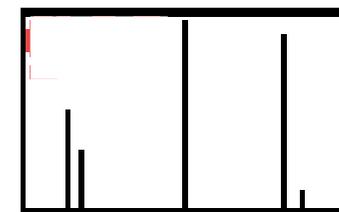


METODI FISICI IN CHIMICA ORGANICA



Spettrometria di
massa



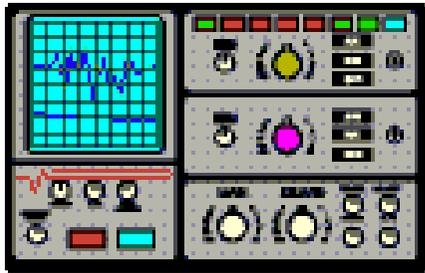
Testi consigliati:

-B. Gioia, R. Stradi, E. Rossi, Guida al corso di metodi fisici in chimica organica, Vol II, (Massa), Ed. CUSL, Milano 1989

-Robert M. Silverstein, Francis X. Webster, David J. Kiemle, Identificazione spettrometrica di composti organici, Ed. Ambrosiana II ed

Cosa può fare uno spettrometro di massa?

- ✓ Determinare il **peso molecolare**



Spettrometro di massa

=



Bilancia

Cosa può fare uno spettrometro di massa?

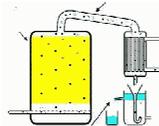
- ✓ Determinare la **composizione elementare** (formula bruta)
- ✓ Fornire informazioni sulla **struttura delle molecole**
- ✓ Studiare la **reattività** delle molecole in fase gas

A cosa servono queste informazioni?

- ✓ **Identificare** sostanze incognite
- ✓ **Confermare** la presenza di sostanze note
- ✓ **Analisi quantitativa** dei componenti di miscele

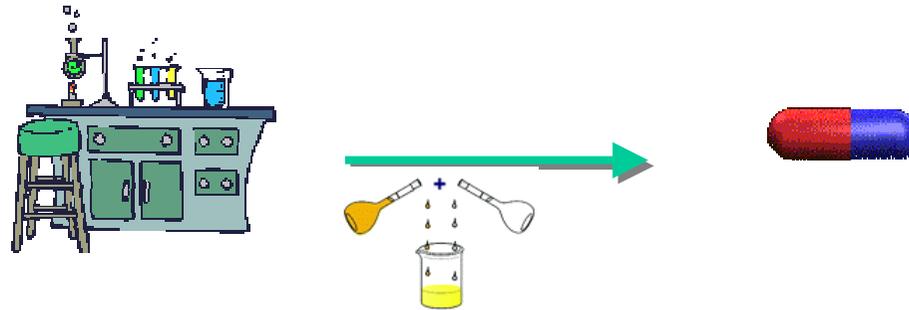
- nuovi farmaci,
- metaboliti,
- proteine,
- oligonucleotidi,

- liquidi biologici quali sangue, urine
- estratti di piante
- alimenti



Spettrometria di massa: dove si usa?

- **Farmaceutico**: scoperta e sviluppo di nuovi farmaci.



- ✓ Sintesi del principio attivo (Caratterizzazione di potenziali farmaci)
- ✓ studi di stabilità del farmaco
- ✓ studio della purezza della formulazione (Presenza di prodotti di degradazione dei farmaci o derivati dalla strategia sintetica seguita)
- ✓ studi di farmacocinetica e del metabolismo dei farmaci
- ✓ studi di biodisponibilità

Spettrometria di massa Dove si usa?

• **Clinica medica:** screening neonatale, per diagnosticare tempestivamente malattie genetiche*

- Malattie ereditarie del metabolismo (fenilchetonuria)



* E' sufficiente una piccola goccia di sangue prelevata dal neonato, da analizzare attraverso MS per rilevare **in pochi minuti** la presenza di malattie molto gravi.

I bambini affetti da fenilchetonuria, non smaltiscono la **fenilalanina** la quale si accumula nel sangue e, invece di essere convertita in tirosina, viene in parte smaltita nelle urine e in parte convertita in acido **fenilpiruvico**, che causa seri danni al sistema nervoso centrale: può provocare ritardo mentale, ritardo nell'accrescimento e morte precoce.

Clinica Pediatrica: «Malattie genetiche, siamo disarmati»

Ogni anno nel mondo il 5 per cento dei neonati muore di morte improvvisa dovuta ad una malattia ereditaria del metabolismo non identificata.

Eppure per salvargli la vita basterebbe prelevare una goccia di sangue e analizzarla grazie a una macchina, la Tandem spettrometria di massa. Una nuova apparecchiatura per lo screening neonatale che permette di diagnosticare tempestivamente più di 40 malattie genetiche rare e alcune delle quali mortali. Quasi tutte le regioni d'Italia ne hanno una tranne la Sardegna.

Durante il congresso internazionale in neonatologia che si è tenuto a Cagliari il mese scorso, si



Neonati nel nido

è discusso non solo di prevenzione neonatale delle malattie ereditarie del metabolismo, ma anche della necessità di fornire alle cliniche pediatriche questo essenziale strumento.

Il portavoce della richiesta è stato Stefano De Virgiliis, direttore della Clinica pediatrica dell'Università: «Stiamo chiedendo da qualche anno all'assessorato alla Sanità della Regione di sovvenzionare l'acquisto della Tandem spettrometria di massa utile per prevenire tempestivamente le malattie ereditarie e rare», spiega il medico.

La clinica pediatrica ha bisogno di tecnologia al passo con i tempi «L'attrezzatura di cui disponiamo è vecchia», riferisce, «e consente solo esami mirati e con sintomi delle malattie già presenti. Permette di effettuare l'esame della Fenilchetonuria, malattia che può provocare danni neurologici permanenti al bambino (esame obbligatorio per legge), ma questo non è sufficiente».

«Per alcuni tipi di malattie la tempestività è indispensabile», aggiunge De Virgiliis, «e con la Tandem

spettrometria di massa possiamo effettuare tutti gli esami completi e sicuri e un'identificazione prima della comparsa dei sintomi che manifestano il danno irreversibile. In questo modo sarebbe possibile prevenire l'insorgere della

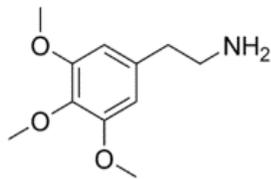
malattia attraverso un immediato intervento terapeutico o dietetico».

Il funzionamento della «Tandem» è semplice. «Si utilizza una piccola goccia di sangue prelevata dal tallone del neonato ed intrisa in una speciale carta che si chiama "spot"», informa De Virgiliis, «che una volta inserita nella macchina può in pochi minuti identificare, se presenti nel campione di sangue, malattie molto gravi, invalidanti e spesso mortali. Noi abbiamo bisogno di questo strumento. Il suo costo è di 250 mila euro ma è esiguo se rapportato al valore di una giovane vita, che non ha prezzo».

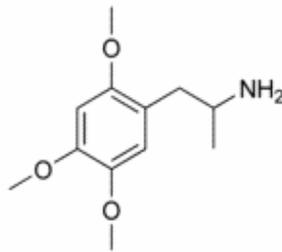
Spettrometria di massa Dove si usa?

• **Medico legale:** effettuare analisi di conferma e di tipo quantitativo di **droghe** (<http://aston.chem.purdue.edu/>)

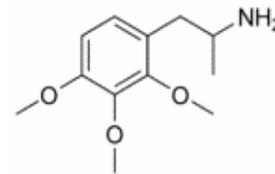
Es. Trimetossianfetamine (**TMA**s): 6 isomeri posizionali rilevabili e differenziabili tramite GC-MS



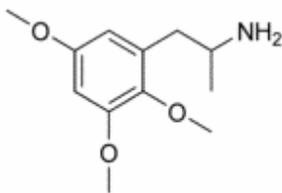
TMA, (Mescaline)



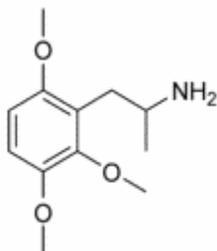
TMA-2



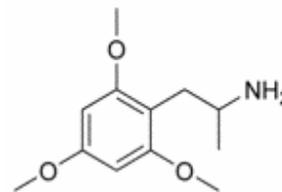
TMA-3



TMA-4



TMA-5



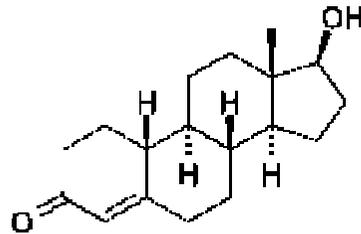
TMA-6

TMA-2 e TMA-6
recreational drug
(allucinogeni)
droghe illecite



Consumo e commercializzazione
punibili dalla legge! ⁸

- Determinare e identificare l'uso di **steroidi** anabolizzanti da parte di atleti finalizzato ad accrescere la massa e la forza muscolare



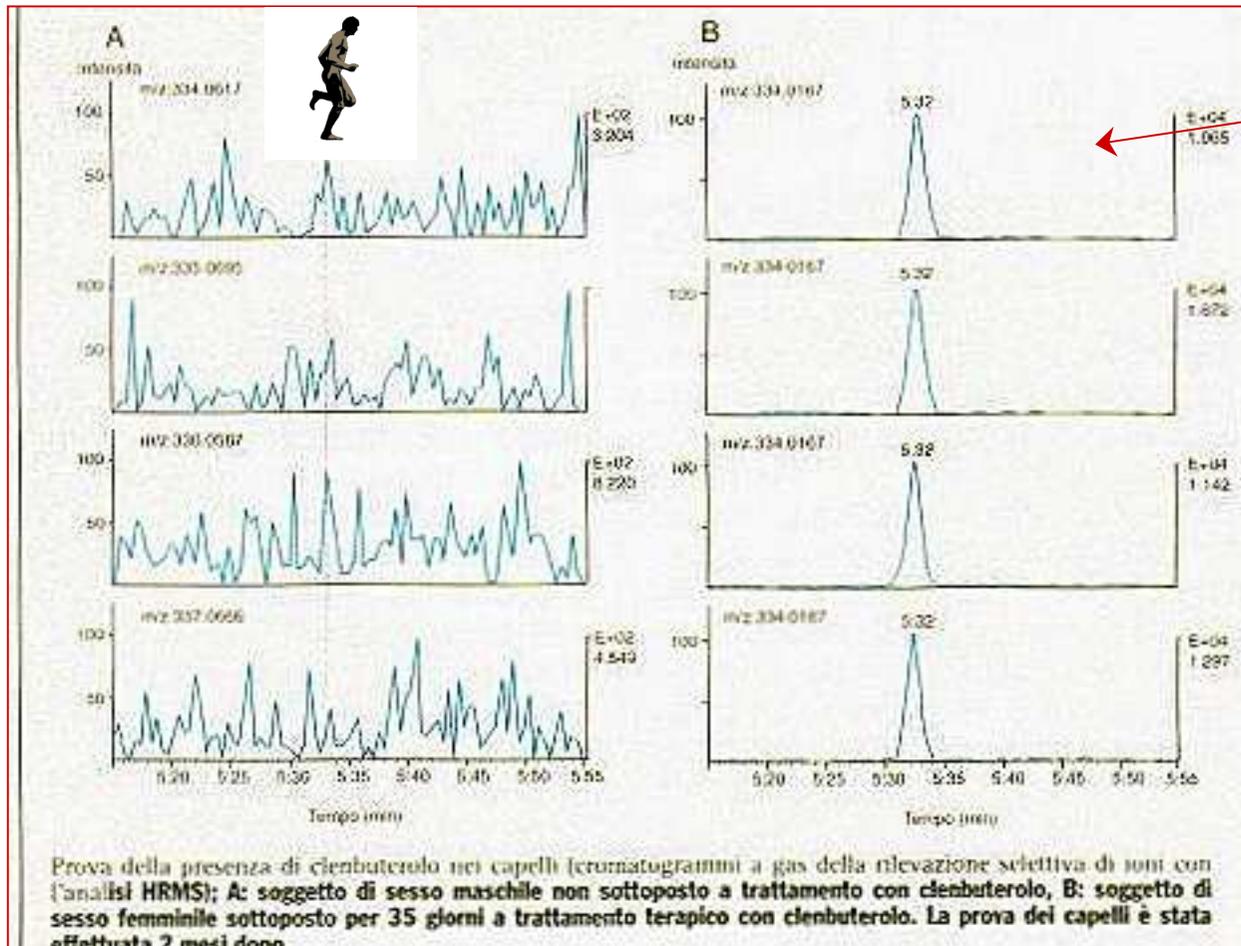
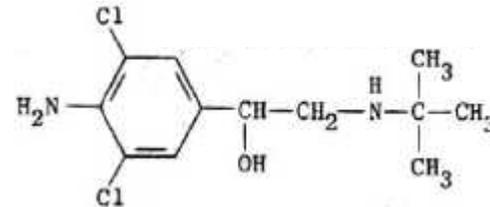
Nandrolone
(ormone della crescita)



Un gruppo di ricercatori sta lavorando allo sviluppo di test per monitorare numerosi farmaci nuovi e **non ancora immessi sul mercato.**

Ricorrendo alla **spettrometria di massa ad alta risoluzione** (HRMS), è possibile rilevare concentrazioni fino a 0,1 nanogrammo per millilitro di anabolizzante.

