

Appunti di Tecniche avanzate per il controllo degli alimenti

Parte 6

ZEPPA G. – BELVISO S.
Università degli Studi di Torino



La spettrometria di massa

Spettrometria di massa

- Tra i rivelatori per GC e LC lo SPETTROMETRO DI MASSA merita una trattazione più approfondita visto il suo enorme potenziale.
- Serve a misurare la massa delle molecole.
- Fornisce la massa molecolare e anche la *formula* molecolare ($C_6H_{12}O_6$)
- La molecola deve essere ionizzata, così da misurare il rapporto massa/carica (m/z) dello ione risultante.

Alcune definizioni

Massa Atomica: la media ponderale delle masse esatte degli isotopi presenti in natura di quel particolare elemento. Unità di misura: Da (u: unità di massa atomica unificate) = $1/12$ della massa del ^{12}C

Massa Esatta:

è la massa “relativistica” dell’isotopo: non coincide con la somma delle masse esatte dei protoni e dei neutroni e dipende dall’energia di legame. (O=15,994915; C=12,00000; H=1,008665).

Massa Nominale:

coincide con il numero di protoni e neutroni che contiene l’isotopo più pesante. Es. ^{12}C ha massa nominale = 12. Lo spettrometro di massa è quindi in grado di distinguere i singoli isotopi (m/z) di ciascun elemento (H= 1; C=12,13; N=14,15; O=16,18).

Symbol	Exact Mass	Symbol	Exact Mass	Symbol	Exact Mass	Symbol	Exact mass
Ag	106.9051	Eu	152.9212	Mo	97.9054	Se	79.9165
Al	26.9815	F	18.9984	N	14.0031	Si	27.9769
Ar	39.9624	Fe	55.9349	Na	22.9898	Sm	151.9197
As	74.9216	Ga	68.9256	Nb	92.9064	Sn	119.9022
Au	196.9666	Gd	157.9241	Nd	143.9101	Sr	87.9056
B	11.0093	Ge	73.9212	Ne	19.9924	Ta	180.9480
Ba	137.9052	H	1.0078	Ni	57.9353	Tb	158.9254
Be	9.0122	He	4.0026	O	15.9949	Te	129.9062
Bi	208.9804	Hf	179.9466	Os	191.9615	Th	232.0381
Br	78.9183	Hg	201.9706	P	30.9738	Ti	47.9479
C	12.0000	Ho	164.9303	Pb	207.9766	Tl	204.9744
Ca	39.9626	I	126.9045	Pd	105.9035	Tm	168.9342
Cd	113.9034	In	114.9039	Pr	140.9077	U	238.0508
Ce	139.9054	Ir	192.9629	Pt	194.9648	V	50.9440
Cl	34.9689	K	38.9637	Rb	84.9118	W	183.9510
Co	58.9332	Kr	83.9115	Re	186.9558	Xe	131.9041
Cr	51.9405	La	138.9064	Rh	102.9055	Y	88.9059
Cs	132.9054	Li	7.0160	Ru	101.9043	Yb	171.9364
Cu	62.9296	Lu	174.9408	S	31.9721	Zn	63.9291
Dy	163.9292	Mg	23.9850	Sb	120.9038	Zr	89.9047
Er	165.9303	Mn	54.9380	Sc	44.9559		

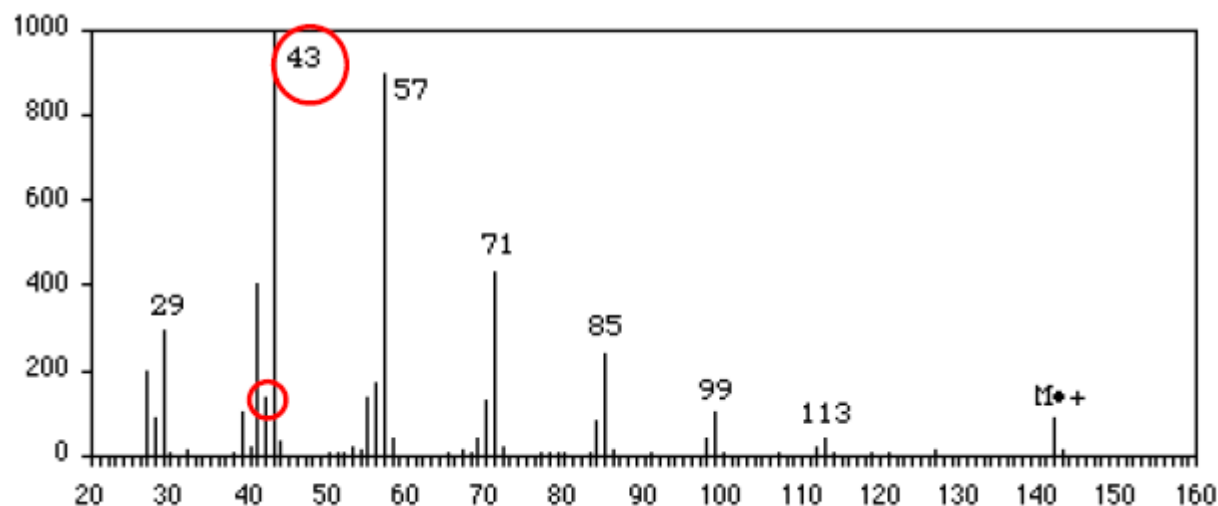
Per calcolare la **massa esatta** di una molecola esistono anche delle tabelle che riportano valori di massa esatta per le varie composizioni

