0	65	35
8,5	5	95
15,0	5	95
16,0	95	5
20,0	95	5

Accoppiamento MS/MS



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 .

Brevi considerazioni su applicazioni MS

La spettrometria di massa è un metodo molto potente per analizzare la struttura dei composti organici ma ha tre limitazioni fondamentali:

1. I composti possono essere caratterizzati solo con campioni molto **puliti** (altrimenti interferenze isobariche impediscono riconoscimento e quantificazione)
2. Questa tecnica non ha la capacità di dare una analisi sensibile e selettiva nel caso di una **miscela complessa**.
3. Per grandi molecole come i peptidi gli **spettri** sono molto complessi e difficile da interpretare.