

# SPETTROMETRIA DI MASSA

## 1. Teoria

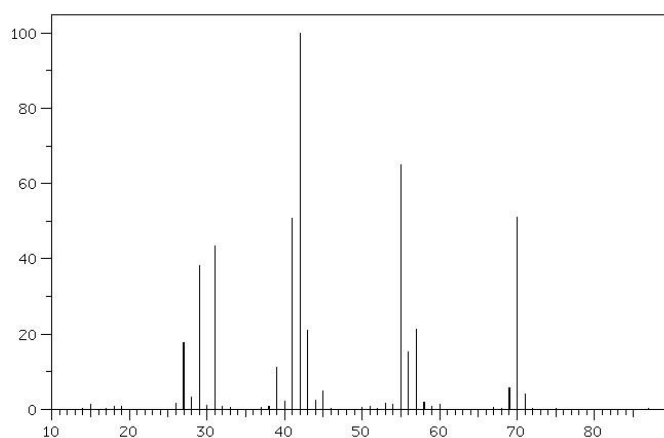
La spettrometria di massa (**Mass Spectroscopy - MS**) è una tecnica analitica piuttosto vecchia (risale agli anni '20 del novecento) ma, dopo l'interfacciamento con i moderni PC, ha conosciuto nuovi sviluppi ed oggi è di grande importanza analitica e ancora in continua evoluzione.

In realtà si tratta di un **insieme di tecniche analitiche** aventi come scopo la **misura di masse molecolari** e quindi la determinazione della **struttura di composti chimici**, anche in presenza di piccole quantità di campione. In altri termini si tratta di un insieme di **metodi di elucidazione strutturale**, finalizzati alla determinazione di struttura molecolari, soprattutto di tipo organico, biochimico e biologico. Da questo punto di vista è una tecnica analoga alla spettrofotometria IR, nella quale si perseguono gli stessi obiettivi tramite l'individuazione delle vibrazioni caratteristiche dei diversi gruppi funzionali organici.

Per poter osservare e misurare le proprietà di massa della molecola, quest'ultima deve subire inizialmente una **ionizzazione** e quindi una **frammentazione**: misurando la massa dei frammenti ottenuti e valutando il loro meccanismo di formazione a partire dalla molecola intatta iniziale, si risale alla sua struttura molecolare. La spettrometria di massa pertanto è un **metodo distruttivo** in cui la molecola non rimane inalterata dopo l'analisi: inoltre a differenza delle altre tecniche spettroscopiche/spettrometriche non vi è interazione tra luce e materia. E' inoltre possibile anche una **valutazione quantitativa** delle sostanze sottoposte ad analisi e quindi anche la determinazione di tracce infinitesime in campioni di qualsiasi genere.

La **sequenza analitica** tipica che si realizza nella spettrometria di massa è la seguente:

1. vaporizzazione del campione (sostanza pura o miscela) a bassa pressione
2. ionizzazione del campione e successiva frammentazione in frammenti ionici
3. separazione degli ioni in base al loro rapporto massa/carica ( $m/z$ ) tramite l'azione di un campo elettrico, combinato o meno con un campo magnetico
4. rivelazione degli ioni e misura della loro massa relativa, con registrazione del conseguente spettro di massa
5. analisi dello spettro e dei meccanismi di frammentazione: dai dati ottenuti si risale alla struttura iniziale della molecola



A fianco è mostrato un generico spettro di massa: sull'asse orizzontale viene riportato il rapporto  $m/z$ , sull'asse verticale l'intensità relativa del segnale prodotto da ogni ione.

Dato che nella maggior parte dei casi la carica dello ione è unitaria ( $z = +1$ ) ogni picco dello spettro corrisponde alla massa del frammento ionico ad esso associato.

Nell'esempio il picco pari a 70 uma, corrisponde alla massa molecolare della molecola non frammentata e perciò è indicato come picco molecolare; il picco più alto pari a 42 uma è detto picco base e rappresenta il frammento con la massima abbondanza relativa perché più stabile.

Lo spettro di massa viene presentato in **forma normalizzata**, cioè con altezze dei picchi rapportate a 100, valore assegnato al picco più alto.

Studiando il **tipo di frammentazione** ottenuta, utilizzando un insieme di regole e di meccanismi tipici di frammentazione, si può risalire alla molecola che ha generato l'insieme di picchi registrati dallo spettrometro.

Nata per lo studio degli isotopi e delle abbondanze isotopiche, oggi la spettrometria di massa è largamente usata nello studio strutturale delle molecole organiche, fino alle macromolecole, alle molecole di importanza biologica (biomolecole) e ai composti chimici di importanza farmacologica. A parità di condizioni operative, lo **spettro di massa** formato dai picchi relativi ai frammenti ionici derivanti dalla distruzione dell'analita è associabile univocamente ad una singola specie chimica, cioè costituisce una specie di "impronta digitale" della molecola analizzata.

Viene anche usata nel settore del controllo di qualità e conosce oggi una grande importanza nella forma di **spettrometria accoppiata** alla gascromatografia (GC-MS), alla cromatografia liquida ad alte prestazioni (LC-MS) e all'emissione al plasma (ICP-MS).

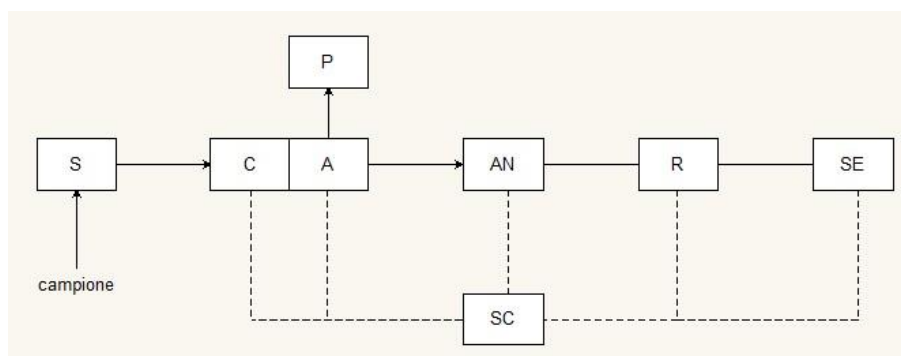
Alcuni **esempi applicativi** della MS, che ne sottolineano la grande importanza analitica:

- determinazione degli steroidi e altre sostanze dopanti nella medicina sportiva
- controllo in tempo reale della respirazione di pazienti anestetizzati durante gli interventi chirurgici
- determinazione dell'adulterazione del miele con sciroppi zuccherini

- individuazione di giacimenti petroliferi mediante la determinazione dei precursori del petrolio nelle rocce
- controllo in continuo dei processi di fermentazione nell'industria biotecnologica
- determinazione della presenza di diossine in alimenti contaminati
- determinazione della composizione elementare di materiali semiconduttori
- determinazione della struttura di biomolecole come carboidrati, proteine e acidi nucleici
- determinazione delle sequenze nelle catene di biopolimeri come proteine e oligosaccaridi
- determinazione dei metaboliti dei farmaci
- determinazione qualitativa e quantitativa di droghe in medicina legale
- individuazione di sostanze inquinanti per l'ambiente
- determinazione di origine ed età di campioni geochimici e archeologici
- effettuazione di analisi inorganiche multielemento con elevatissima sensibilità

## 2. Spettrometro di massa

Di seguito è riportato lo **schema di un apparecchio** per la spettrometria di massa:



S: sistema di introduzione del campione o interfaccia con altro apparecchio

C: camera di ionizzazione

A: acceleratore e focalizzatore di ioni

P: pompa per alto vuoto

AN: analizzatore

R: rivelatore

SE: sistema di elaborazione dei segnali

SC: sistema di controllo (PC)

Nello **spettrometro di massa**, grazie ai componenti presenti, viene attuata la sequenza analitica in precedenza descritta.