FM	FM	FM	FM				
C ₂ H ₂ O	69.0340	C ₂ H ₄ NO ₂	76.0399	C ₂ H ₆ N ₂	85.0767	C ₂ H ₆ NO ₂	90.0555
C ₂ H ₂ N	69.0579	C ₂ H ₄ N ₂ O	76.0637	C ₂ H ₄ O	85.0653	C ₂ H ₆ N ₂ O	90.0794
C ₂ H ₄	69.0705	C ₂ H ₄ O ₂	76.0524	C ₂ H ₁₁ N	85.0892	C ₂ H ₆ O ₂	90.0681
70		C ₂ H ₅ N	76.0187	C ₂ H ₁₃	85.1018	C ₂ H ₈	90.0470
C ₂ H ₄ N ₂	70.0406	C ₂ H ₄	76.0313	86		91	
C ₂ H ₄ O	70.0054	77		C ₂ H ₂ N ₂ O ₂	86.0116	C ₂ H ₇ O ₄	91.0031
C ₂ H ₄ NO	70.0293	CH ₂ NO ₂	77.0113	C ₂ H ₂ N ₂ O	86.0355	C ₂ H ₇ NO ₂	91.0269
C ₂ H ₄ N ₂	70.0532	C ₂ H ₅ O ₂	77.0238	C ₂ H ₄ N ₄	86.0594	C ₂ H ₇ N ₂ O ₂	91.0508
C ₂ H ₄ O	70.0419	C ₂ H ₅ NO ₂	77.0477	C ₂ H ₅ NO ₂	86.0242	C ₂ H ₇ N ₂ O	91.0746
C ₂ H ₄ N	70.0657	C ₂ H ₅	77.0391	C ₂ H ₄ N ₂ O	86.0480	C ₂ H ₇ O ₃	91.0395
C ₂ H ₆	70.0783	78		C ₂ H ₄ N ₂	86.0719	C ₂ H ₇ NO ₂	91.0634
71		C ₂ H ₄ U ₃	78.0317	C ₂ H ₅ O ₂	86.0368	C ₂ H ₇ N	91.0422
C ₂ H ₄ N ₂ O	71.0246	C ₂ H ₄ N	78.0344	C ₂ H ₄ NO	86.0606	C ₂ H ₇	91.0548
C ₂ H ₄ N ₂	71.0484	C ₂ H ₄	78.0470	C ₂ H ₁₀ N ₂	86.0845	92	
C ₂ H ₄ O ₂	71.0133	79		C ₂ H ₁₀ O	86.0732	C ₂ H ₇ O ₄	92.0109
C ₂ H ₄ NO	71.0371	C ₂ H ₅ N	79.0422	C ₂ H ₁₂ N	86.0970	C ₂ H ₇ NO ₃	92.0348
C ₂ H ₄ N ₂	71.0610	C ₂ H ₇	79.0548	C ₂ H ₁₄	86.1096	C ₂ H ₇ N ₂ O ₂	92.0586
C ₂ H ₄ O	71.0497	80		87		C ₂ H ₇ O ₃	92.0473
C ₂ H ₄ N	71.0736	C ₂ H ₅ N ₂	80.0249	C ₂ H ₅ N ₄	87.0672	C ₂ H ₇ U	92.0262
C ₂ H ₆	71.0861	C ₂ H ₅ N ₂	80.0375	C ₂ H ₅ O ₃	87.0082	C ₂ H ₇ N	92.0501
72		C ₂ H ₆ O	80.0262	C ₂ H ₅ NO ₂	87.0320	C ₂ H ₈	92.0626
C ₂ H ₄ NO ₂	72.0085	C ₂ H ₆ N	80.0501	C ₂ H ₅ N ₂ O	87.0559	93	
C ₂ H ₄ N ₂ O	72.0324	C ₂ H ₆	80.0626	C ₂ H ₅ N ₂	87.0798	C ₂ H ₇ O ₄	93.0187
C ₂ H ₄ N ₂	72.0563	81		C ₂ H ₆ O ₂	87.0446	C ₂ H ₇ NO ₃	93.0426
C ₂ H ₄ O ₂	72.0211	C ₂ H ₅ N ₃	81.0328	C ₂ H ₆ NO	87.0684	C ₂ H ₇ N ₂	93.0453
C ₂ H ₄ NO	72.0449	C ₂ H ₅ N ₂	81.0453	U ₂ H ₁₁ N ₂	87.0923	C ₂ H ₇ U	93.0340
C ₂ H ₄ N ₂	72.0688	C ₂ H ₆ O	81.0340	C ₂ H ₁₁ O	87.0810	C ₂ H ₇ N	93.0579
C ₂ H ₄ O	72.0575	C ₂ H ₅ N	81.0579	C ₂ H ₁₃ N	87.1049	C ₂ H ₈	93.0705
C ₂ H ₄ N	72.0814	C ₂ H ₆	81.0705	88		94	
C ₂ H ₆	72.0939	82		C ₂ H ₅ N ₂ O ₂	88.0273	C ₂ H ₇ O ₄	94.0266
73		C ₂ H ₆ N ₂	82.0406	C ₂ H ₅ N ₂ O	88.0511	C ₂ H ₇ N ₃	94.0406
C ₂ H ₄ NO ₂	73.0164	C ₂ H ₆ NO	82.0293	C ₂ H ₆ N ₄	88.0750	C ₂ H ₇ NO	94.0293
C ₂ H ₄ N ₂ O	73.0402	C ₂ H ₆ N ₂	82.0532	C ₂ H ₆ O ₃	88.0160	C ₂ H ₇ N ₂	94.0532
C ₂ H ₄ N ₂	73.0641	C ₂ H ₆ O	82.0419	C ₂ H ₆ NO ₂	88.0399	C ₂ H ₇ O	94.0419
C ₂ H ₄ O ₂	73.0289	C ₂ H ₆ N	82.0657	C ₂ H ₆ N ₂ O	88.0637	C ₂ H ₇ N	94.0657
C ₂ H ₄ NO	73.0528	C ₂ H ₁₀	82.0783	C ₂ H ₁₁ N ₂	88.0876	C ₂ H ₁₀	94.0783
C ₂ H ₄ N ₂	73.0767	83		C ₂ H ₆ O ₂	88.0524	95	
C ₂ H ₄ O	73.0653	C ₂ H ₇ N ₂	83.0484	C ₂ H ₁₀ NO	88.0763	C ₂ H ₈ N ₂	95.0484
C ₂ H ₆ N	73.0892	C ₂ H ₈ O	83.0133	C ₂ H ₁₂ N ₂	88.1001	C ₂ H ₈ NO	95.0371