Presenza di Clenbuterolo [farmaco anabolizzante (β -agonista)] nei capelli

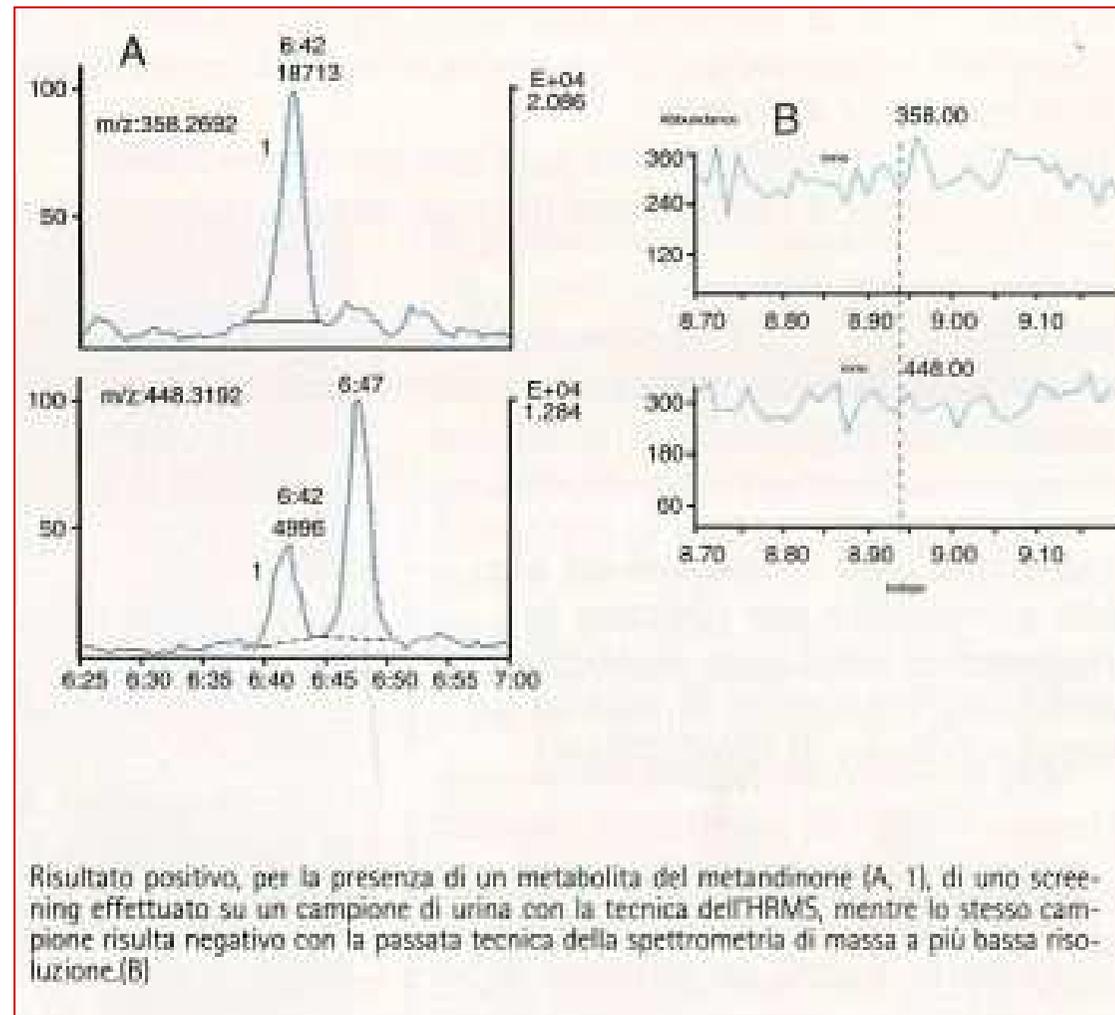


Analisi HRMS di capelli

Presenza di Epimetendiolo, metabolita del metandinone [farmaco anabolizzante] nelle urine



Analisi HRMS
di urine





Complici del doping sono certamente:



→ i **medici** che prescrivono i farmaci per indicazioni non terapeutiche



→ i **farmacisti** che li dispensano contravvenendo all'obbligo di presentazione della ricetta.

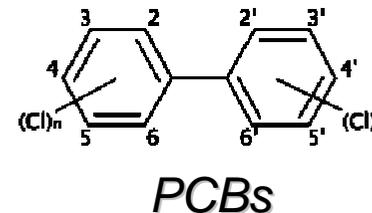
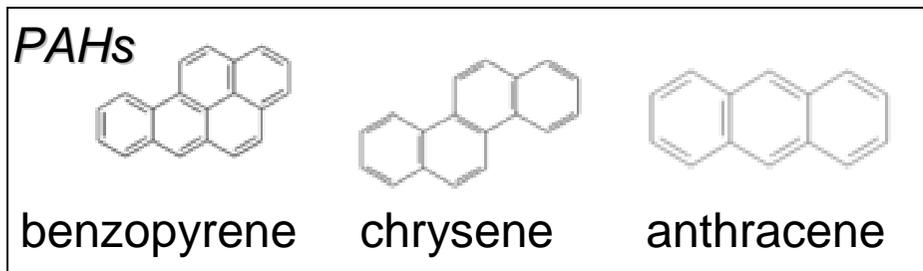
→ le **ditte** che producono e vendono i loro farmaci al mercato nero

ma..... principale responsabile è colui che liberamente decide di intraprendere questa strada.



Spettrometria di massa Dove si usa?

- **Ambientale:** determinare la presenza di microinquinanti ambientali (*PAHs*, Polycyclic aromatic hydrocarbons; *PCBs* Polychlorinated Biphenyls)



- *qualità dell'acqua*



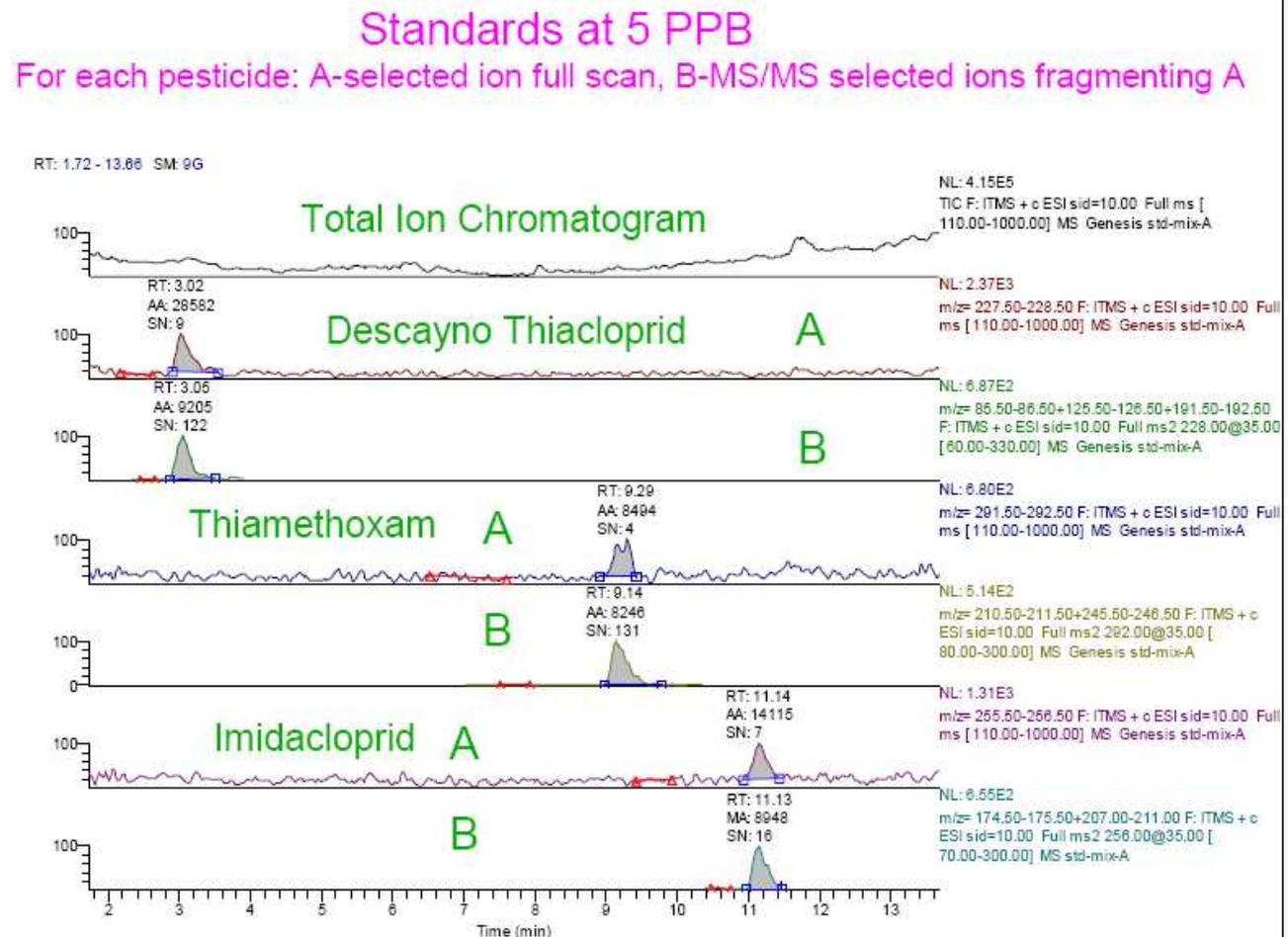
- *contaminazione degli alimenti: presenza di diossine in pesce*





- Determinare la presenza di residui di insetticidi negli alimenti

Gli insetticidi Neonicotinoidi (Acetamiprid, Imidacloprid e thiamethoxam) sono ritenuti la causa principale della moria di api!



Spettrometria di massa Dove si usa?

- **Biotechnologie:** analisi di proteine, peptidi, oligonucleotidi

Spettrometria di massa Dove si usa?

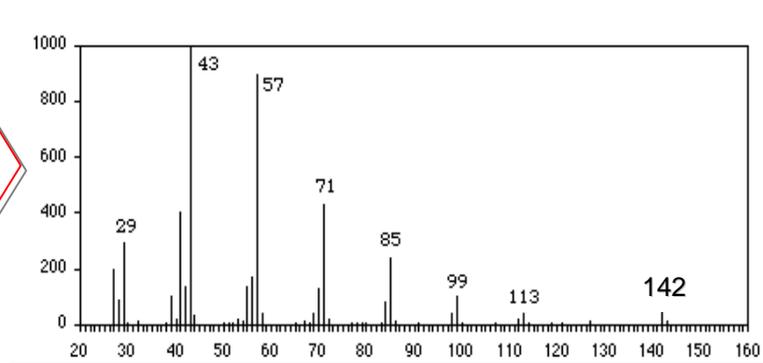
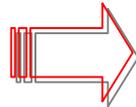
e ancora

- Identificare e determinare quali e quantitativamente i componenti di miscele organiche complesse (ad es. aromi negli alimenti)

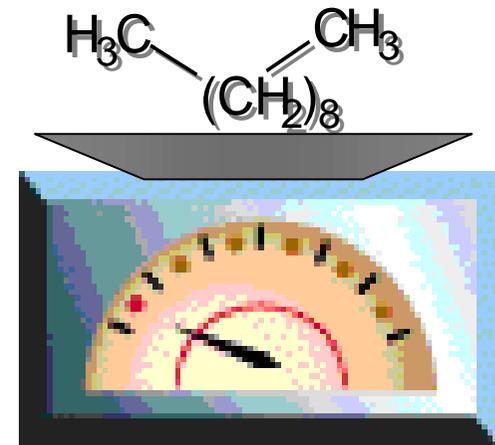


Caratterizzazione strutturale

La spettrometria di massa è una tecnica che può attribuire il peso molecolare, la formula elementare e la **formula di struttura** a composti sconosciuti.