- il sistema di introduzione del campione S permette di vaporizzare il campione ed eventualmente di separarlo dalla matrice, oppure costituisce l'interfaccia negli apparecchi GC-MS o LC-MS nei quali si ha l'eliminazione della fase mobile e l'analisi di massa di ciascun componente di una miscela analitica, precedentemente separata con il metodo cromatografico GC o LC.
- la pompa per alto vuoto P elimina i contaminanti atmosferici e le specie chimiche non interessata alla spettrometria di massa, come ad esempio il carrier proveniente da una colonna GC. Realizza inoltre un gradiente di pressione tra S e la camera di ionizzazione ed infine rende improbabili le collisioni tra i frammenti ionici formati ed una loro eventuale ricombinazione.
- la camera di ionizzazione C, o sorgente ionica, utilizzando tecniche diverse effettua la frammentazione del campione in ioni, generalmente ioni positivi dotati di una sola carica. La camera C è accoppiata con un sistema di accelerazione e focalizzazione degli ioni A (ion gun) che produce un raggio ionico di elevata velocità e lo indirizza verso l'analizzatore.
- l'analizzatore di masse ioniche AN permette la separazione degli ioni in arrivo da A, risolvendo (cioè separando) il raggio ionico in una serie di fasci ionici con lo stesso rapporto massa/carica (m/z).
- il rivelatore R produce un segnale in corrispondenza dell'arrivo dei diversi ioni: si tratta di un moltiplicatore ionico che funziona con lo stesso principio del fotomoltiplicatore.
- il sistema di elaborazione dei dati SE acquisisce ed elabora i dati che vengono trasmessi al sistema di controllo SC, che gestisce il funzionamento dell'intero apparecchio e provvede alla presentazione e all'interpretazione dei dati in arrivo.

Ogni spettrometro è caratterizzato da un **potere risolutore o risoluzione R**, definito come:

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

dove M è la massa dello ione e  $\Delta M$  è la differenza minima di massa tra due picchi successivi separabili nello spettro di massa; è evidente che R deve essere il più grande possibile.

## 2.1. Sistema di introduzione del campione

Deve essere in grado di vaporizzare il campione: si utilizzano sistemi a bassa pressione (**alto vuoto**) in modo da eliminare i gas dell'aria, che raggiungono temperature di 300°C, per vaporizzare anche sostanze con basse tensioni di vapore, cioè poco volatili.

- per campioni liquidi o gassosi: il campione viene iniettato in un contenitore primario di pochi ml dove si lavora a  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  Torr e quindi passa a un contenitore secondario, riscaldato ad una temperatura opportuna, dove si aumenta il grado di vuoto a  $10^{-6}$ - $10^{-8}$  Torr, completando la vaporizzazione. Il vapore prodotto passa quindi alla camera di ionizzazione
- per campioni solidi: il campione viene inserito in un adatto tubo di campionamento (DIS - Direct Inlet System) portato nel sistema a vuoto a  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  Torr e quindi opportunamente riscaldato, con produzione del vapore che verrà inviato alla camera di ionizzazione

**Campioni poco volatili o termolabili** vengono introdotti direttamente nella camera di ionizzazione, all'interno di coppette metalliche inserite in blocchi riscaldati elettricamente ad alta temperatura. I vapori generati dalla coppetta passano nella camera di ionizzazione vera e propria attraverso un foro piccolissimo, per aspirazione prodotta dal vuoto della camera. Campioni con volatilità particolarmente bassa possono essere sottoposti a **derivatizzazione** con le stesse tecniche utilizzate nella GLC per renderli maggiormente volatili.

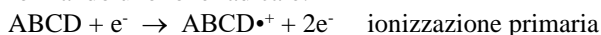
Se lo spettrometro è accoppiato a un gascromatografo o HPLC vengono usati sistemi specifici di introduzione del campione, descritti in seguito, perché in tal caso il problema è eliminare il carrier (per GC) o l'eluente (per HPLC).

## 2.2. Camera di ionizzazione

Deve produrre la **ionizzazione primaria**, cioè formare lo **ione molecolare** (parent ion), possibilmente con una sola carica (+) che, immediatamente, nella camera stessa, subirà i **processi di frammentazione**, producendo **frammenti caratteristici** a seconda della sua struttura, sempre ionici con carica singola positiva ma di massa inferiore.

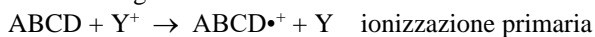
I **meccanismi di ionizzazione molecolare** possono essere diversi:

- utilizzando tecniche "hard" di ionizzazione, cioè "ad alta energia", si allontana un elettrone dalla molecola formando uno ione radicale:



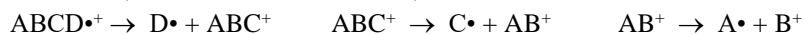
A causa della elevata energia utilizzata, lo ione radicale, che costituirà il picco molecolare (parent peak) nello spettro di massa a più alto rapporto m/z, subirà una intensa frammentazione, formando numerosi frammenti a più basso rapporto m/z, che originano uno spettro di massa piuttosto complesso. Lo ione molecolare inoltre potrebbe frammentarsi completamente e quindi il picco molecolare potrebbe essere assente dallo spettro di massa, rendendo impossibile la valutazione della massa molecolare dell'analita

- utilizzando tecniche "soft" di ionizzazione, cioè a "bassa energia" con specifici reattivi chimici, si forma in modo analogo lo ione molecolare



In questo caso la successiva frammentazione dello ione molecolare è minore e quindi lo spettro di massa risultante è relativamente semplice, il picco molecolare è sempre presente

In entrambi i casi dopo si ha la ionizzazione dello ione molecolare, che può verificarsi con diversi **meccanismi di frammentazione**:



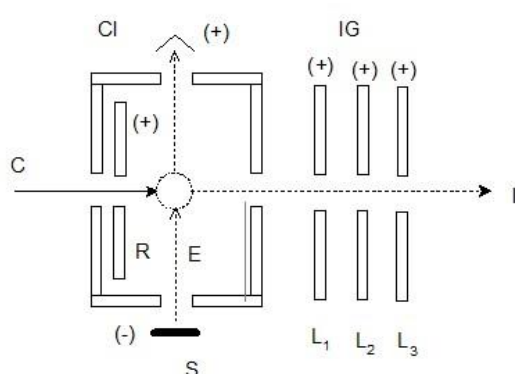
ecc. con numerose altre possibilità.

L'abbondanza relativa dei diversi frammenti dipende dalla velocità con la quale avvengono i processi di frammentazione. La **ionizzazione primaria**, cioè la formazione dello ione molecolare, avviene in tempi brevissimi (circa  $10^{-16}$  s): successivamente l'energia in eccesso viene distribuita lungo i legami della molecola sotto forma di energia vibrazionale e rotazionale e nell'arco di circa  $10^{-10}$  s ulteriori si ha la rottura dei legami più deboli e la produzione dei frammenti ionici, che risultano in maggioranza di carica (+). Sono possibili anche frammentazioni che portano a ioni negativi, che non vengono di solito utilizzati nell'analisi in quanto gli spettrometri di massa analizzano cationi.

Dopo circa un microsecondo, il campione passa dalla camera di ionizzazione all'analizzatore, per cui alcuni processi di frammentazione più lenta avverranno anche nell'analizzatore.

Le **tecniche di ionizzazione** sono numerose e si suddividono in tecniche hard (alta energia) e soft (bassa energia). Le diverse tecniche di ionizzazione vengono utilizzate in relazione alle caratteristiche del campione da analizzare, in particolare a seconda della sua volatilità e massa molecolare.

**Impatto elettronico o ionizzazione elettronica (Electron Ionisation o Electron Impact - EI):** è il sistema classico, ancora largamente utilizzato. Si tratta di una tecnica hard in cui il campione vaporizzato, proveniente dal sistema di introduzione del campione, viene bombardato con un fascio di elettroni ad alta energia prodotti per effetto termoionico da un filamento incandescente di wolframio (W) o renio (Re)



CI: camera di ionizzazione  
 IG: ion gun  
 C: campione vaporizzato  
 E: fascio di elettroni ad alta energia  
 S: sorgente di elettroni  
 R: repulsore  
 L: lenti acceleratrici  
 I: fascio ionico inviato all'analizzatore

L'**effetto termoionico** consiste nell'emissione di elettroni da parte di un metallo riscaldato ad elevata temperatura: in tali condizioni gli elettroni, che possiedono una elevata energia cinetica e che a causa del legame metallico non sono strettamente vincolati agli atomi, sfuggono dal reticolo cristallino del metallo e vengono emessi.