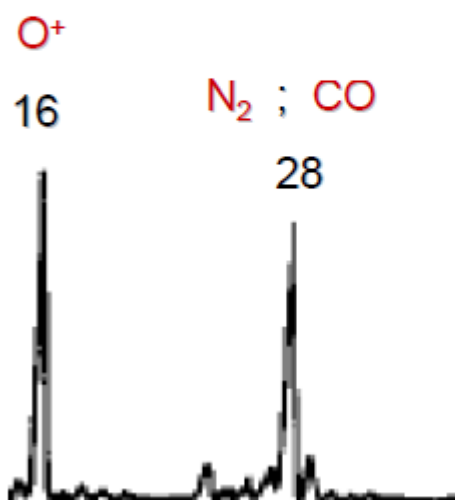
Pag. 48-68
Silverstein

Per calcolare la **massa esatta** di una molecola di cui è nota la composizione elementare è anche possibile utilizzare semplici calcolatori di massa esatta disponibili on line

- Per misurare sperimentalmente la **massa esatta** bisogna avere a disposizione uno spettrometro di massa ad alta risoluzione (HRMS) che fornisce la massa esatta della molecola e da questa, consultando delle tabelle, si può ricavare la formula bruta
- Strumenti a bassa risoluzione forniscono solo la **massa nominale** degli ioni e quindi possono differenziare ioni che hanno massa nominale diversa cioè che differiscono di almeno una o più unità di massa



Infatti, CO e N₂, che hanno identica massa nominale, forniscono un unico segnale a massa nominale **28**;

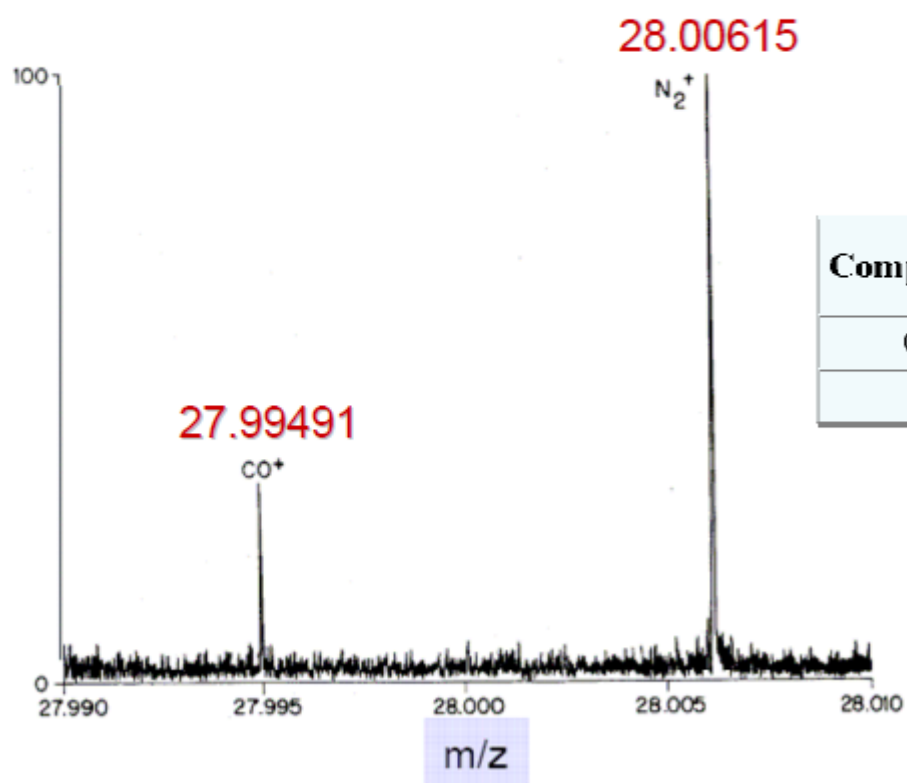


Composition	Nominal Mass
CO	28
N ₂	28

Il segnale del CO e quello del N₂ non possono essere separati

si osserva che essi differiscono di 0,01124 Da

In uno strumento ad alta risoluzione si osservano due ioni separati di **MASSA ESATTA** 27.99491 e 28.00615.



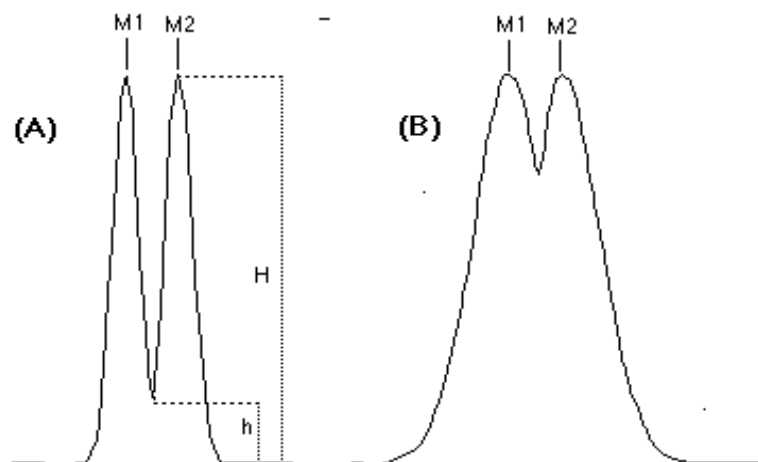
Composition	Nominal Mass	Exact Mass
CO	28	27.99491
N_2	28	28.00615

Potere risolvante

Il *potere risolvante* dello strumento determina la capacità di separare tra di loro ioni di uguale massa nominale ma diversa massa esatta.

$$\text{Potere Risolvante} = M1/(M2 - M1)$$

dove M1 è il valore di massa inferiore, M2 è la massa superiore tra due picchi adiacenti.



Per separare tra di loro gli ioni CO (27.994914) ed N₂ (28.006146) è quindi necessaria una risoluzione di

$$27.994914/(28.006146-27.994914)=2500$$

All'aumentare della massa molecolare è necessaria una risoluzione maggiore.

Ad esempio per separare tra di loro gli ioni C₁₁H₁₀N (156.081320) e C₁₂H₁₂ (156.093896) è necessaria una risoluzione di 12400

Gli spettrometri di massa ad alta risoluzione arrivano fino a 100.000

Ciascuno strumento è caratterizzato - oltre che dal potere risolutivo - dalla **accuratezza** sulla determinazione di masse esatte, normalmente espressa in parti per milione (ppm).