=

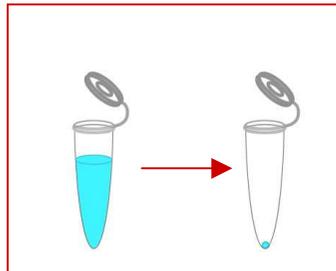


Caratterizzazione strutturale

- A differenza delle tecniche spettroscopiche, però, questo è un metodo d'analisi **distruttivo** (la molecola non rimane intatta dopo l'analisi)

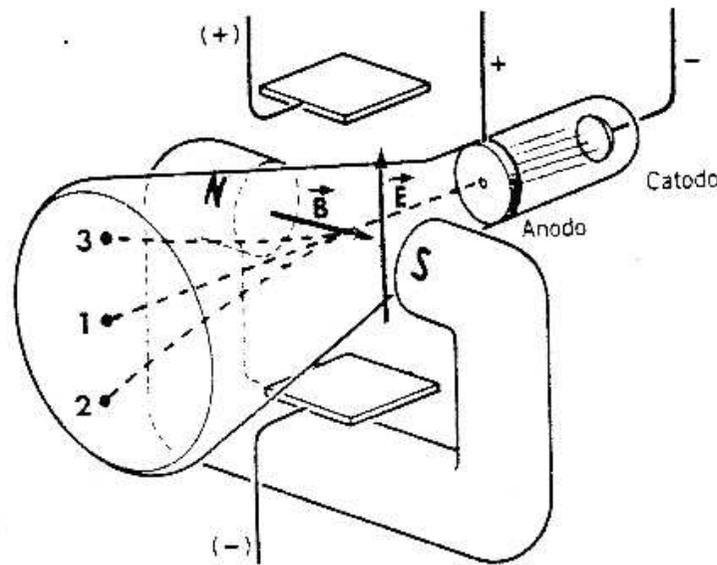


- Basta avere una piccolissima quantità del composto (anche **pochi millesimi di milligrammo** e in alcuni casi meno di un picogrammo, 10^{-12} grammi).



Cenni storici

- La spettrometria di massa trae le sue origini nella prima parte del XX secolo dagli esperimenti di **J.J. Thomson**, il quale mise a punto un dispositivo, Il **tubo a raggi catodici**, al quale veniva applicata una differenza di potenziale elettrico in condizioni di vuoto.



Cenni storici

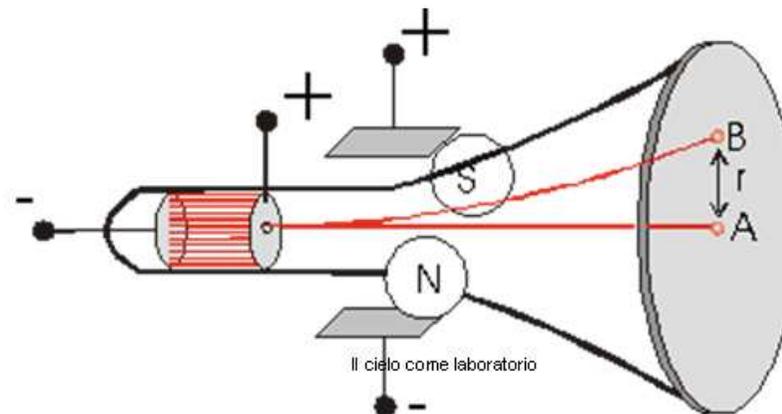
Thomson chiarì:

- la natura corpuscolare dei raggi catodici
- che i raggi catodici erano carichi negativamente (elettroni) e riuscì a misurarne il rapporto m/z



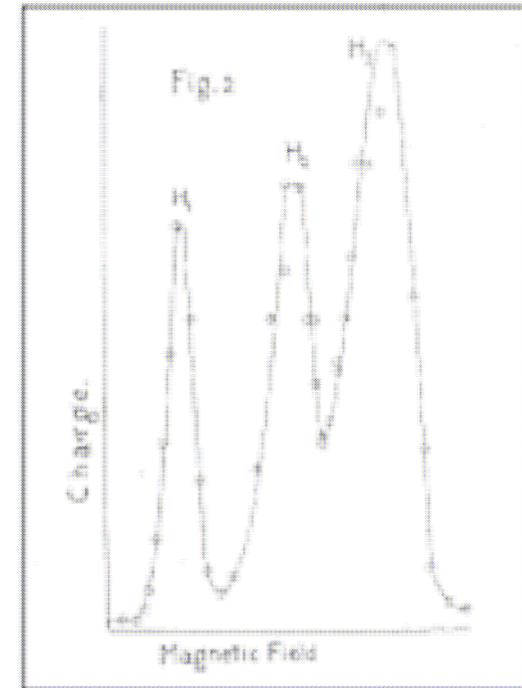
Thomson mise in evidenza

- l'esistenza di altre **particelle di carica positiva** e di **massa molto maggiore**



Cenni storici

Thomson intuì subito il possibile utilizzo analitico di tale tecnica, ma l'applicazione primaria rimase per 30'anni confinata nel **campo della fisica** per la misura dei rapporti isotopici e della massa esatta dei nuclidi.



L'abbondanza relativa delle specie H, H₂ e H₃.

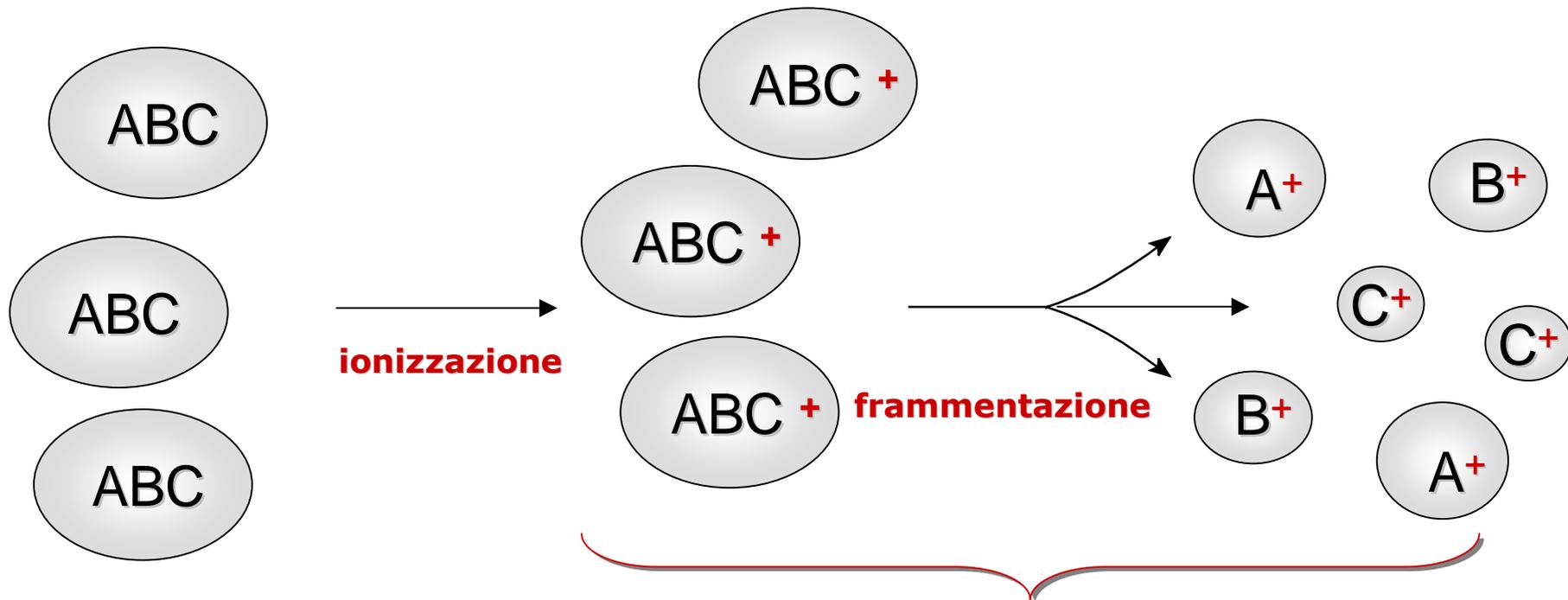
Solo dopo la fine della II guerra mondiale si iniziarono a sviluppare le sue potenzialità in **campo chimico** e vennero introdotti nuovi metodi di ionizzazione e nuovi analizzatori

PRINCIPI GENERALI

La spettrometria di massa si basa sulla:

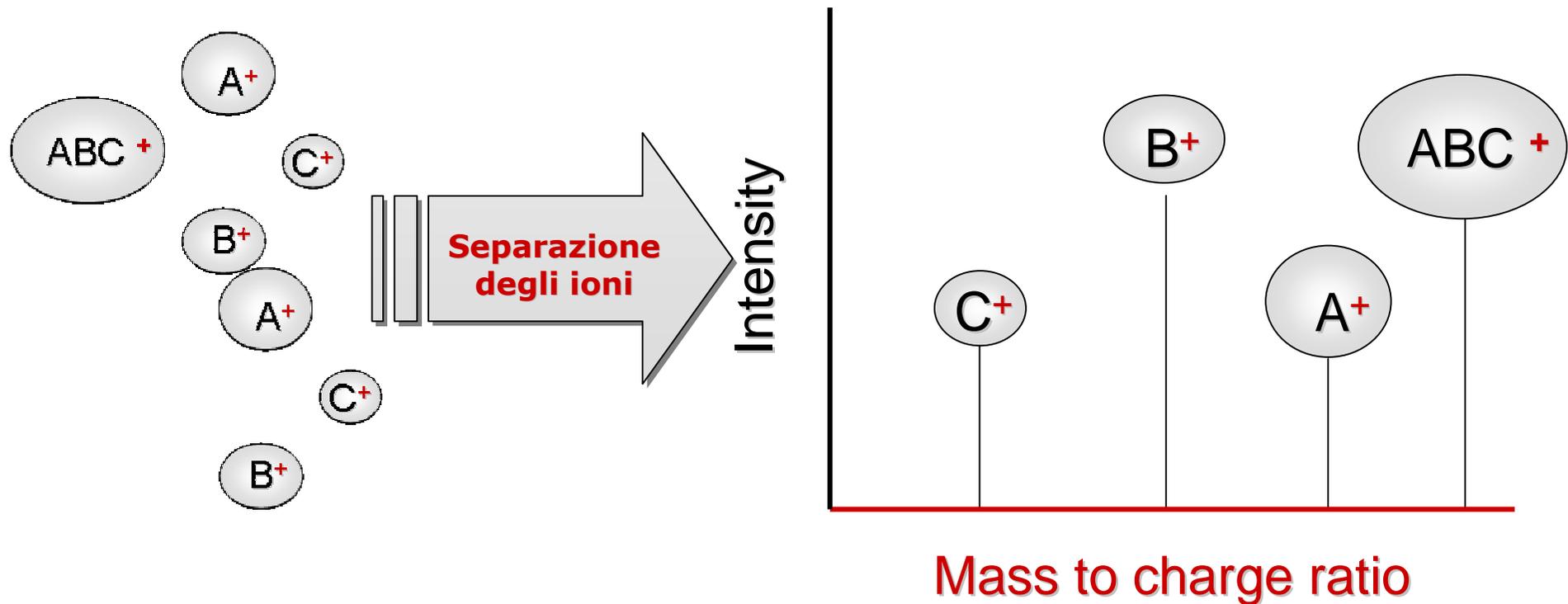
1) **IONIZZAZIONE**

2) **FRAMMENTAZIONE**



PRINCIPI GENERALI

3) **SEPARAZIONE** degli **ioni** generati sulla base del loro rapporto massa/carica.