La sorgente S avente carica (-) costituisce l'anodo di una coppia di elettrodi, tra i quali viene applicata una d.d.p. opportuna. La sorgente viene riscaldata a temperature superiori a 1000 K e quindi, grazie all'effetto termoionico, emette elettroni, che vengono accelerati verso il catodo con carica (+) e acquisiscono una energia di circa 70 eV, ampiamente superiore al potenziale di ionizzazione delle molecole organiche di circa 8-10 eV (elettronvolt).

L'eV è una unità di misura dell'energia largamente usata in fisica atomica e subatomica. È pari all'energia cinetica acquisita da un elettrone che passa nel vuoto da un punto ad un altro che abbia un potenziale superiore di 1 Volt. Si tratta di una unità di misura relativamente piccola essendo  $1 \text{ eV} = 1,6022 \cdot 10^{-19} \text{ J}$ .

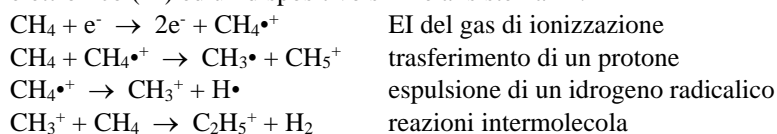
In seguito all'impatto con le molecole del campione, gli elettroni ad alta energia producono la specie radical-cationica (ione molecolare) che immediatamente dopo viene frammentata in ulteriori cationi a massa inferiore.

I frammenti così prodotti vengono respinti da una piastra metallica detta repulsore con carica (+) verso lo "ion gun", costituito da una serie di piastre circolari forate dette lenti acceleratrici, mantenute ad un potenziale positivo crescente, che respingono ulteriormente i frammenti ionici e li accelerano verso l'uscita dello ion gun, formando in tal modo il fascio ionico che viene inviato all'analizzatore.

La tecnica EI si utilizza per masse molecolari fino a 1000 Da (il Dalton coincide con l'unità di massa atomica unificata u o uma ed è pari a 1/12 della massa del  $^{12}\text{C}$  - ad esempio l'H ha una massa pari di 1 Da). Questa tecnica non si può utilizzare se il campione non è sufficientemente volatile; in alternativa si può derivatizzare ottenendo derivati dell'analita con maggior volatilità. Produce inoltre una frammentazione eccessiva, lo spettro di massa è molto complesso con molti picchi e spesso lo ione molecolare non è visibile.

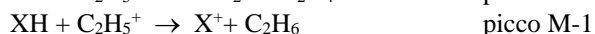
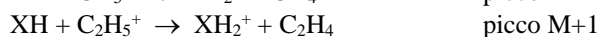
**Ionizzazione chimica (Chemical Ionisation - CI):** si tratta di una tecnica soft in cui il campione vaporizzato reagisce con opportuni ioni o radicali gassosi (ottenuti da metano, isobutano, ammoniaca o argon), prodotti in una apposita camera di ionizzazione, diversa da quella di ionizzazione del campione. Nell'apparecchio pertanto vi saranno due distinte camere di ionizzazione (primaria e secondaria).

Nella camera di ionizzazione primaria è presente una elevata quantità di gas reagente, ad esempio  $\text{CH}_4$ , che viene bombardato con elettroni veloci di elevata energia (100-500 eV) con una tecnica di ionizzazione a impatto elettronico (EI) ed un dispositivo simile al sistema EI:



Gli ioni-radicali formati sono dei "super acidi" di Bronsted, cioè hanno una elevatissima tendenza a cedere  $\text{H}^+$  o prendere degli  $\text{H}^-$  per neutralizzarsi e stabilizzarsi. Dopo la loro formazione vengono inviati nella camera di

ionizzazione secondaria dove incontrano le molecole XH di campione vaporizzato e le ionizzano a loro volta formando ioni molecolari stabili, ma con frammentazione molto minore della tecnica EI:

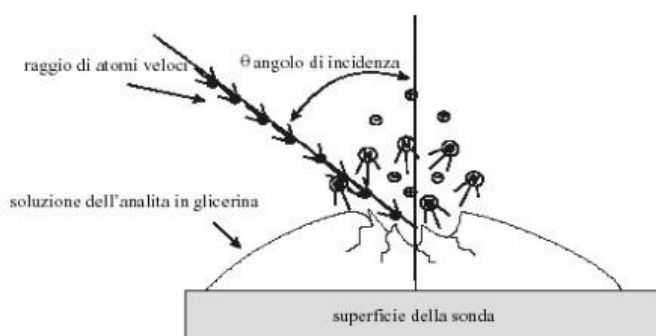


ecc. con formazione di picchi M+1, M+2, M-1 o anche M+29 (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)

In questo modo si hanno meno frammenti, si distingue di solito chiaramente lo ione molecolare e quindi è più agevole chiarire il meccanismo di frammentazione e quindi la struttura delle molecole costituenti il campione.

I frammenti prodotti nella camera di ionizzazione secondaria vengono inviati all'analizzatore. Si utilizza per masse molecolari fino a 1000 Da.

**Bombardamento con atomi veloci (Fast Atom Bombardment - FAB):** il campione viene sciolto o disperso in una goccia di glicerina o sostanze viscosi simili (tioglicerina, alcol nitrobenzilico, dietilammina, ecc) con bassa tensione di vapore. Tale miscela analitica viene posta su di una sonda e quindi viene bombardata con un fascio di atomi pesanti neutri (Ar o Xe) eccitati ad elevata energia (6-10 keV), prodotti da un apposito generatore.



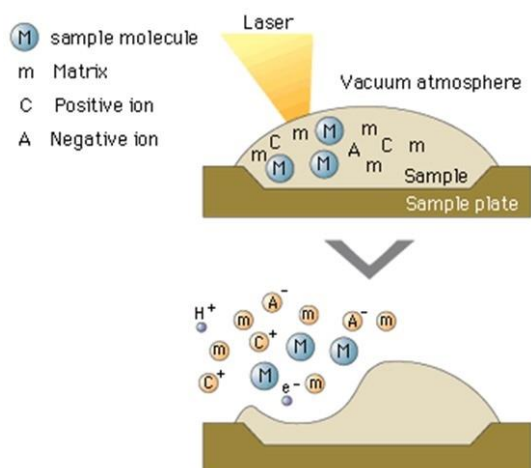
Gli impatti degli atomi pesanti contro la superficie della goccia proiettano via molecole di miscela e, a causa della elevata temperatura che si raggiunge, si ha la ionizzazione delle molecole di campione e una loro frammentazione molto bassa, a causa dei tempi molto brevi di riscaldamento. Gli ioni formati vengono avviati all'analizzatore per la separazione e l'analisi.

Con questa tecnica si possono analizzare anche campioni non volatili come polisaccaridi e tensioattivi.

Si utilizza per campioni con masse molecolari più elevate rispetto alle tecniche EI e CI, fino a circa 6000 Da e quindi con volatilità molto bassa, tale da non poter essere vaporizzati come richiesto dalle tecniche di ionizzazione EI e CI. Il FAB è adatto a molecole polari che possono subire reazioni acido-base (glicosidi, peptidi, alcaloidi, ecc.); lo ione molecolare è sempre ben visibile e spesso compaiono anche alcuni picchi di frammentazione che aiutano nella determinazione della struttura molecolare. Il limite del FAB è costituito dalla ionizzazione della matrice, che produce un elevato rumore di fondo

**Desorbimento laser (Laser Desorbment - LD):** il campione viene depositato su di una superficie metallica sottovuoto e quindi riscaldato con una serie di brevi impulsi laser. Il rapido e intenso riscaldamento causa la vaporizzazione del campione e la formazione praticamente di soli ioni molecolari, senza frammentazione. Ciò permette la determinazione delle masse molecolari con grande precisione: si misurano masse molecolari tra 500 e 200.000 Da con una precisione dello 0,01% e quindi questa tecnica di ionizzazione apre grandi possibilità per le applicazioni nel campo della biochimica.