E' la differenza tra la massa teorica e la massa misurata dallo strumento :

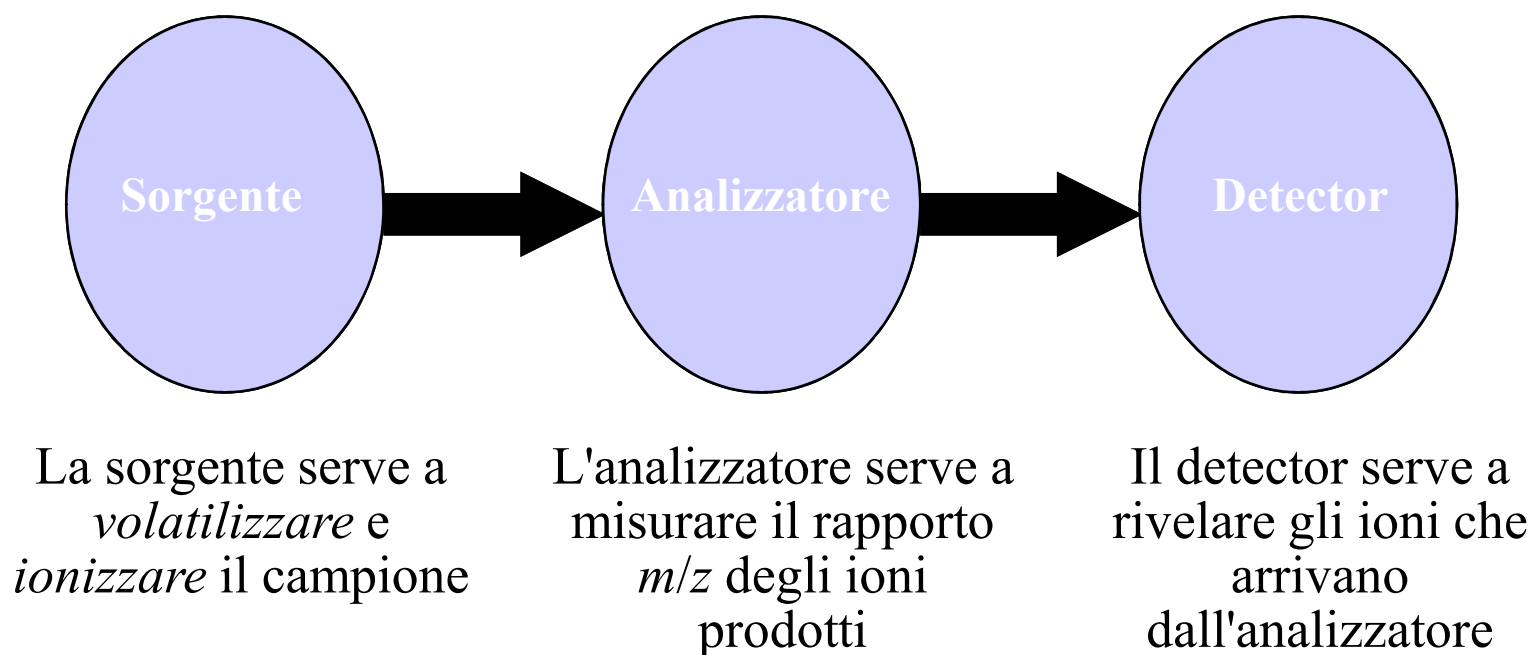
$$\Delta m \text{ accuracy} = m_{\text{real}} - m_{\text{measured}}$$

$$\text{ppm} = 10^6 * \Delta m \text{ accuracy} / m_{\text{measured}}$$

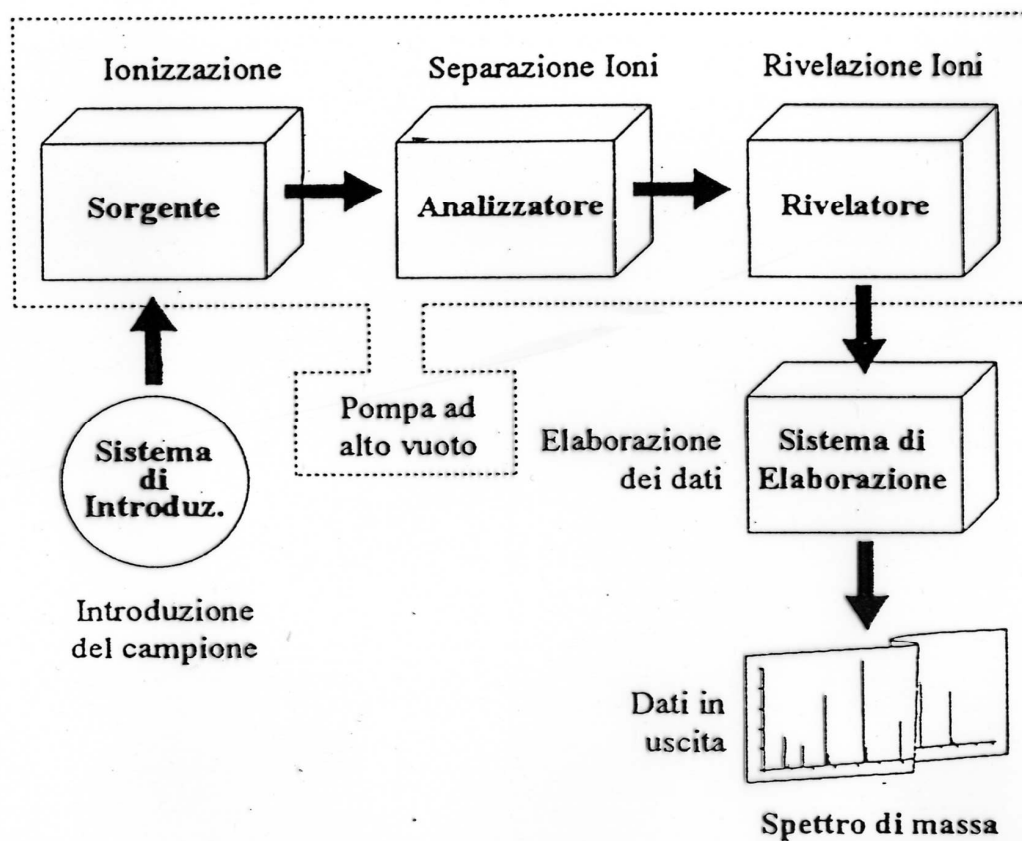
i.e.: theoretical mass: 1000, measured mass: 999.9 error: 100 ppm

Un buon strumento magnetico è in grado di raggiungere una accuratezza migliore di 2 ppm

SCHEMA A BLOCCHI DI UNO SPETTROMETRO DI MASSA



SCHEMA A BLOCCHI DI UNO SPETTROMETRO DI MASSA



SPETTROMETRIA DI MASSA IN GC

Gli analiti devono passare da una zona a p_{atm} a una zona ad alto vuoto ($10^{-5} - 10^{-6}$ torr).