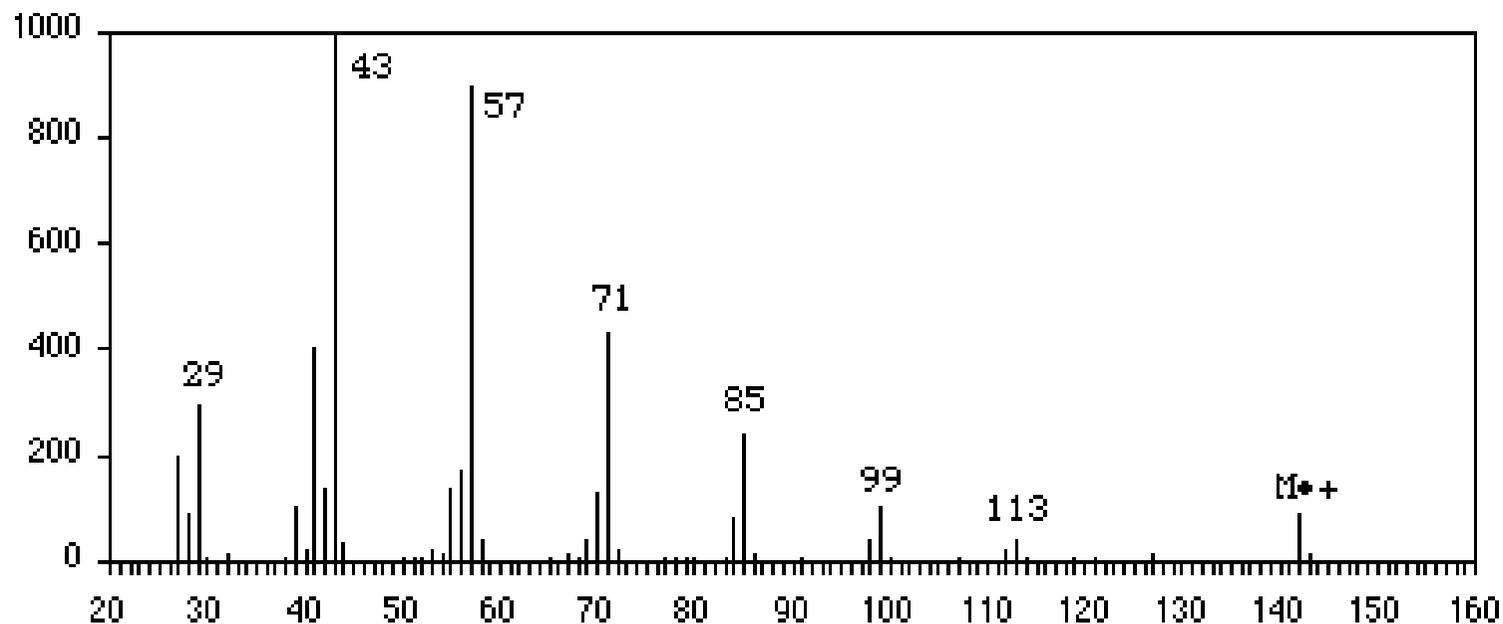


(Tutti gli ioni A⁺ vanno separati dai B⁺ e dagli ioni non frammentati ABC⁺)

Lo spettro di massa

Nello spettro di massa vengono riportati:

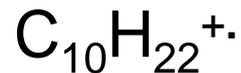
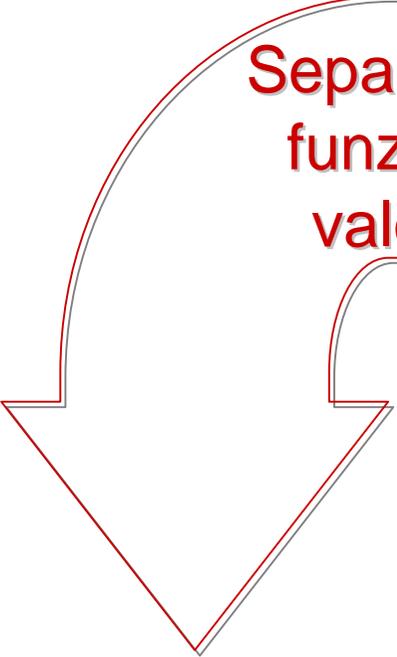
- ✓ i valori del rapporto **MASSA/CARICA** (m/z) degli **ioni separati** sull'asse delle **x**,
- ✓ i valori di abbondanza relativa l'asse delle **y**.



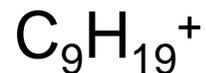
m/z ₂₄

Ad esempio: come è stato ottenuto lo spettro di $C_{10}H_{22}$

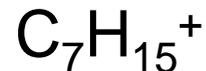
Separazione in
funzione del
valore m/z



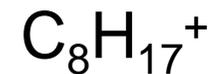
M^{+} m/z 142



m/z 127



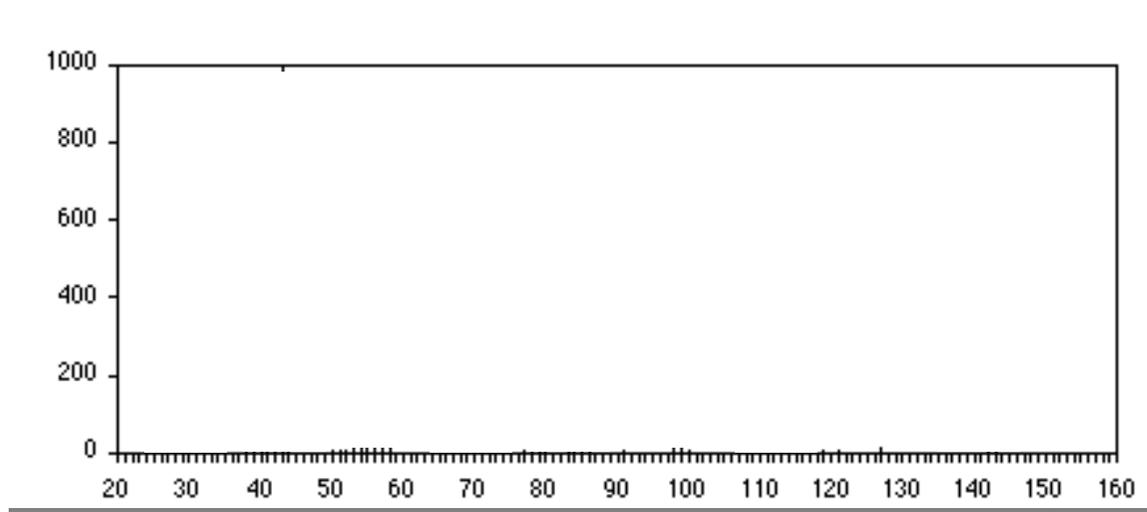
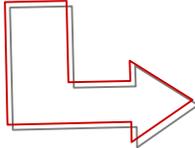
m/z 99



m/z 113

Lo ione iniziale $C_{10}H_{22}^{+}$, ottenuto per espulsione di un elettrone, si frammenta per produrre una serie di ioni con diverso rapporto m/z .

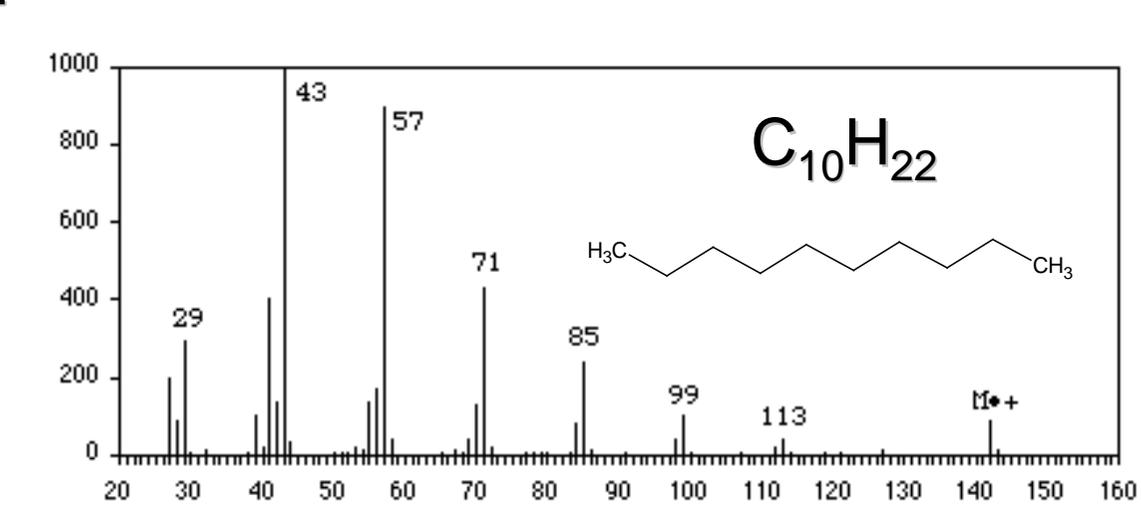
Ampificazione
del segnale



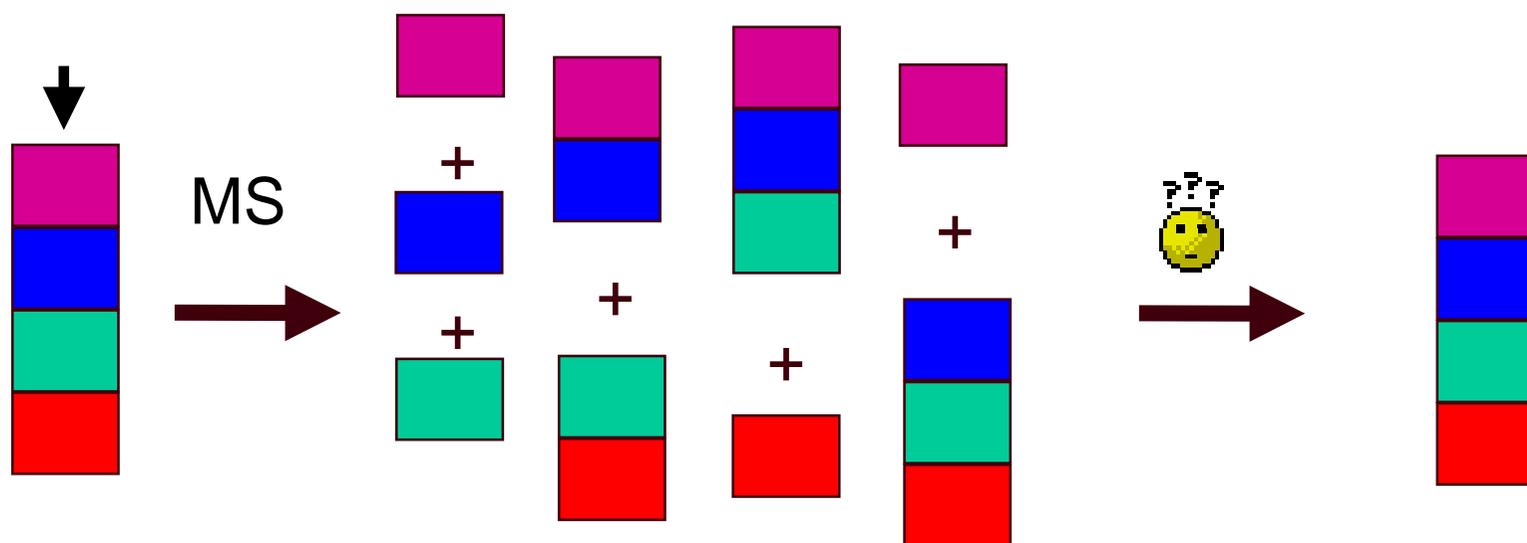
Spettro di massa

Relazione spettro ↔ struttura della molecola organica

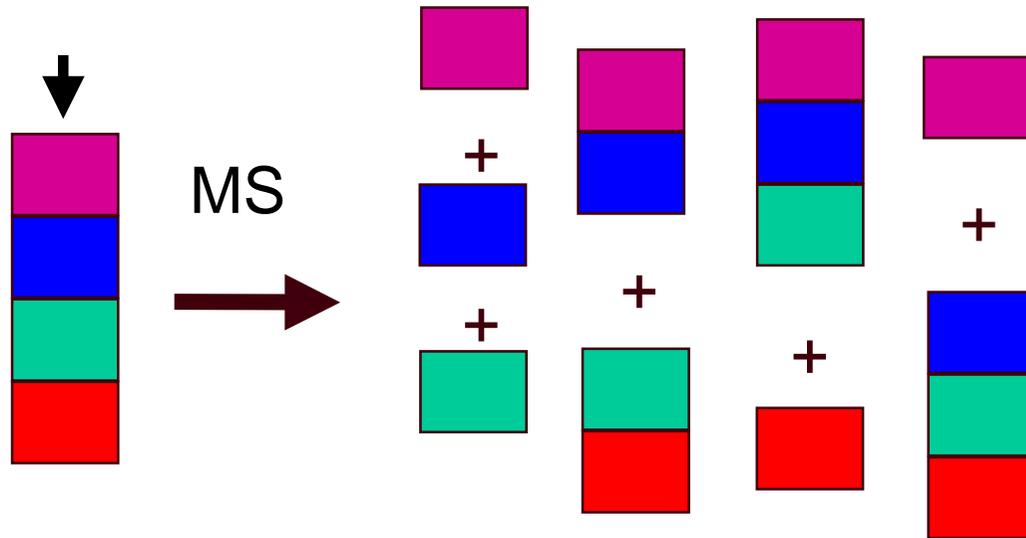
Ciascuna sostanza una volta ionizzata, si **FRAMMENTA** secondo **regole di frammentazione ben precise**, che dipendono dalla struttura della molecola stessa e, pertanto, mostra uno spettro di massa caratteristico, definito **“impronta digitale”**, in quanto, in base ai valori di m/z e alle intensità relative dei frammenti ionici che derivano dal processo di ionizzazione elettronica, identifica univocamente una sostanza.