**Desorbimento laser assistito da matrice (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - MALDI):** è una variante della tecnica LD molto utile per campioni organici a bassa volatilità.



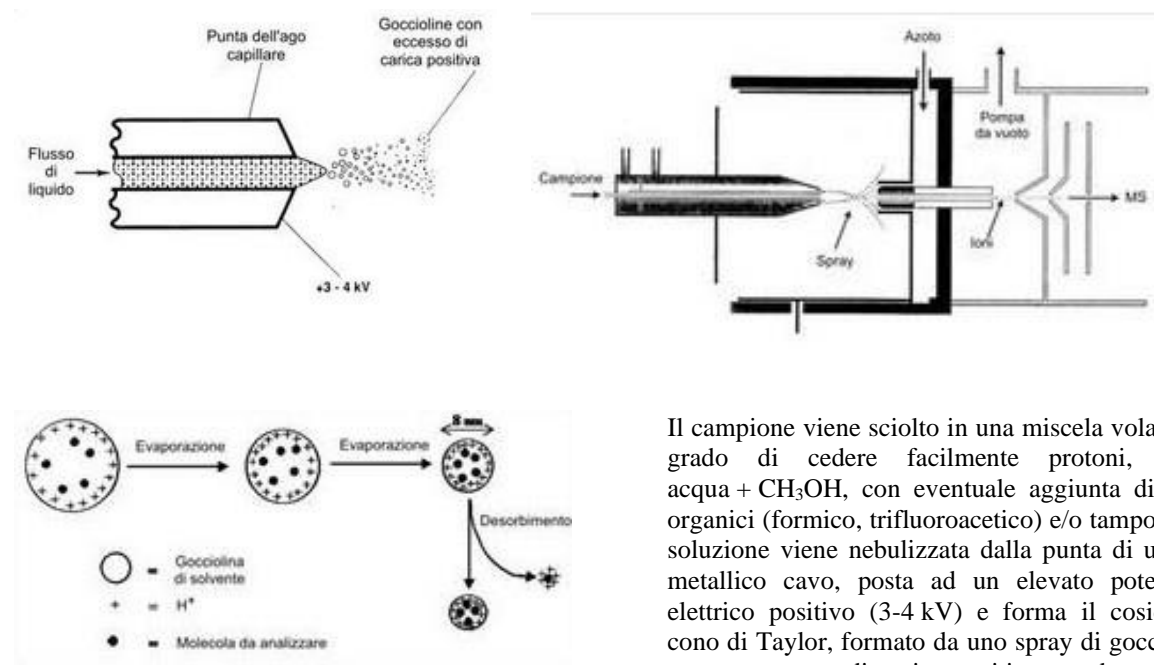
Il campione viene disperso in una matrice solida in grado di assorbire la lunghezza d'onda del fascio laser, per esempio a 337 nm, radiazione UV prodotta da un laser ad azoto, ed essere in grado di fornire protoni, in modo da favorire la ionizzazione dell'analita.

Si utilizza di solito come matrice l'acido 2,5-diidrossibenzoico DHB o derivati dell'acido cinnammico, in grado di assorbire intensamente in UV, nei quali viene disperso il campione con glicerina come solvente: la soluzione viene depositata su di una lastra con una piccola cavità, dove il solvente evapora e forma cristalli misti di matrice e campione.

I fotoni laser ad alta energia che colpiscono la matrice solida vengono da questa assorbiti e quindi ne provocano la vaporizzazione, trascinando nel vapore anche il campione, che viene ionizzato dal fascio laser e quindi avviato all'analizzatore.

La tecnica MALDI è utilizzata per polimeri sintetici e macromolecole biologiche come proteine, peptidi e nucleotidi fino a masse molecolari dell'ordine di 500.000 Da.

**Desorbimento per ionizzazione elettrospray (ElectroSpray Ionisation - ESI):** è una tecnica molto usata, in particolare per interfacciare una colonna HPLC con uno spettrometro di massa, dato che permette l'eliminazione del solvente durante la formazione degli ioni.



Il campione viene sciolto in una miscela volatile in grado di cedere facilmente protoni, come acqua + CH<sub>3</sub>OH, con eventuale aggiunta di acidi organici (formico, trifluoroacetico) e/o tamponi. La soluzione viene nebulizzata dalla punta di un ago metallico cavo, posta ad un elevato potenziale elettrico positivo (3-4 kV) e forma il cosiddetto cono di Taylor, formato da uno spray di goccioline con un eccesso di carica positiva, prodotta da un eccesso di ioni H<sup>+</sup>. All'interno delle gocce le molecole di analita vengono protonate mentre il solvente evapora e la densità di carica della goccia aumenta

Lo spray viene richiamato da un flusso di gas (N<sub>2</sub>) attraverso un capillare riscaldato che ne favorisce la desolvatazione; infine la goccia "esplode" a causa della repulsione elettrostatica degli ioni positivi (desorbimento o desolvatazione), creando una corrente di ioni nudi, che vengono richiamati nella zona ad alto vuoto dell'apparecchio, dove un pompaggio selettivo abbassa la pressione fino a circa 10<sup>-3</sup> Torr e dove un gradiente di campo positivo li accelera verso lo spettrometro di massa vero e proprio.

La tecnica ESI tende a formare ioni multicarica: molecole organiche come le proteine possono avere anche decine di cariche (+) diverse e ciò permette di abbassare la densità del rapporto m/z degli ioni, consentendo l'analisi degli ioni anche ad analizzatori standard. La stessa molecola può possedere varie cariche e quindi nello spettro si formano più picchi riconducibili alla stessa sostanza. Nella ESI non si ha praticamente frammentazione per cui è facile l'individuazione dello ione molecolare e la misura della massa molecolare. La tecnica è adatta a molecole con masse molecolari molto diverse, da piccole molecole organiche a proteine, purché abbiano siti protonabili. I solventi usati non producono apprezzabile rumore di fondo come nella FAB.

### 3. Analizzatore

È il dispositivo che permette la scansione degli ioni in funzione del rapporto m/z e la loro separazione con produzione di distinti segnali da parte del rivelatore. In genere la separazione tra gli ioni viene attuata mediante la combinazione di campi elettrici e magnetici. Esistono diversi tipi di analizzatore che caratterizzano i diversi spettrometri di massa.

**Analizzatore a focalizzazione elettromagnetica:** utilizza come analizzatore la combinazione di un campo elettrico e un campo magnetico. In questo apparecchio il fascio di ioni prodotto dallo ion gun attraversa prima un focalizzatore elettrostatico e quindi un potente campo magnetico, secondo la configurazione a doppia focalizzazione proposta da Nier e Johnson. Il settore elettrostatico comprende due piatti metallici tra i quali viene

applicato il potenziale elettrico V di 6-8 kV, che forniscono agli ioni prodotti dallo ion gun con energia diversa, la stessa energia cinetica:

$$V \cdot z = \frac{1}{2} m \cdot v^2$$

dove V è il potenziale elettrico, z è la carica dello ione, m la sua massa e v la sua velocità. Il settore elettrostatico non effettua alcuna separazione degli ioni ma si limita a uniformare loro energie cinetiche, compensando le loro diverse velocità iniziali, focalizzandole su di un unico valore.