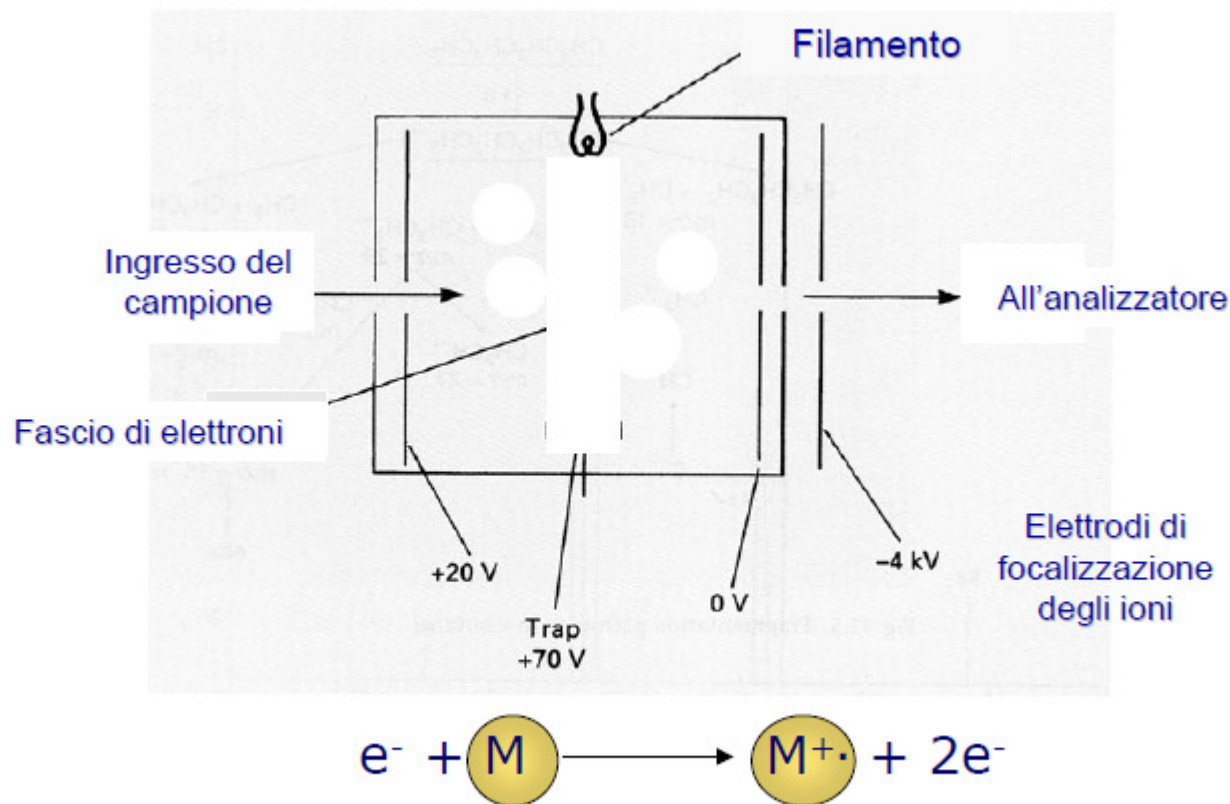
Si usa un'interfaccia che serve per portare gli ioni dall'uscita dalla colonna allo spettrometro di massa.

Può essere:

- a) a connessione diretta
- b) con split aperto
- c) a jet

È una zona di pre-vuoto ed è riscaldata ($200 - 300$ °C).

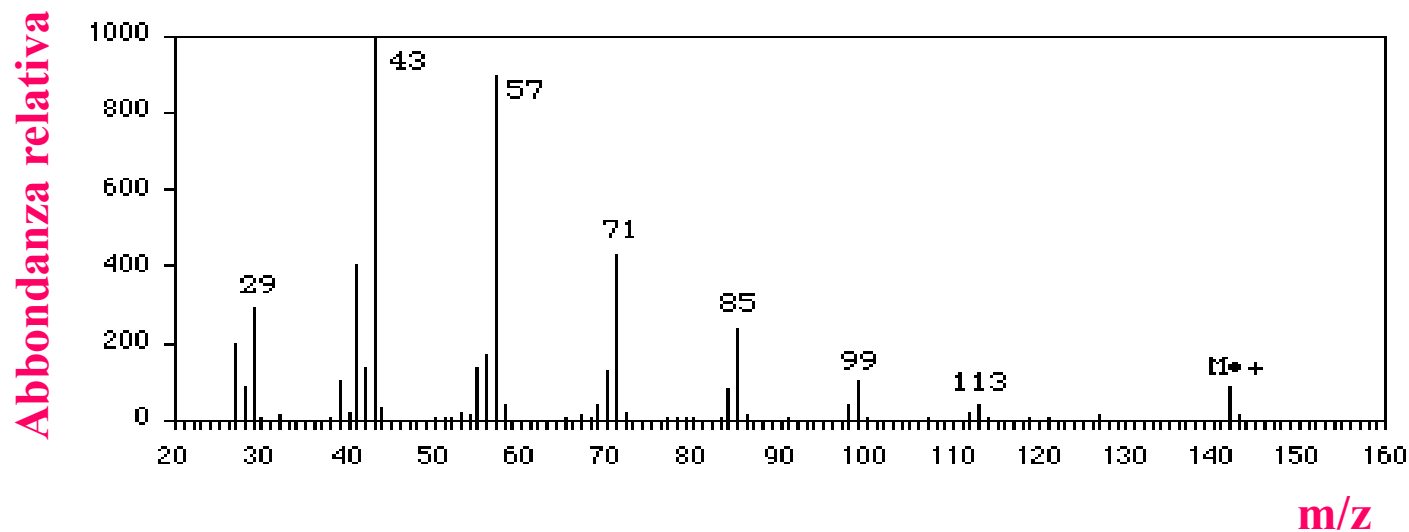
Sorgente a ionizzazione elettronica (EI)



Le molecole gassose (es. da GC) vengono “bombardate” da un fascio di elettroni ad alta energia (70 eV) da cui si formano gli ioni. Si ha la formazione dello ione molecolare (uguale alla massa della molecola) e ioni frammento, formati per rottura dei legami nello ione molecolare generando frammenti diversi.