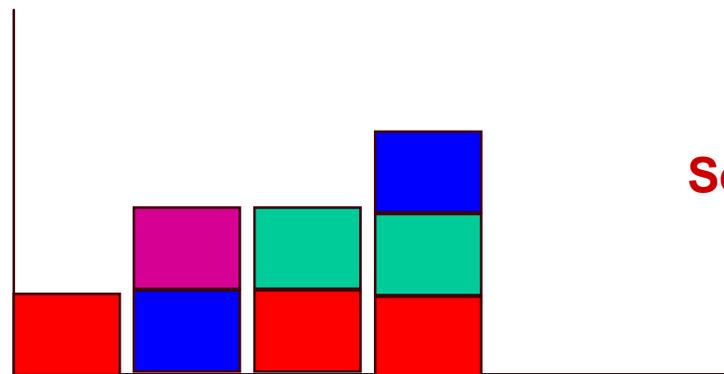
Interpretare uno **spettro di massa** per ottenere informazioni strutturali è come risolvere un **puzzle!**



Per ricostruire la struttura della molecola, bisogna considerare le masse dei frammenti come se fossero pezzi del puzzle



Solo la massa di alcuni frammenti viene riportata nello spettro



Solo i frammenti carichi (ionici)

Relazione spettro ↔ struttura della molecola organica

Con lo spettro di massa si ha l'identificazione della sostanza chimica, così come le impronte digitali consentono l'individuazione di una persona.



Dallo spettro alla struttura della molecola incognita

Dallo spettro di massa si può risalire alla struttura di un composto incognito attribuendo una **composizione elementare*** (e possibilmente una formula di struttura) ai singoli ioni e ricostruendo i **meccanismi di frammentazione** seguendo schemi tipici per le varie classi di composti.

composizione elementare*

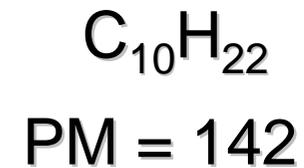
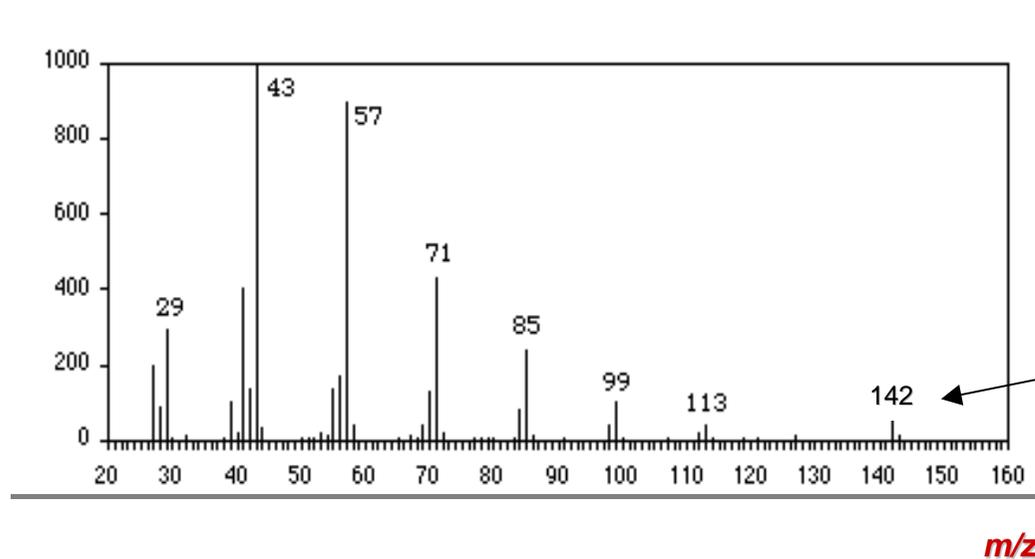
meccanismi di frammentazione

FORMULA DI STRUTTURA

*Se la risoluzione dello strumento è sufficientemente elevata (**HRMS**), è possibile determinare la **massa esatta** dei singoli ioni, dalla quale si può dedurre la **composizione elementare** dello ione stesso.

Strumentazione

Lo spettrometro di massa è uno strumento che trasforma le molecole in **ioni** che analizza determinandone appunto la massa o, più correttamente, il rapporto massa su carica (m/z)



Massa di un ione

Poichè le molecole sono delle entità **MOLTO PICCOLE**, non è conveniente misurare le loro masse in Kilogrammi, o grammi

massa di un atomo di H ~ 1.66×10^{-24} grammi.

Di conseguenza è necessaria una unità di misura più conveniente per misurare la massa di singole molecole.

L'unità di misura più conveniente è il **Dalton** (Da)

1 Dalton = 1/12 della massa di un atomo di carbonio 12 (isotopo ^{12}C)

Massa di un ione

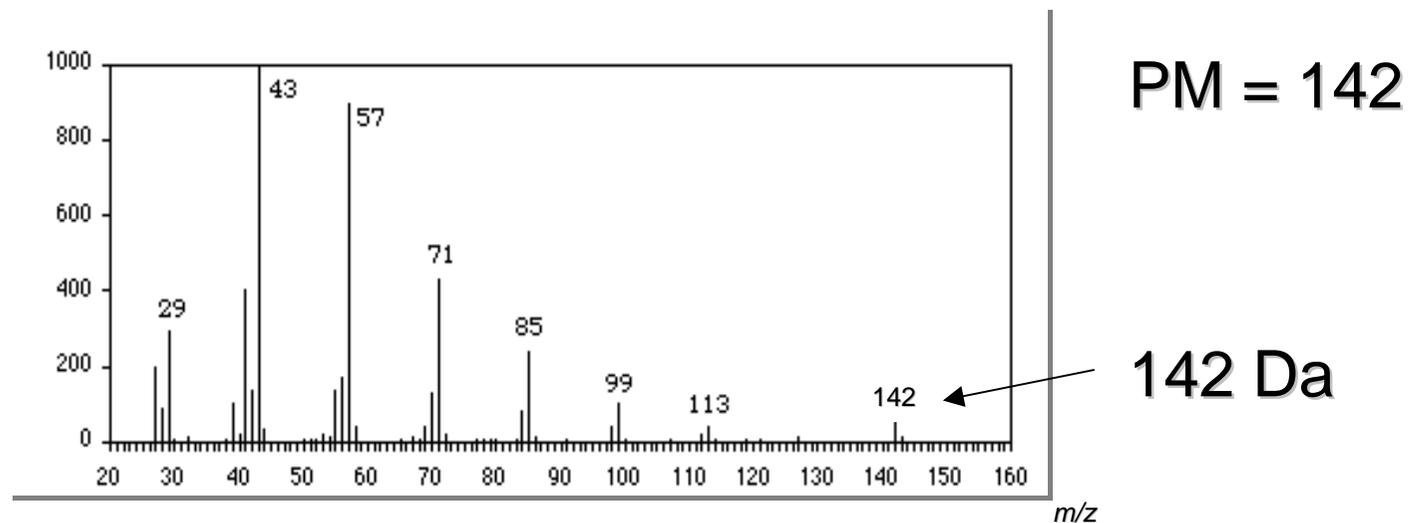
1 Dalton = 1/12 della massa di un atomo di carbonio- 12 (^{12}C)

La massa del ^{12}C è definito per convenzione come esattamente pari a 12 dalton, dove 1 dalton è pari a $1.661 \cdot 10^{-24}$ g.

La massa di una molecola o di un ione può essere indicata in dalton (Da) o in kilodalton (KDa).

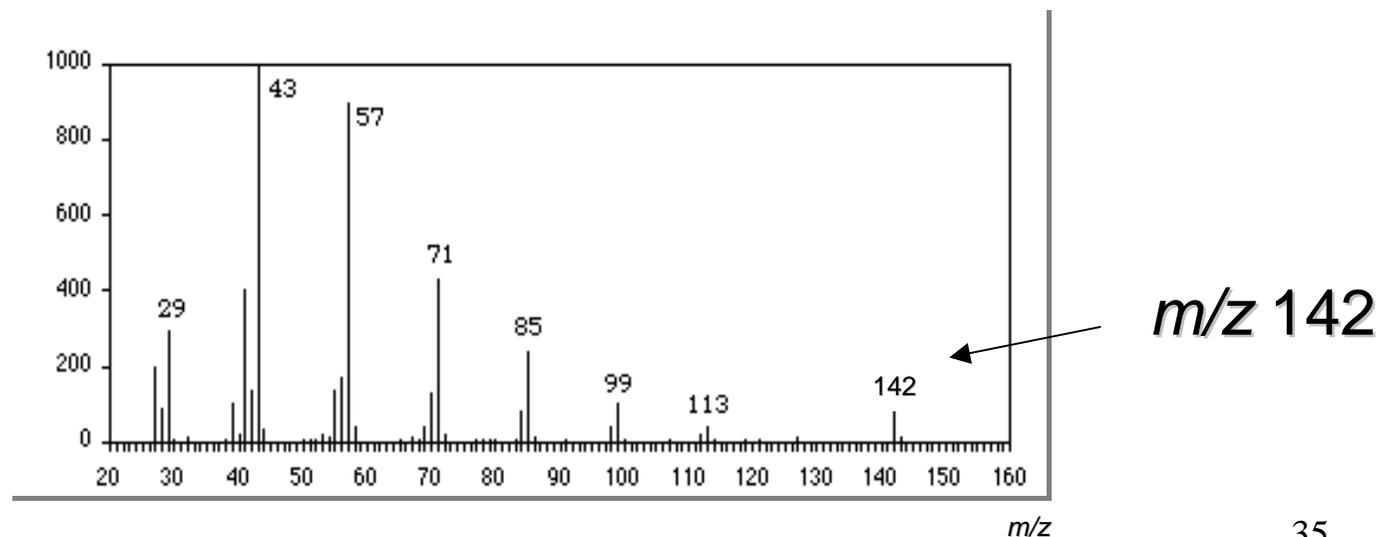
m/z.....peso molecolare

Poichè lo strumento non misura direttamente il peso molecolare (la massa molecolare), ma il rapporto massa/carica degli ioni che si formano dalla molecola in esame, il rapporto m/z è espresso in termini di **Da** per **UNITÀ ELEMENTARE DI CARICA**.