Gli ioni in seguito attraversano il settore magnetico, costituito da un tubo curvo con raggio di curvatura r' (tubo di volo) ed un magnete ortogonale ad esso: la Fisica indica che una particella carica che si muove di moto rettilineo in un campo magnetico viene deviata lateralmente e segue una traiettoria circolare in seguito alla forza di Lorentz, che produce sullo ione sia una forze centripeta  $F_H$  sia una forza centrifuga  $F_C$ . Perché lo ione soggetto alla forza di Lorentz possa attraversare il tubo curvo dell'analizzatore di raggio r' dovrà compiere una traiettoria curva con raggio r in modo che  $r = r'$ , altrimenti non uscirà dall'analizzatore ed urterà le pareti del tubo.

$$F_H = H \cdot z \cdot v \quad \text{forza centripeta}$$

dove H è l'intensità del campo magnetico

$$F_C = \frac{m \cdot v^2}{r} \quad \text{forza centrifuga}$$

dove r è il raggio di curvatura della traiettoria. Quando lo ione percorre la traiettoria curva si ha l'equilibrio di tali forze:  $F_H = F_C$  e quindi:

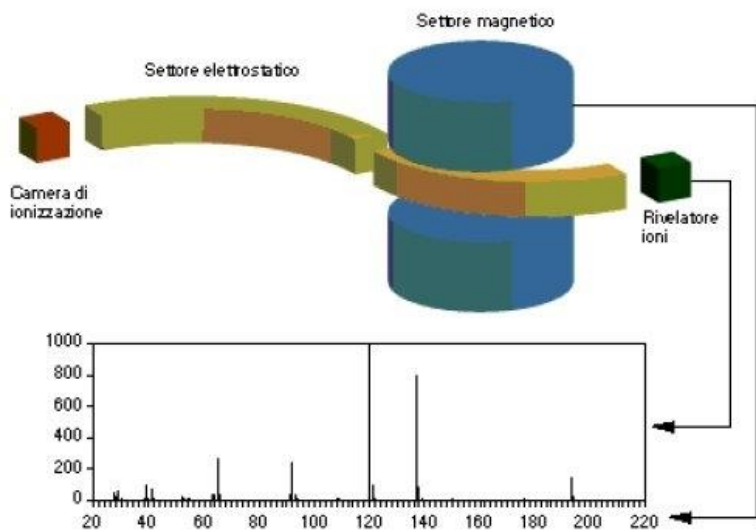
$$H \cdot z \cdot v = \frac{m \cdot v^2}{r} \quad \text{da cui si ricava r:} \quad r = \frac{m \cdot v^2}{H \cdot z \cdot v} \quad r = \frac{m \cdot v}{H \cdot z}$$

Dall'espressione dell'energia cinetica dello ione impartita dal settore elettrostatico si ricava la velocità v, che si sostituisce nell'equazione appena ricavata:

$$V \cdot z = \frac{1}{2} m \cdot v^2 \quad v^2 = \frac{2 \cdot V \cdot z}{m} \quad v = \frac{\sqrt{2 \cdot V \cdot z}}{m^{1/2}}$$

$$r = \frac{m \cdot v}{H \cdot z} \quad r = \frac{m}{H \cdot z} \cdot \frac{\sqrt{2 \cdot V \cdot z}}{m^{1/2}} = \frac{m^{1/2} \cdot \sqrt{2 \cdot V}}{H \cdot z^{1/2}} \quad r = \frac{\sqrt{2 \cdot V \cdot m/z}}{H}$$

Questa equazione dimostra che, per una determinata coppia di valori di campo elettrico V e campo magnetico H, il raggio di curvatura della traiettoria seguita dallo ione dipende solo dal rapporto m/z. Nell'analizzatore si lavora di solito mantenendo V costante e variando H con continuità (scansione di H): in tal modo la condizione  $r = r'$  che permette il passaggio dello ione attraverso il tubo di volo e l'arrivo al rivelatore di ioni con produzione del segnale analitico, viene raggiunta per diversi valori di H in relazione al rapporto m/z e in definitiva si ha in tal modo la separazione degli ioni in arrivo dalla camera di ionizzazione e dallo ion gun.

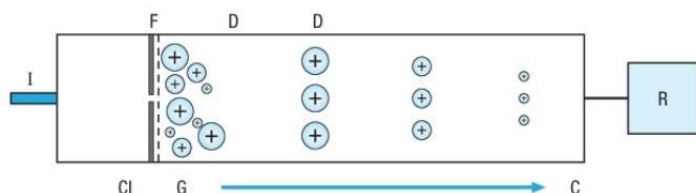


Riassumendo quanto detto, l'azione combinata del campo elettrico fisso del settore elettrostatico e del campo magnetico variabile del settore magnetico permette agli ioni di arrivare in tempi diversi al rivelatore che produce segnali diversi in relazione al diverso rapporto m/z. I diversi segnali vengono acquisiti in funzione della scansione del campo magnetico e quindi di m/z ed il sistema di elaborazione del segnale produce lo spettro di massa.

**Analizzatore a tempo di volo (Time of Flight - TOF):** il TOF non usa la deflessione magnetica per separare gli ioni prodotti dalla camera di ionizzazione ma utilizza una accelerazione lineare.

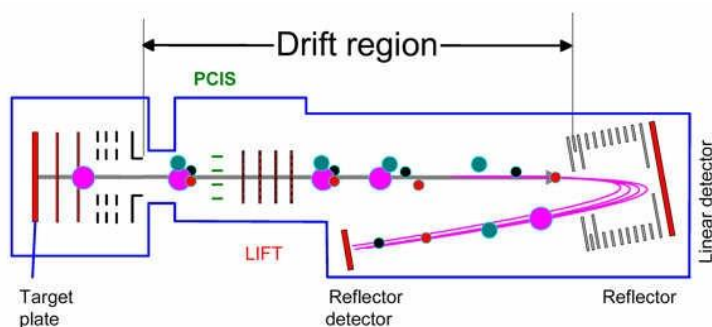
All'uscita della ion gun gli ioni possiedono tutti la stessa energia cinetica  $1/2 m \cdot v^2$  ma diversa velocità, dato che hanno diversa massa: gli ioni con massa minore sono più veloci di quelli con massa maggiore. Lasciandoli correre in una regione libera, in pratica in un tubo ad alto vuoto di lunghezza adeguata, raggiungeranno il rivelatore in tempi diversi, in relazione al loro rapporto m/z.





- I: ingresso campione
- CI: camera di ionizzazione
- F: fenditura di entrata
- G: griglia di controllo
- D: tubo di deriva (o di volo)
- C: collettore
- R: rivelatore

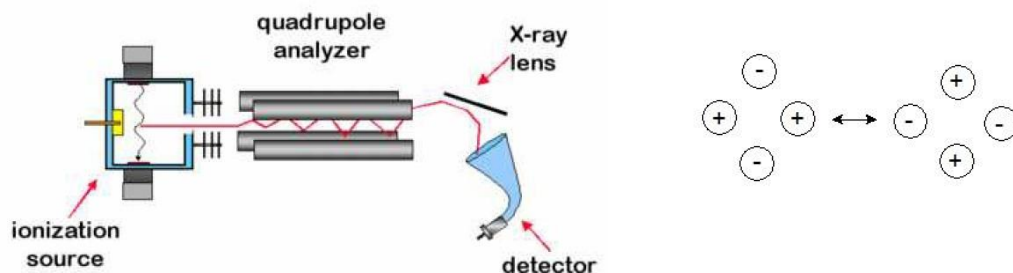
Nell'analizzatore TOF a percorso lineare gli ioni prodotti dalla camera di ionizzazione entrano tramite la fenditura F nel tubo di volo, dove una griglia di controllo a tensione pulsata produce impulsi brevissimi che accelerano gli ioni e li lanciano attraverso il tubo di volo, dove si separano in base alle loro dimensioni. Gli ioni più piccoli (minor rapporto  $m/z$ ) arriveranno prima al collettore ionico e quindi al rivelatore, mentre gli ioni con maggior rapporto  $m/z$  arriveranno dopo. Questo tipo di analizzatore ha una elevata sensibilità ma un modesto potere risolutivo, cioè non distingue bene le masse tra loro, perché anche ioni identici non si muoveranno esattamente alla stessa velocità e quindi tenderanno a disperdersi nel tubo di volo.



L'analizzatore Reflectron TOF è una recente evoluzione del TOF e permette di superare il problema del basso potere risolutivo. Al termine del tubo di deriva è presente un riflettore ionico: gli ioni più piccoli e veloci penetrano più in profondità nel riflettore, percorrendo traiettorie più lunghe rispetto agli ioni più grandi, prima di essere inviati al rivelatore.