- Nella camera di ionizzazione le molecole del campione da analizzare, in fase gassosa, interagiscono con un fascio di elettroni ad energia di 70 eV generato da un filamento incandescente (Renio o Tugsteno) ed accelerate attraverso un potenziale regolabile dall'operatore verso una zona di focalizzazione del fascio e quindi all'analizzatore.
- E' la modalità più classica, tuttora molto utilizzata
- E' una ionizzazione «hard» con possibili frammentazioni estese che riducono od eliminano lo ione molecolare
- Il campione deve essere in forma di vapore
- Adatta per composti piccoli (<800 Da), volatili e termicamente stabili
- Interfaccia con GC

IONIZZAZIONE ELETTRONICA (EI)

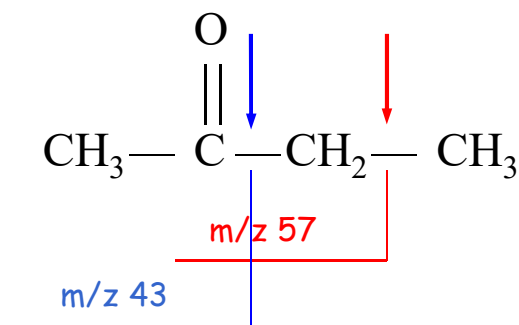
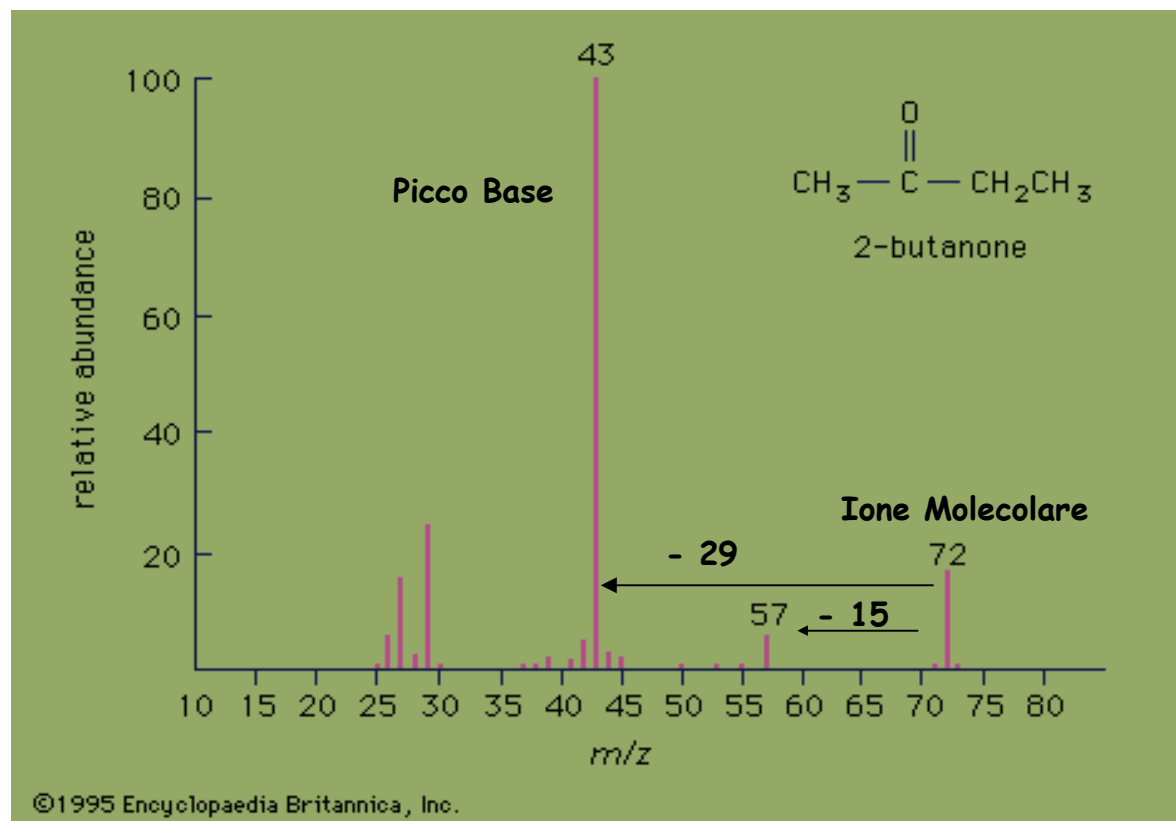


Estesa frammentazione



informazioni strutturali

Spettro del 2-butanone (EI)



Perdita di frammenti logici
(m/z 43 e m/z 57)