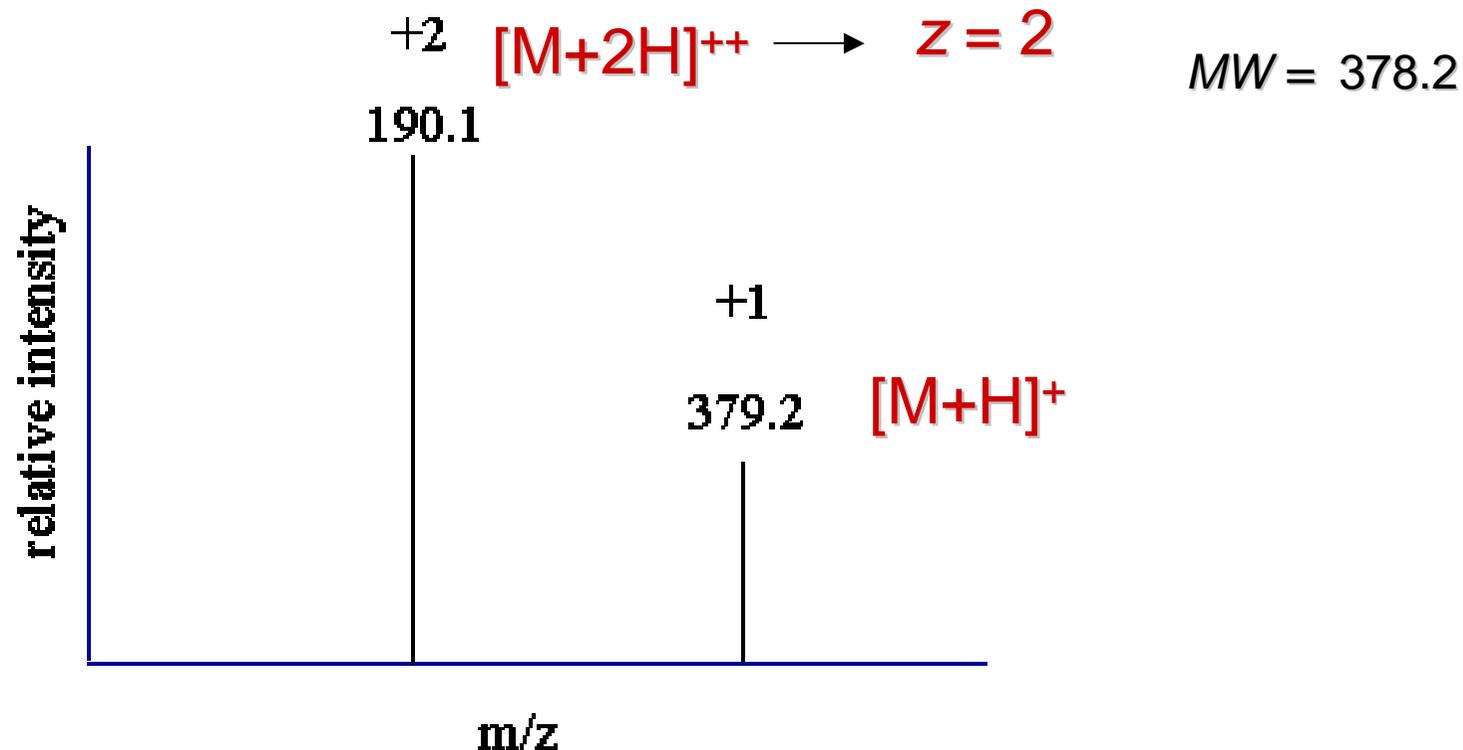
m/z.....peso molecolare

La maggior parte degli ioni che si possono riscontrare in spettrometria di massa possiede solo una carica ($z = 1$) così che il loro valore di m/z coincide numericamente con la massa molecolare (o meglio, ionica) in Da.



m/zpeso molecolare

Se la massa possiede una doppia carica ($z = 2$) valore di m/z è dato dalla massa molecolare (o meglio, ionica) in Da diviso 2.



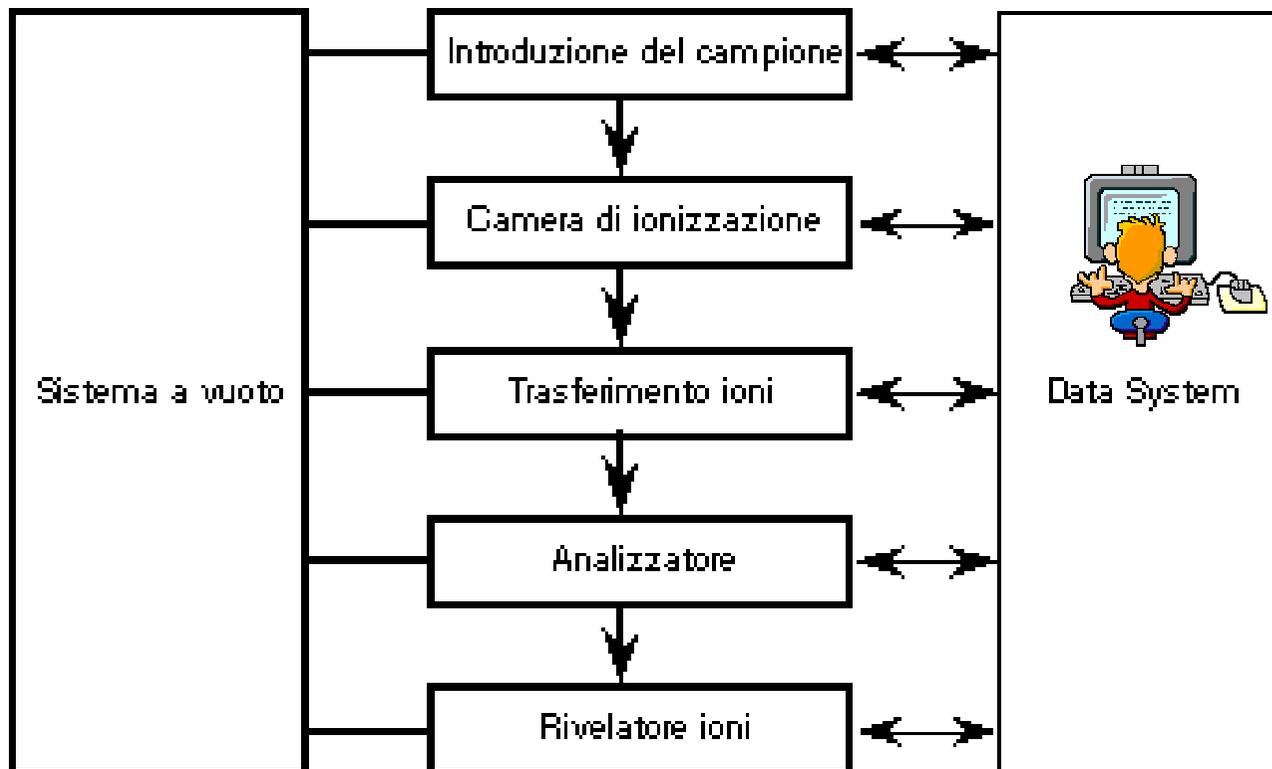
Elementi costitutivi di uno spettrometro di massa sono:

In uno spettrometro di massa il campione deve essere **ionizzato**; gli ioni risultanti devono essere **separati** in funzione del loro rapporto massa/carica.

- un sistema di introduzione del campione
- un sistema di ionizzazione (sorgente di ioni)
- un sistema di differenziazione degli ioni in base al valore di m/z
- un sistema di rilevamento degli ioni
- un sistema di vuoto*

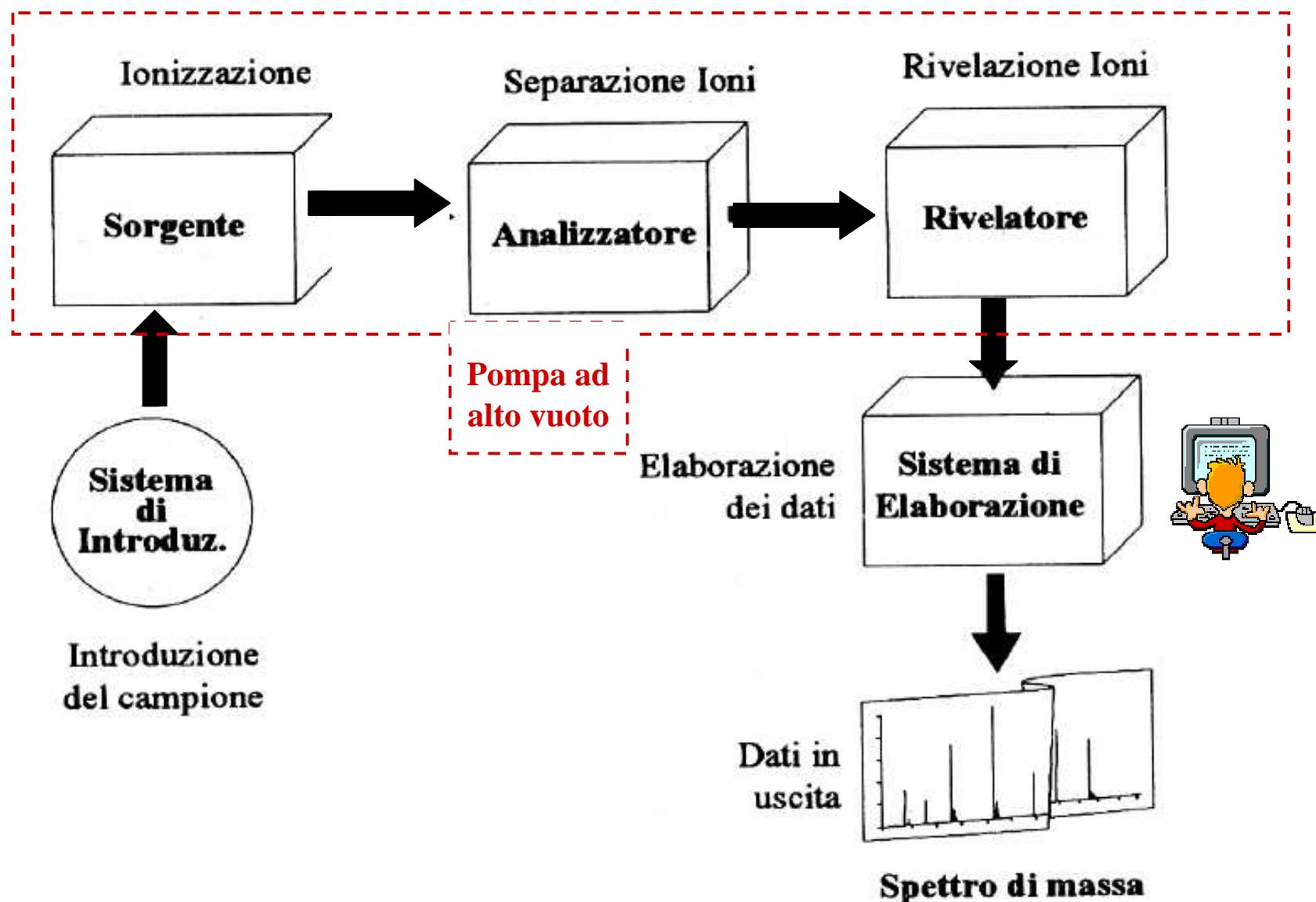
*Tutti gli analizzatori di massa disponibili richiedono per il loro funzionamento un vuoto molto spinto

Strumentazione



Gli spettrometri di massa moderni sono largamente modulari: attorno ad un sistema di vuoto ed un **analizzatore** può essere assemblato uno strumento con diversi sistemi di introduzione del campione e/o di ionizzazione.

Schema di uno spettrometro di massa



Da notare che il vuoto (che si aggira intorno ai $10^{-6} - 10^{-5}$ torr) è necessario per impedire una perdita di ionizzazione per urto con i gas atmosferici.