Di conseguenza ioni più o meno veloci ma di ugual massa arriveranno con una maggiore sincronia al rivelatore. Ciò permette, regolando in modo opportuno i vari potenziali applicati, di far arrivare al rivelatore bande compatte di ioni identici, raggiungendo un potere risolutivo di  $10^4$ , confrontabile con gli altri rivelatori. Il TOF è molto versatile ed utilizzato in particolare insieme alla tecnica MALDI, formando degli spettrometri denominati MALDI-TOF.

**Analizzatore a quadrupolo:** in questo analizzatore la separazione degli ioni viene ottenuta mediante 4 aste metalliche cilindriche, collegate diagonalmente a coppie opposte, con tensione dello stesso segno. A tutte le aste viene applicato un campo di radiofrequenza, che varia continuamente la polarità delle coppie di aste.

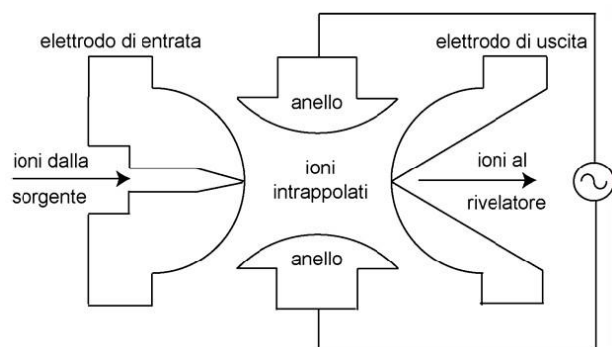


All'interno del quadrupolo si crea un campo elettrico iperbolico, che devia lateralmente gli ioni e li costringe a complicate traiettorie in funzione del rapporto  $m/z$ . Solo alcuni ioni riescono ad attraversare il quadrupolo, in funzione della radiofrequenza applicata, e arrivano al rivelatore, mentre gli altri vengono dispersi. Con una opportuna scansione di radiofrequenze è possibile selezionare gli ioni in funzione del loro rapporto  $m/z$  e ottenere lo spettro di massa. Il sistema funziona come un vero e proprio filtro di massa.

Questo analizzatore ha una bassa risoluzione (qualche decimo di Dalton) ma trova le sue applicazioni soprattutto in apparecchi di accoppiamento tra massa e sistemi cromatografici, in cui le diverse sostanze del campione entrano nello spettrometro di massa già separate tra loro.

**Analizzatore a trappola ionica (Ion Trap Detector - ITD):** anche questo analizzatore viene utilizzato come rivelatore in sistemi di accoppiamento MS-GC o MS-HPLC, cioè con sistemi cromatografici di separazione che precedono lo spettrometro di massa vero e proprio nei quali viene inserito il campione da analizzare.

L'analizzatore ITD è una evoluzione del quadrupolo, in cui sono presenti tre elettrodi: un elettrodo di entrata degli ioni, uno di uscita ed un elettrodo ad anello, che delimitano un piccolo volume in vengono confinati gli ioni.

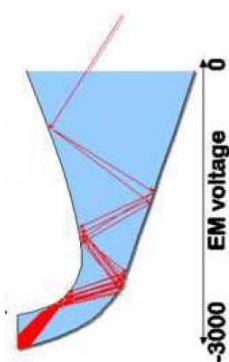


Gli ioni provenienti dalla camera di ionizzazione, di solito un EI o CI, entrano nella trappola ionica attraverso un piccolo foro dell'elettrodo di entrata. All'elettrodo anulare viene applicato il campo di radiofrequenze che intrappola gli ioni; variando opportunamente tale campo gli ioni intrappolati vengono espulsi selettivamente, in funzione del loro rapporto  $m/z$  ed escono dal piccolo foro presente nell'elettrodo di uscita per andare al rivelatore.

L'ITD è un analizzatore molto sensibile, di ridotta manutenzione e costi contenuti, adatto all'analisi di campioni con matrice non molto complessa e analiti con massa molecolare non troppo elevata.

#### 4. Rivelatore di ioni

Registra gli ioni prodotti e fornisce il segnale che permette di costruire lo spettro di massa. In genere funzionano mediante **impatto ionico** e sono simili ai fotomoltiplicatori (che funzionano per impatto elettronico). Possono essere a coppie di dinodi o a superficie continua.



La superficie interna del rivelatore ricoperta di materiale in grado di emettere elettroni e viene mantenuta ad un potenziale negativo crescente, fino a circa 3 kV. Quando un singolo ione colpisce la superficie interna, produce l'emissione di un elettrone, che viene accelerato dal crescente campo elettrico e quindi, quando colpisce a sua volta la superficie, produce una emissione secondaria di più elettroni, ecc. Si produce quindi una "cascata" di elettroni che ha come conseguenza una netta amplificazione del segnale.

Il flusso di corrente prodotto viene amplificato e quindi convertito in un segnale registrabile. Il sistema è così sensibile che può rivelare l'arrivo di un singolo ione, che produrrebbe una corrente ionica di  $10^{-20}$  A, non rivelabile senza l'effetto di amplificazione

#### 5. Sistema di elaborazione e presentazione dei dati

Tutti gli spettrometri di massa sono interfacciati a un PC, che gestisce tutte le fasi analitiche, compresa l'interpretazione dei dati, tramite il collegamento a vaste banche dati e collezioni di spettri di massa campione.

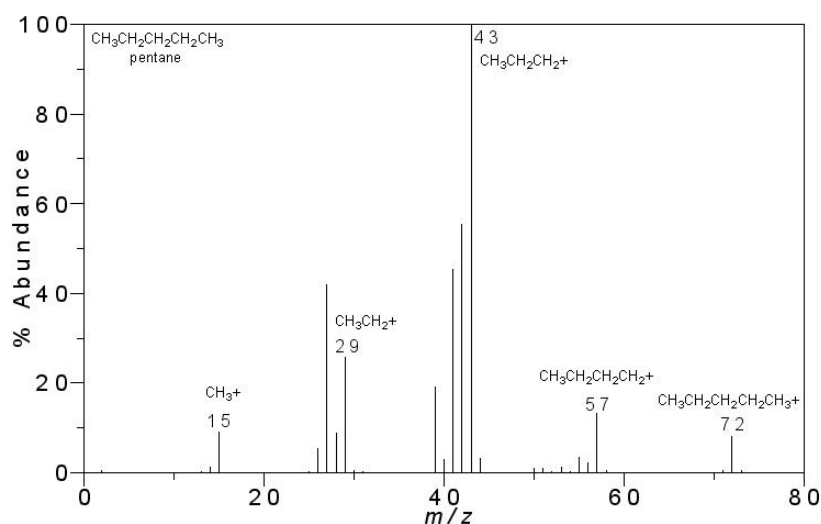
Il PC raccoglie i dati inviati dal rivelatore, li elabora e li presenta in forma grafica, come spettro di massa, in cui i picchi sono normalizzati: ogni picco è rappresentato da una riga, a cui corrisponde la massa di uno ione, la cui altezza è definita abbondanza relativa. La normalizzazione dello spettro pone uguale a 100 l'altezza della riga più intensa (picco base). L'altezza delle righe è proporzionale alla concentrazione degli ioni.

Come **esempio** viene presentato di seguito lo spettro di massa del n-pentano:

- il picco con massa pari a 72 è lo ione molecolare
- il picco con massa 43 è il picco base e rappresenta il propile, evidentemente ottenuto mediante perdita di un etile; è il frammento ionico più stabile: infatti ha abbondanza relativa pari a 100
- si notano altri frammenti abbastanza stabili quali il metile (massa 15), l'etile (massa 29) il butile (massa 57) ottenuto evidentemente dalla perdita di un metile dallo ione molecolare.

Da notare che, in questo caso, lo ione molecolare non è il frammento più stabile, in quanto il suo picco non è il più alto: dipende dal processo di frammentazione hard o soft che è stato utilizzato.