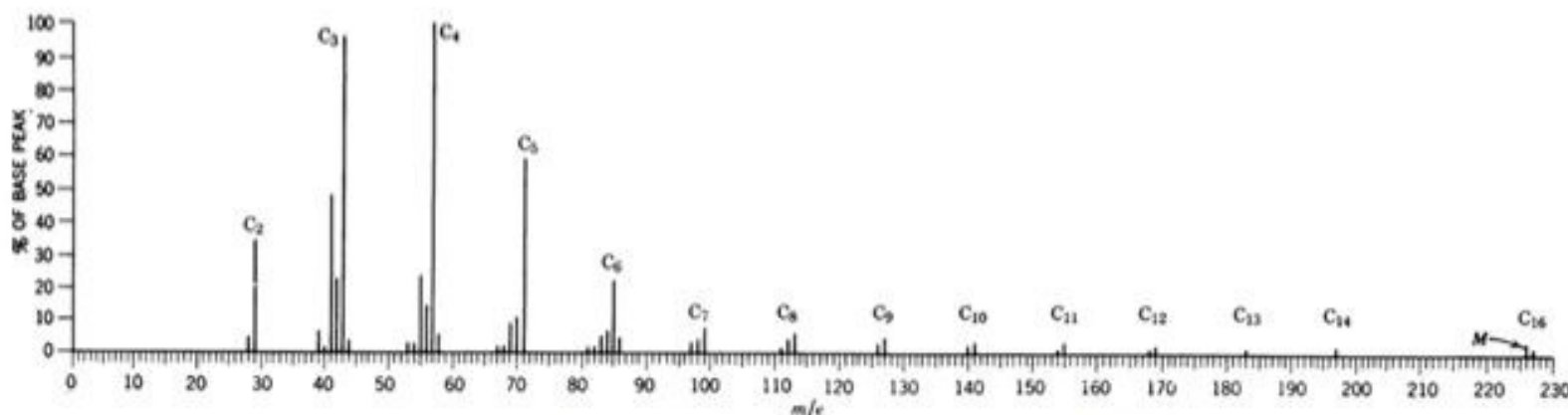
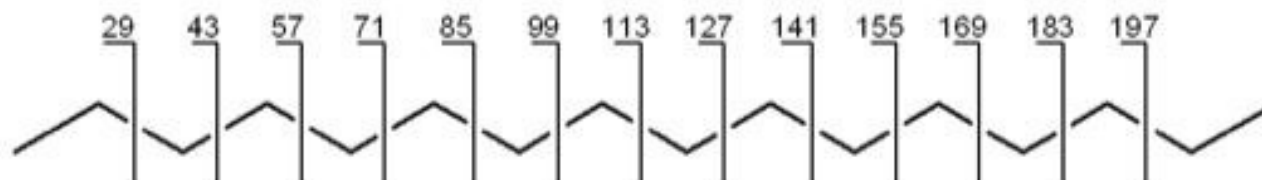
Le molecole si frammentano in modo caratteristico dando frammenti comuni all'interno della classe chimica di appartenenza

Compound type	Common lines
Alkanes	29, 43, 57, 71, 85, 99
Alkenes/cycloalkanes	27, 41, 55, 69, 83, 97
Aliphatic alcohols	31, 45, 59, 73, 87, 101
Aromatics	38, 39, 50-2, 63-5, 75-8
Acids/esters	45, 59, 73, 87, 101
Alkyl amines	30, 44, 58, 72, 86, 100
Chloroalkyl	49, 63, 77, 91, 105
Alkyl silanes	31, 45, 59, 73, 87, 101
Alkyl silanes are a common component of column bleed in capillary column GC/MS data	

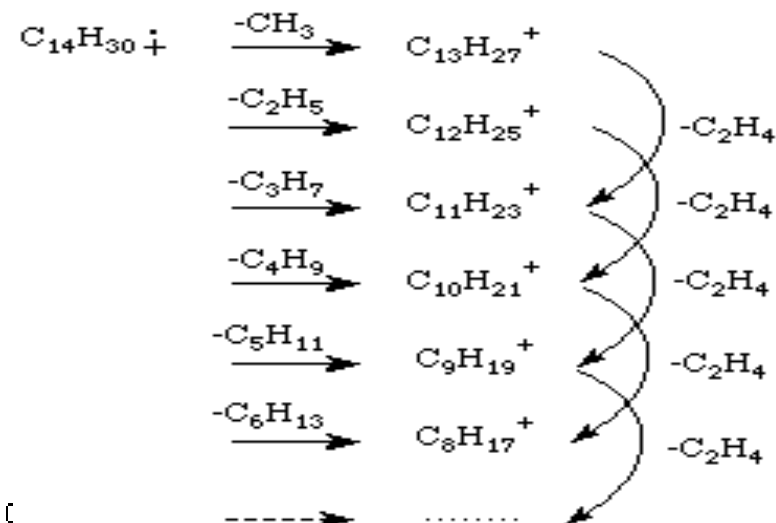
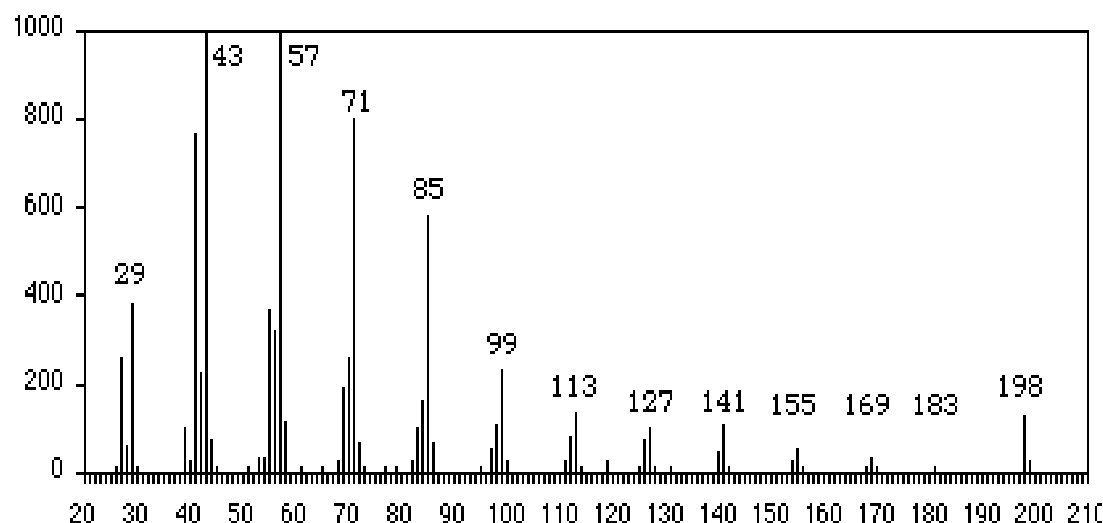
Alcani

Si verifica la scissione di un legame C-C in uno ione a numero dispari di elettroni con formazione di un catione ed un radicale neutro