Diagramma a blocchi

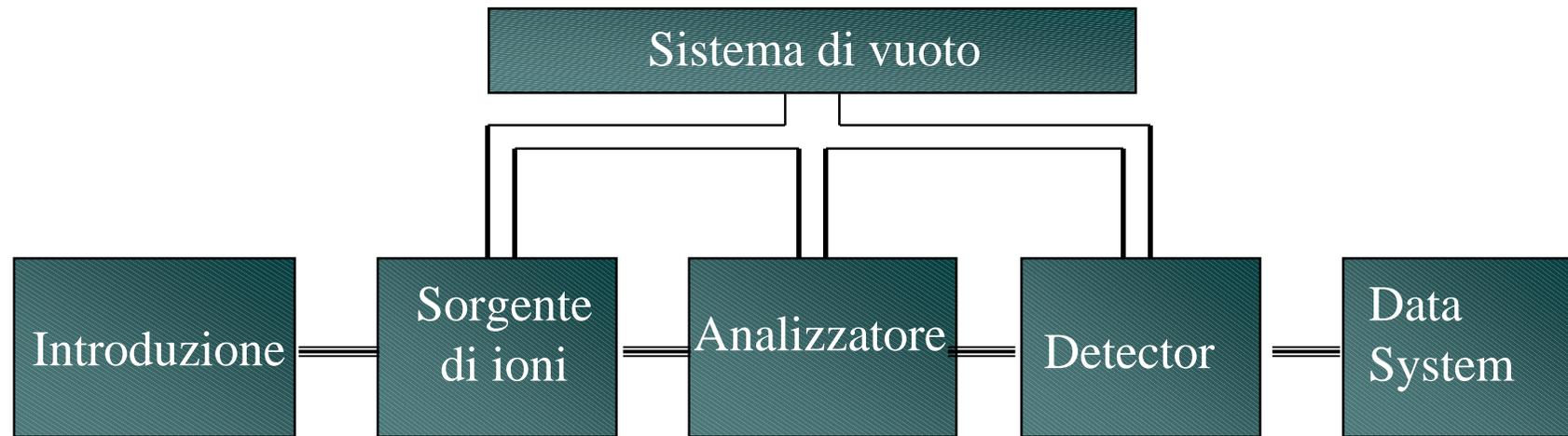
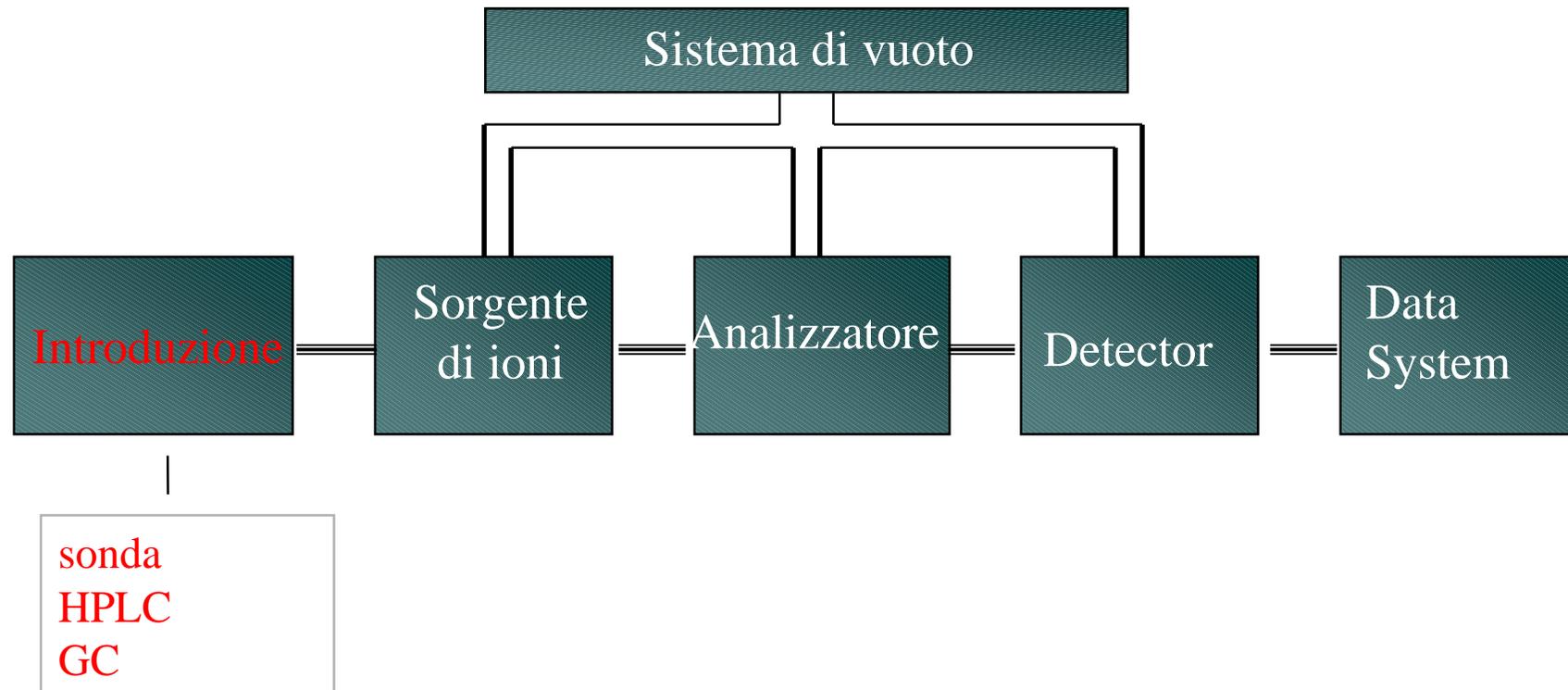


Diagramma a blocchi: Metodi di ionizzazione



Sistemi di introduzione del campione (Sample Inlet System)

I campioni possono essere introdotti nello spettrometro:

- **PER VIA DIRETTA** attraverso una sonda

- **Introduzione diretta** per composti **PURI** liquidi o solidi volatili termicamente stabili

- **PER VIA INDIRETTA** attraverso un dispositivo cromatografico

- **Gas-cromatografia (GC-MS)**

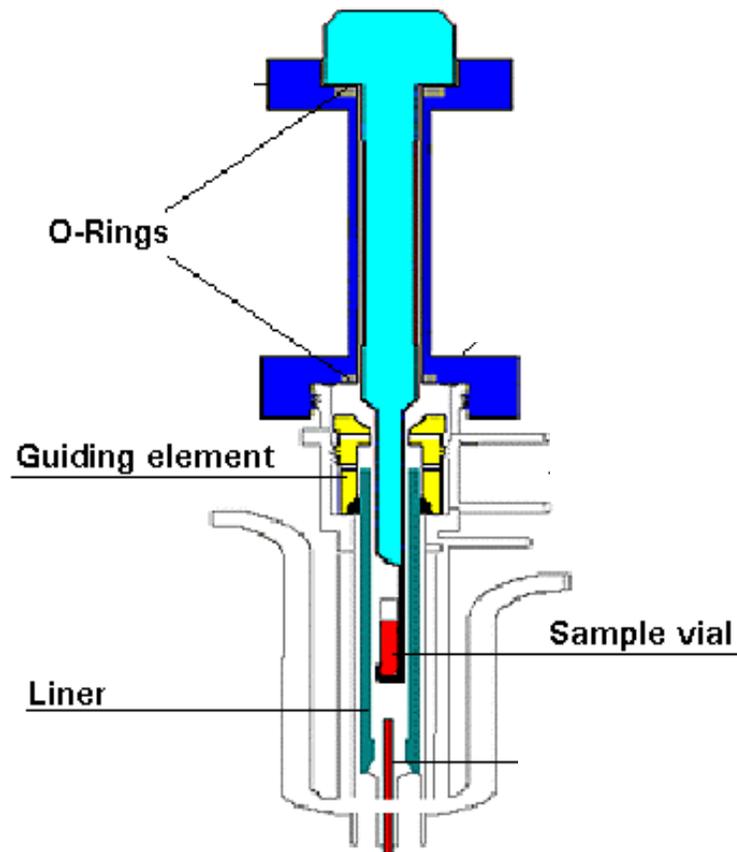
- **Cromatografia liquida HPLC-MS**



nell'analisi di **MISCELE** di **prodotti**

Sistemi di introduzione del campione: introduzione diretta

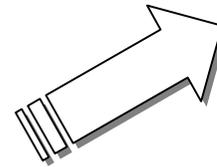
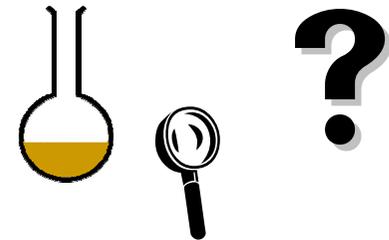
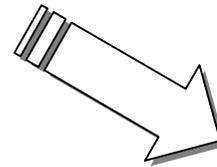
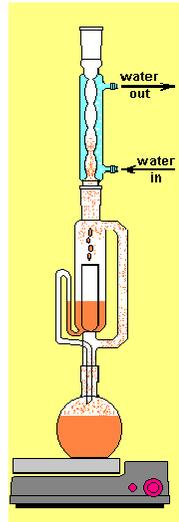
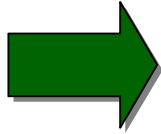
- **Introduzione diretta** per composti puri liquidi o solidi volatili



Il campione viene introdotto direttamente nella camera di ionizzazione attraverso l'impiego di una sonda (probe) riscaldabile.

Il campione viene inserito in un **microvial** e collocato all'estremità della sonda stessa

Sistemi di introduzione del campione: miscele complesse



Molto spesso non si ha il composto in forma purificata, ma solo una **complessa miscela** di prodotti (ad esempio: un estratto ottenuto da una pianta medicinale. Vogliamo sapere "cosa c'è dentro" nella speranza di identificare un composto attivo come farmaco).⁴⁴

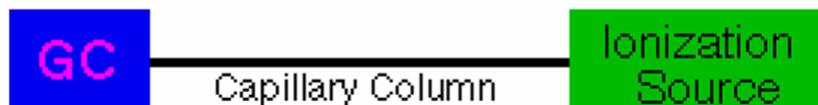
Sistemi di introduzione del campione: GC-MS e HPLC-MS

L'accoppiamento della spettrometria di massa con gas-cromatografia o con cromatografia liquida ad alta efficienza può risolvere elegantemente il problema.

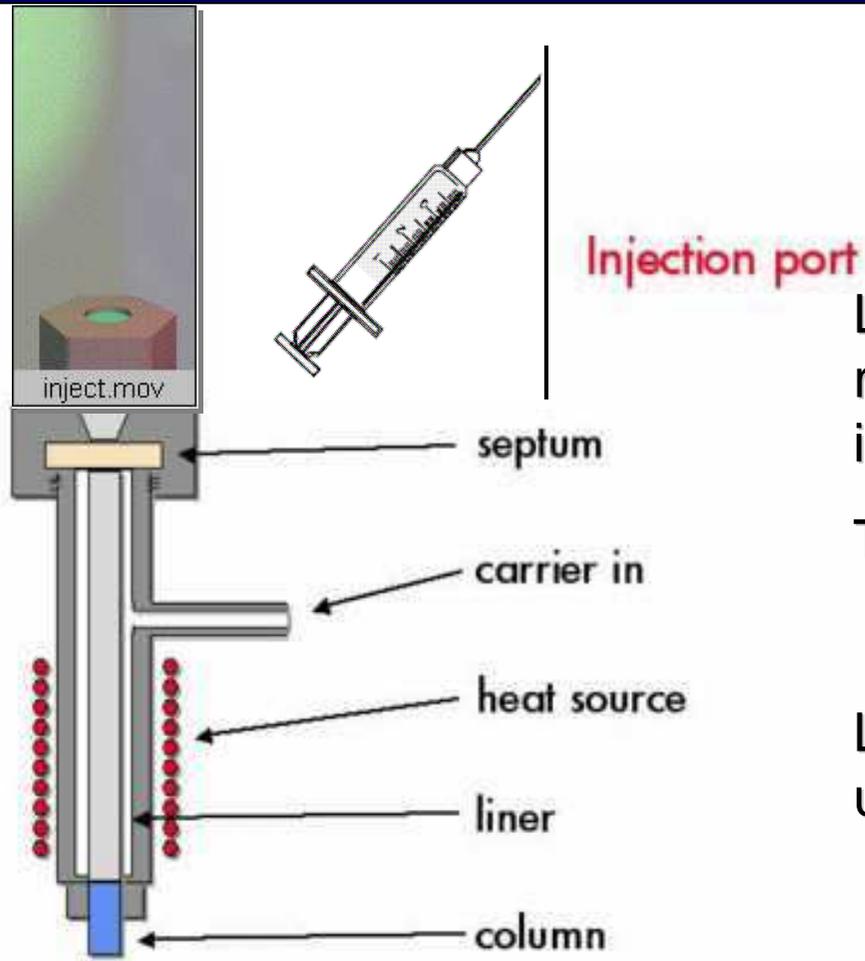
- **Gas-cromatografia (GC-MS)**
- **Cromatografia liquida HPLC-MS**

nell'analisi di **miscele di prodotti**

Si utilizza l'uscita di un sistema GC o HPLC come ingresso dello spettrometro di massa.