Studiando lo spettro di una molecola incognita e i suoi frammenti si possono ricavare indicazioni sulla struttura della molecola oltre che sulla sua massa molecolare.



## 6. Sistemi di massa accoppiata (separazioni/massa)

L'accoppiamento della MS ad altre tecniche, in particolare tecniche di separazione cromatografiche, ha aumentato enormemente le possibilità analitiche dei metodi basati sul rapporto  $m/z$ .

**Accoppiamento MS-MS (Tandem Mass Spectroscopy - TMS):** nella TMA vengono accoppiati due spettrometri di massa. Nel primo, che funziona da separatore, viene introdotto il campione da analizzare e si attua una frammentazione semplice, per separare solo gli ioni rappresentativi di un certo composto o gli ioni più interessanti. Nel secondo, che funziona da analizzatore, vengono introdotti gli ioni prodotti dal primo apparecchio e vengono ulteriormente frammentati per ottenere il caratteristico spettro di massa. Si usano in genere analizzatori a quadrupolo, di costo contenuto. Si utilizzano sistemi di ionizzazione di tipo soft, come ad esempio la ionizzazione chimica CI. Il sistema MS-MS è caratterizzato da grande specificità ed elevata sensibilità.

**Accoppiamento GC-MS:** la MS è il rivelatore ideale per la gascromatografia. Il sistema gascromatografico è in grado di separare i singoli componenti di miscele anche molto complesse, che vengono inviati, uno alla volta, allo spettrometro di massa che analizza in tempo reale i singoli picchi di eluizione per determinarne la struttura molecolare. Il GC è dotato di un suo rivelatore, che deve evidenziare l'uscita di ogni componente, che dovrà essere di tipo non distruttivo: ad esempio non può essere utilizzato il FID!

Il PC che gestisce il sistema raccoglie sia i dati gascromatografici che quelli spettrometrici e li presenta insieme: ogni picco del gascromatogramma è associato ad uno spettro di massa, che permette di individuare con grande precisione il componente analitico.

Il GC e la MS devono essere collegati mediante una opportuna interfaccia, che permetta l'eliminazione del carrier, in quanto incompatibile con l'ambiente ad alto vuoto dello spettrometro di massa. Utilizzando colonne capillari con diametri non superiori a 0,2-0,3 mm, dove il flusso del carrier è molto piccolo, si utilizza come interfaccia il collegamento diretto tra i due apparecchi, che garantisce la maggiore sensibilità in quanto non si ha perdita di sostanze da analizzare. Utilizzando colonne capillari con diametri maggiori si utilizza come interfaccia il sistema open-split: una pompa ad elevata efficienza rimuove una parte del gas di trasporto, uscente dal GC e naturalmente elimina anche una parte del campione, con diminuzione della sensibilità.

**Accoppiamento LC-MS:** questo accoppiamento è più difficile del precedente, in quanto è necessario eliminare totalmente l'eluente liquido prima della fase di ionizzazione, che richiede un altro grado di vuoto. Di solito si utilizzano particolari interfacce che lavorano a pressione atmosferica (API - Atmospheric Pressure Ionisation), come ad esempio il sistema di ionizzazione elettrospray (ESI) già descritto.

**Accoppiamento ICP-MS:** è uno dei più recenti sistemi di massa accoppiata ed è utilizzato soprattutto per campioni inorganici (analisi inquinanti nelle acque, terreni, alimenti, ecc.). Consiste nel prelevare gli ioni eccitati formati nella torcia ICP e trasferirli in un analizzatore a quadrupolo, dove vengono separati in base al rapporto  $m/z$  e rivelati da un moltiplicatore ionico. Il sistema ICP-MS ha una sensibilità che può essere superiore all'ICP ottico e può determinare fino a circa 80 elementi contemporaneamente, con la sola esclusione dei gas nobili e dei transuranici, con elevata sensibilità ed elevato intervallo di linearità.

## 7. Analisi qualitativa

In uno **spettro di massa** si possono riconoscere:

- ioni molecolari, che permettono di determinare la massa molecolare della sostanza
- ioni isotopici, che permettono di risalire alla formula molecolare
- ioni di frammentazione, di riarrangiamento, metastabili e di interazione ione-molecola, che danno informazioni strutturali
- ioni multicarica, che permettono lo studio delle macromolecole

E' quindi evidente che lo studio dello spettro di massa, pur essendo in grado di fornire molte informazioni, è un processo di grande complessità e si presta a numerosi errori.

Lo **studio qualitativo dello spettro** può avere due diverse finalità:

- analisi di ricerca: verificare la presenza di una determinata specie chimica nella miscela analitica
- analisi di riconoscimento: interpretazione dello spettro di una sostanza pura allo scopo di determinarne la struttura

A tale scopo la **sequenza analitica** dello spettro di massa è la seguente:

- identificazione e conferma dello ione molecolare
- studio dei frammenti registrati
- assegnazione della possibile struttura

### 7.1. Identificazione e conferma dello ione molecolare

Lo ione molecolare fornisce indicazioni sulla composizione elementare della sostanza e sul suo grado di insaturazione. Per evidenziare bene lo ione molecolare sono necessarie tecniche di ionizzazione soft, che consentono una sua modesta frammentazione che, in questo caso, deve essere limitata perché è interessante determinare anche la massa molecolare della sostanza incognita.

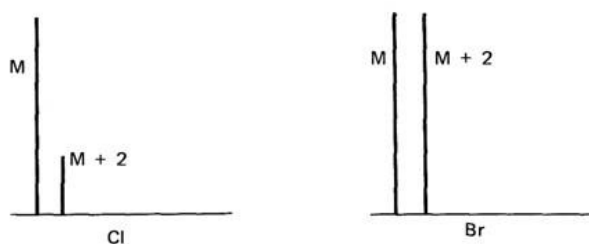
L'identificazione del picco molecolare tiene conto di due fattori:

- il rapporto  $m/z$
- l'abbondanza dello ione, espressa dalla sua altezza relativa nello spettro, che dipende dalla sua stabilità nel breve tempo (circa  $10^{-5}$  s) in cui avviene la sua rivelazione. In generale lo ione molecolare è più stabile se possiede una struttura con elettroni  $\pi$ , aromatica o ciclica

I **requisiti** perché un picco corrisponda allo ione molecolare sono i seguenti:

Deve essere il picco a massa più alta dello spettro, nell'ipotesi che stia analizzando una sostanza pura, perché in presenza di una miscela non separata preliminarmente si ottiene la somma di tutti gli spettri di massa dei vari componenti, che spesso non è interpretabile. La regola è sempre valida ma deve tener conto della presenza degli eventuali **picchi isotopici**.

E' noto che vari elementi chimici si presentano in natura come miscele di isotopi, con stesso numero atomico ma diverso numero di massa e quindi massa atomica leggermente diversa, che produrrebbero un distinto segnale nello spettro di massa. Nella maggior parte dei casi prevale nettamente l'isotopo più leggero, con alcune eccezioni, tra cui il Cl e il Br.



Il Cl esiste in natura come isotopo  $^{35}\text{Cl}$  e  $^{37}\text{Cl}$  con un rapporto 100:32,5

Il Br esiste in natura come isotopo  $^{79}\text{Br}$  e  $^{81}\text{Br}$  con un rapporto 100:98

Ciò significa che se una molecola contiene Cl o Br saranno visibili nello spettro due picchi a  $M$  e  $M+2$  con i relativi rapporti tra le altezze, sia per lo ione molecolare che per qualsiasi altro ione che contenga i suddetti atomi. Ovviamente è vero anche il contrario: se due picchi differiscono di 2 unità di massa e le altezze sono nel rapporto previsto, significa che contengono atomi di Cl o di Br.

Deve essere uno ione a numero di elettroni dispari: nella frammentazione si formano ioni radicali del tipo  $\text{A}\cdot^+$  in cui è stato perso un elettrone e quindi la sua massa è rimasta praticamente inalterata. Per valutare se è presente un numero di elettroni pari o dispari si ricorre alla formula empirica del grado di insaturazione ( $gi$ ):

$$gi = x - \frac{y}{2} + \frac{z}{2} + 1 \quad \text{riferito alla formula bruta } \text{C}_x\text{H}_y \text{ (o alogeno) N}_z$$

da notare che l'O non compare.