Sistemi di introduzione del campione: GC-MS e HPLC-MS



L'iniettore deve evaporare rapidamente il campione ed introdurlo nella colonna.

$$T_{inj} > 50^{\circ}\text{C superiore } T_{column}$$

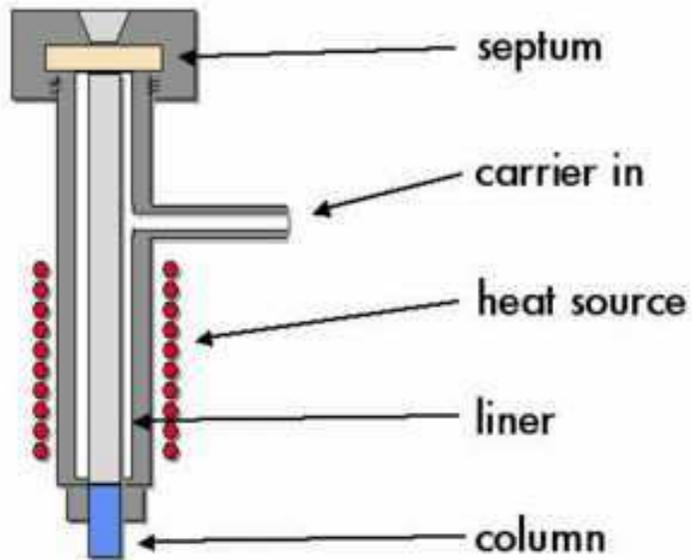
L'iniezione avviene attraverso un **setto** che **deve essere**:

-stabile alla T_{inj}

-sostituito regolarmente per garantire la chiusura

Sistemi di introduzione del campione: GC-MS e HPLC-MS

Injection port

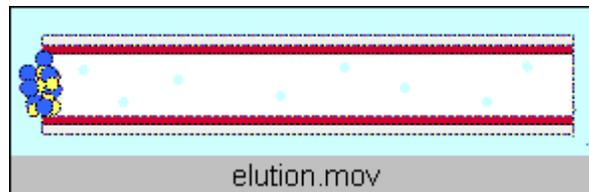


Il Liner costituisce lo spazio in cui avviene la vaporizzazione del campione. Generalmente è in vetro ma possono esistere anche liners metallici.

Deve essere sostituito periodicamente in quanto tutti i composti non volatili e i prodotti di degradazione si depositano qui.

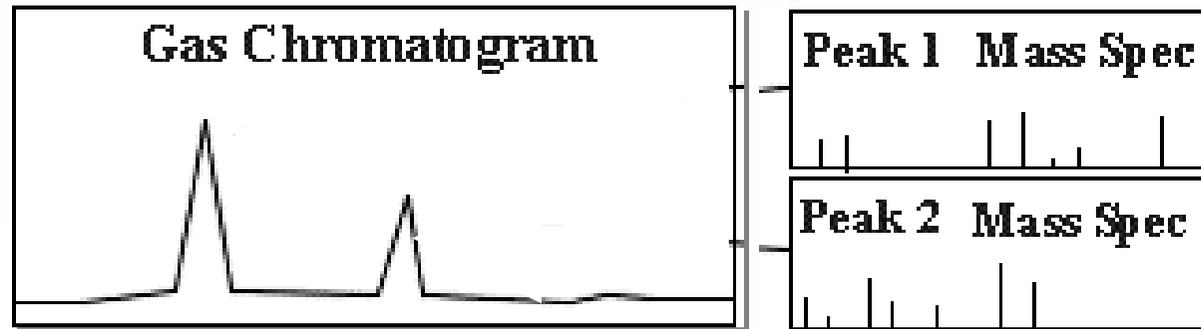
Sistemi di introduzione del campione: GC-MS e HPLC-MS

Fused silica capillary column



Sistemi di introduzione del campione: GC-MS e HPLC-MS

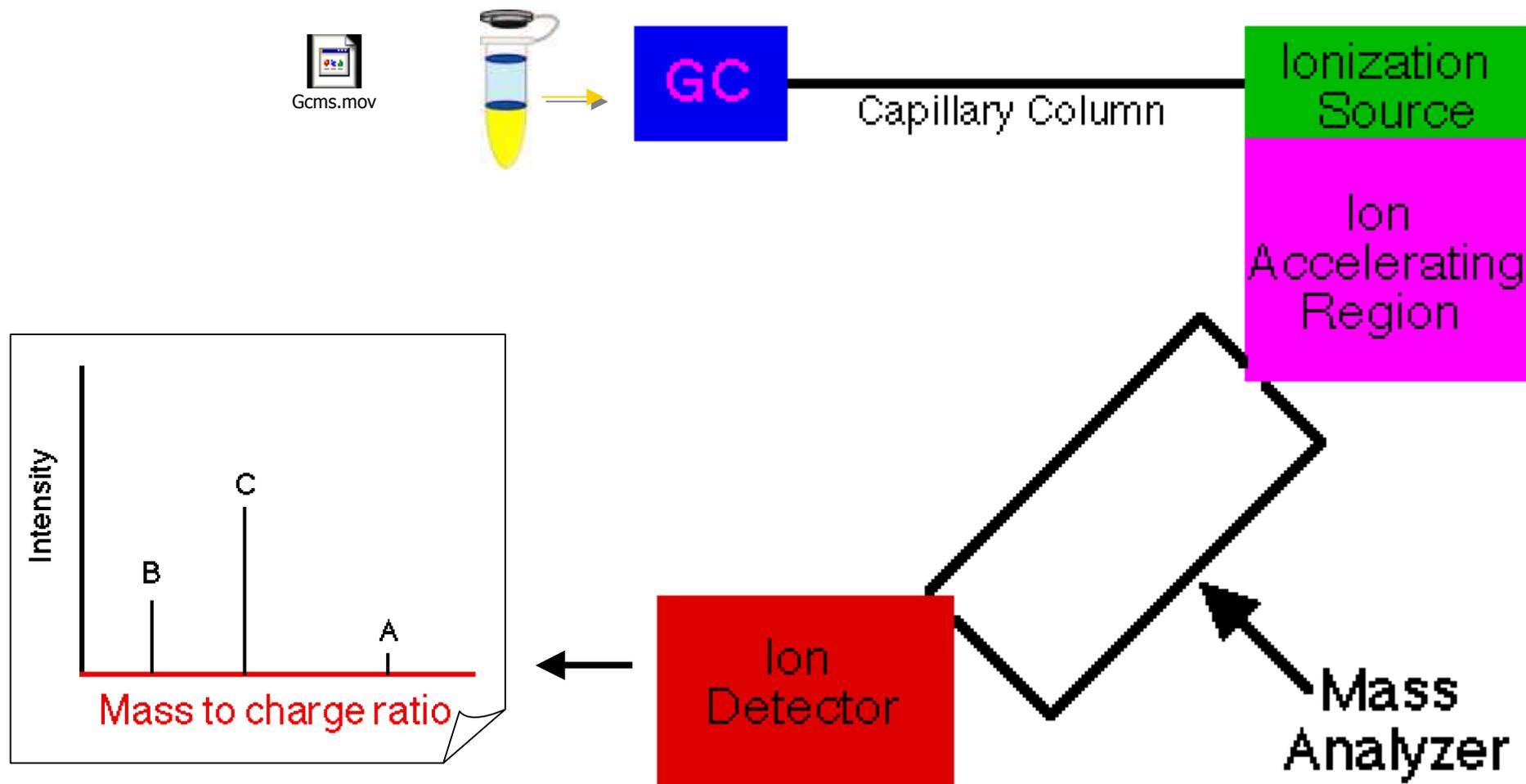
Ogni **picco** cromatografico presente nel cromatogramma è un composto eluito che viene identificato dal relativo spettro di massa



2 picchi nel cromatogramma
2 analiti presenti



Separazione degli ioni



Nel caso più comune, la molecola viene ionizzata per interazione con un fascio di elettronico energia di circa 70 eV. Lo ione molecolare carico positivamente si frammenta (in parte), con formazione di molecole e/o radicali neutri, che non vengono rivelati dallo strumento, e di cationi e/o radicali cationi, separati e rivelati dallo spettrometro. In uno spettro di massa, l'asse delle x ⁵⁰⁰porta valori di rapporto massa/carica e l'asse delle y valori di abbondanza relativa degli ioni analizzati.

IONIZZAZIONE

IL PROCESSO DI IONIZZAZIONE consiste nell'impartire una **carica elettrica** alla molecola in esame. Avviene solitamente all'interno della sorgente dello spettrometro di massa e può essere realizzato mediante varie tecniche.

Tra queste quella più comune e di facile utilizzo è la **ionizzazione elettronica** (EI) (vedi MS lezione II)

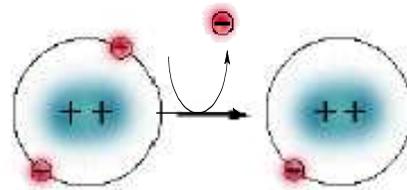
Nella EI le molecole vengono bombardate da un **un fascio di elettroni** emessi da un filamento di tungsteno riscaldato, con energia di circa 70 eV

 = elettrone



Ioni e ionizzazione

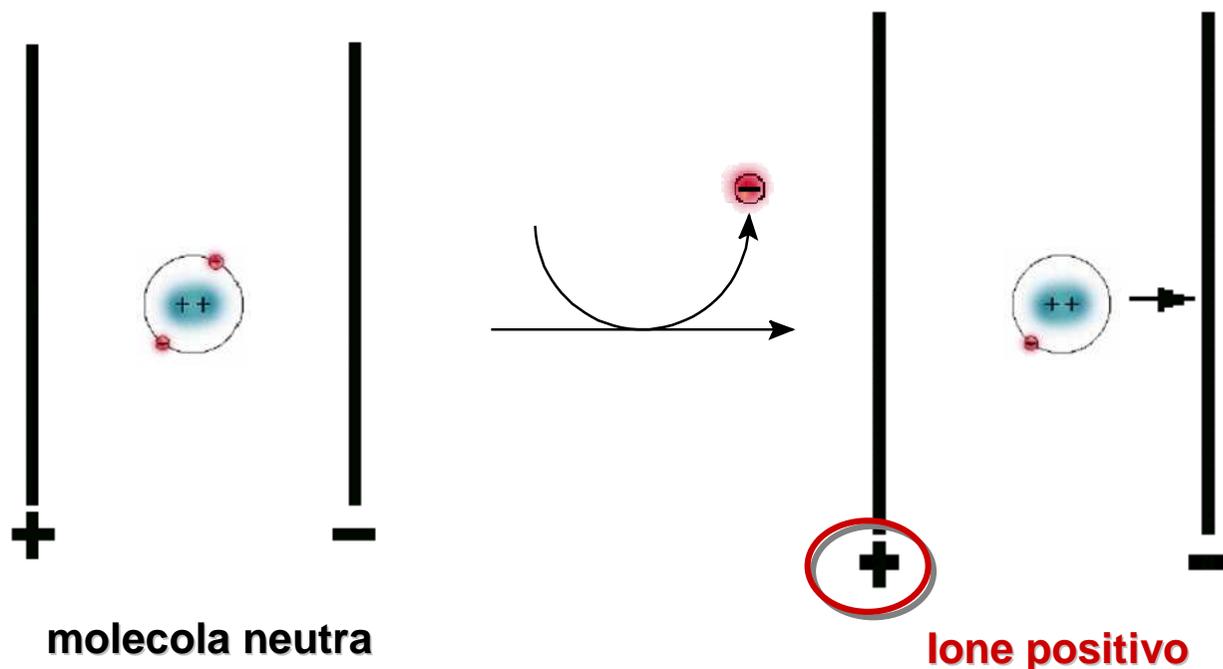
Se un atomo o una molecola perde un elettrone, gli verrà impartita una carica elettrica positiva:



L'atomo o la molecola risultanti, sono detti ioni ed il processo è detto ionizzazione..

Trasferimento degli ioni dalla sorgente ionica all'analizzatore

Lo ione così generato è soggetto ad un campo elettrico, e verrà **accelerato** per effetto di questo, nella direzione opposta a quella della sua polarità.



In questo caso, uno **ione positivo** è accelerato in direzione opposta all'elettrodo positivo.

Separazione degli ioni

Successivamente, gli ioni vengono **focalizzati** ed indirizzati verso una regione dello spettrometro di massa (**analizzatore**) a cui è applicato un **campo magnetico**. Date le condizioni di vuoto spinto dell'analizzatore, non vi sono forze di attrito e il **moto degli ioni dipende unicamente delle forze elettromagnetiche**, le quali influenzano ciascuno ione in maniera diversa **secondo il rapporto m/z** . **Variando** le forze che interagiscono sul sistema, è possibile dirigere il moto degli ioni in modo tale da farli fuoriuscire dall'analizzatore in tempi diversi, venendo, in tal modo **SEPARATI**. Ogni ione corrispondente ad un determinato valore di m/z genera una corrente ionica che viene acquisita e registrata, dando luogo allo spettro di massa.