Se, applicando la formula ad uno ione, si ottiene un numero intero allora si tratta di uno ione radicale a elettroni dispari, mentre se si ottiene un numero decimale allora si tratta di uno ione a elettroni pari e quindi di un frammento. Per esempio per lo ione molecolare del fenolo  $C_6H_6O^+$  ( $m/z = 94$ ) si ottiene  $g_i = 4$  perché possiede 3 doppi legami e un anello, quindi si conferma che si tratta di uno ione radicale che potrebbe costituire uno ione molecolare. Nel caso dello ione  $CH_3CO^+$  ( $m/z = 43$ ) si ha  $g_i = 1,5$  e quindi si tratta di un frammento e non di uno ione molecolare

Deve poter spiegare gli ioni a massa elevata dello spettro in base a perdite logiche di specie neutre. Lo ione molecolare di un acido carbossilico ad esempio perderà facilmente  $CO_2$  (massa 44).

## 7.2. Studio dei frammenti registrati

La frammentazione di uno ione molecolare dipende dalle energie di attivazione dei suoi legami e dall'energia totale che lo ha investito nella camera di ionizzazione. Più grande è stata quest'ultima, maggiore sarà stata la frammentazione.

Lo **studio del percorso di frammentazione** è molto complesso, perché possono avvenire moltissime reazioni, tra cui:

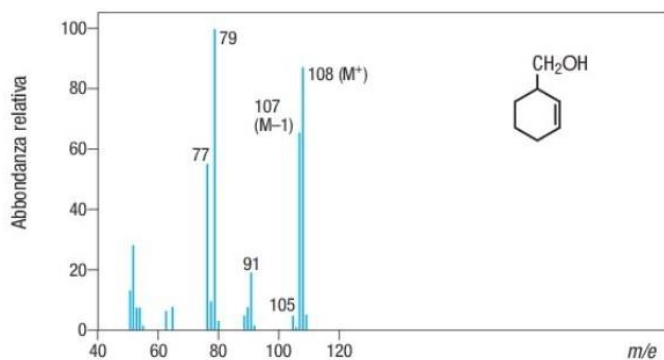
- scissioni primarie, che interessano lo ione molecolare
- scissioni secondarie, che interessano i frammenti che possiedono ancora un eccesso di energia
- scissioni semplici, con rottura omolitica (produce radicali) o eterolitica (produce cationi e anioni) di un legame semplice tra due atomi
- scissioni multiple e riarrangiamenti molecolari, con rottura di due legami covalenti

La stabilità dello ione molecolare e dei vari frammenti dipende in varia misura dall'effetto induttivo e dall'effetto di risonanza, che permettono di formulare alcune semplici **regole per l'interpretazione dello spettro di massa**:

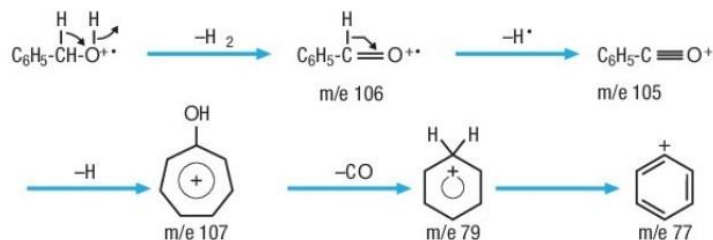
- a) l'intensità relativa (abbondanza) dello ione molecolare diminuisce all'aumentare della massa molecolare all'interno di una serie omologa e al crescere della ramificazione
- b) ioni molecolari intensi si osservano solo per composti aromatici o ciclici e comunque per i composti insaturi
- c) la rottura dei legami avviene preferenzialmente lungo le ramificazioni di catena, con eliminazione del ramo più lungo
- d) gruppi elettronegativi tendono a staccarsi come radicali lasciando un carbocatione
- e) sono favorite le reazioni che portano a carbocationi terziari piuttosto che primari
- f) gli ioni stabilizzati per risonanza si formano più facilmente e in quantità più abbondante
- g) i composti ciclici saturi con catene laterali danno rotture in  $\alpha$  all'anello, lasciando la carica positiva sul frammento dell'anello
- h) i composti aromatici con gruppi alchilici laterali (areni) danno rottura in  $\beta$  all'anello e lasciano la carica sul gruppo  $-CH_2$  collegato all'anello, poi inglobato nell'anello in seguito ad un riarrangiamento, che forma alla fine lo ione aromatico tropilio ad elevata stabilità per risonanza
- i) eteroatomi come S, O e N danno rottura in  $\alpha$  con formazione di uno ione nel frammento che contiene l'eteroatomo, che lo stabilizza per risonanza
- j) sono comuni le migrazioni di atomi di H sulle molecole con eteroatomi
- k) è abbastanza comune l'eliminazione di molecole neutre

I diversi gruppi funzionali tendono a frammentarsi eliminando piccole molecole stabili caratteristiche:  $H_2O$  (massa 18) per gli alcoli alifatici,  $CO_2$  (massa 44) per gli acidi carbossilici e derivati, ecc.

A titolo di **esempio** è riportato lo studio della frammentazione dell'alcol benzilico:



#### Probabile meccanismo di frammentazione



#### Struttura di risonanza dello ione tropilio



### 7.3. Assegnazione della possibile struttura

Oggi non si procede più manualmente ma si utilizzano tutte le risorse software e la potenza di elaborazione dei PC attuali. I software di analisi dei dati spettrometrici si basano su tre diversi approcci:

1. **Metodi comparativi** o di ricerca di biblioteca (library search): si paragona lo spettro incognito a quelli presenti in vastissimi database, on-line oppure off-line, a cui il PC accede e quindi comunica in tempi brevissimi i risultati con le strutture ritenute più probabili. E' un sistema molto efficiente, in quanto sono catalogati circa 400.000 spettri di massa diversi, praticamente tutti i composti chimici di interesse analitico
2. **Metodi statistici** o di riconoscimento di tipologie (pattern recognition): il PC ricorre a correlazioni empiriche spettro-struttura che ne permette la collocazione in tipologie predefinite di strutture
3. **Metodi teorici di interpretazione** o di "intelligenza artificiale": esistono software che si avvalgono anche di dati ottenuti con altre spettroscopie (IR, ecc.) oppure elaborano in proprio possibili percorsi di frammentazione, sulla base di algoritmi che "imparano" anche dall'esperienza, confrontando i risultati teorici con lo spettro pratico

Questi metodi sono efficaci quando si analizzano sostanze pure ma sono inadeguati quando il campione è costituito da una miscela. Nell'**analisi di miscela** si ricorre ad altre tecniche:

- si procede a separazioni cromatografiche preliminari oppure si utilizzano strumenti di massa accoppiata per analizzare un solo componente delle miscele alla volta
- si imposta lo strumento per ricercare solo masse specifiche di sostanze di cui si conosce la massa molecolare. Questa procedura è detta **rivelazione di ioni selezionati o SIM** (Selected Ion Monitoring)

### 8. Analisi quantitativa

La spettrometria di massa può essere utilizzata anche per l'analisi quantitativa in specifici contesti, come ad esempio lo studio degli inquinanti ambientali (aria, acqua, alimenti, ecc.). Si tratta di campioni in cui l'analita è presente in concentrazione molto bassa in miscele molto complesse.

Il parametro quantitativo è l'altezza del picco dello ione molecolare dell'analita, confrontato con quello di standard nella costruzione di una retta di lavoro. E' necessario che il picco dell'analita non sia sovrapposto con altri; in tal caso si procede con la tecnica SIM di rivelazione, in modo da eliminare i picchi interferenti nella registrazione dello spettro di massa. In questi casi si ricorre anche alla massa accoppiata: GC-MS o LC-MS, oppure ICP-MS per analiti inorganici.