- ione molecolare poco intenso ma visibile
- frammentazioni di tutti i legami C-C: serie di picchi separati di 14 u.m.a. (C_nH_{2n+1} , m/z 43, 57, 71, 85, 99...), con intensità massima per i cationi a 3-4 atomi di C.
- anche picchi a C_nH_{2n} e C_nH_{2n-1}

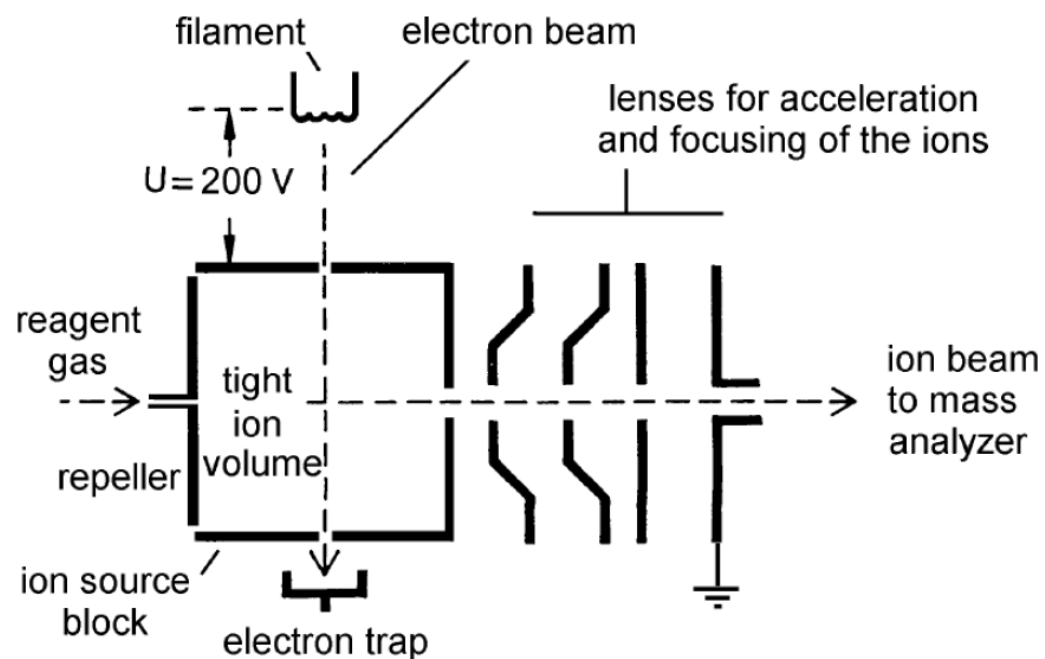


Spettro di massa dell'esadecano ($C_{16}H_{34}$)



Lo spettro di massa degli idrocarburi saturi è caratterizzato da gruppi di ioni distanti tra di loro 14 unità di massa. Gli ioni a massa dispari sono di regola i più abbondanti (più intensi) e la loro osservazione è indicativa della presenza di catene alifatiche. Questi ioni diminuiscono di intensità quanto più l'idrocarburo è a lunga catena.

Sorgente a ionizzazione chimica (CI)



Sorgente per ionizzazione chimica

E' una ionizzazione «soft» che genera uno ione molecolare MH^+ con un basso eccesso di energia (< 5 eV) e quindi le reazioni di frammentazioni sono poco importanti

Lo ione molecolare è sempre presente e quindi si hanno informazioni sul PM ma la frammentazione è scarsa e quindi si hanno scarse informazioni sulla struttura
Il campione deve essere in stato di vapore

Adatto per composti piccoli (< 800 Da), volatili e termicamente stabili

Avviene se introduciamo nella camera di ionizzazione un gas reagente (metano, propano o MeOH, ACN trasferiti in fase vapore) in concentrazioni relativamente elevate (~ 1 mbar).

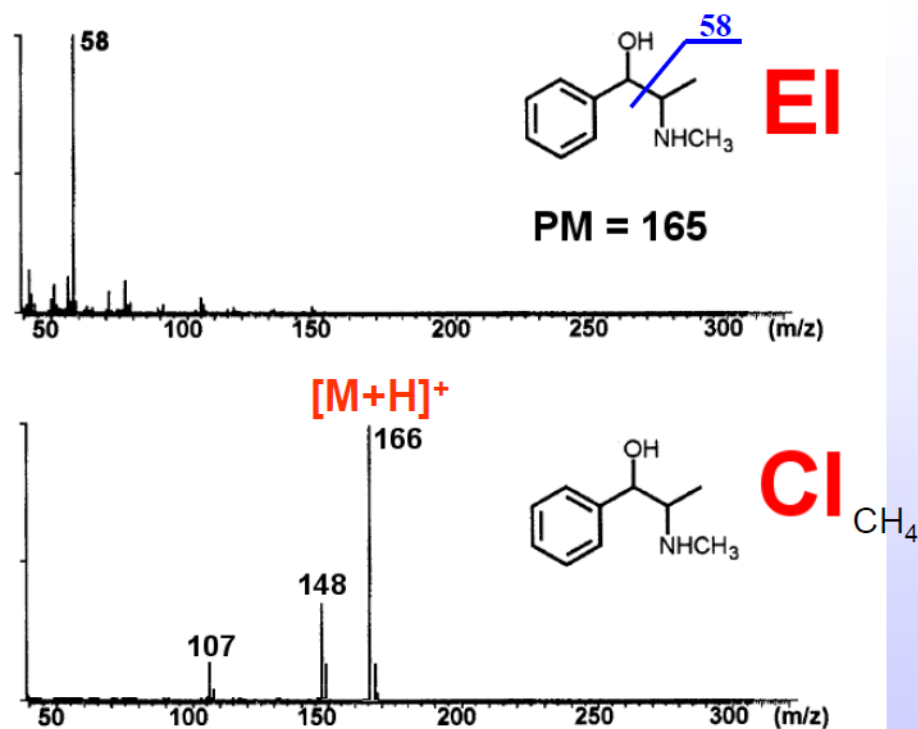


reazione primaria



reazione secondaria (protonazione)

Confronto tra uno spettro ottenuto con ionizzazione elettronica (EI) ed uno spettro ottenuto con ionizzazione chimica (CI)



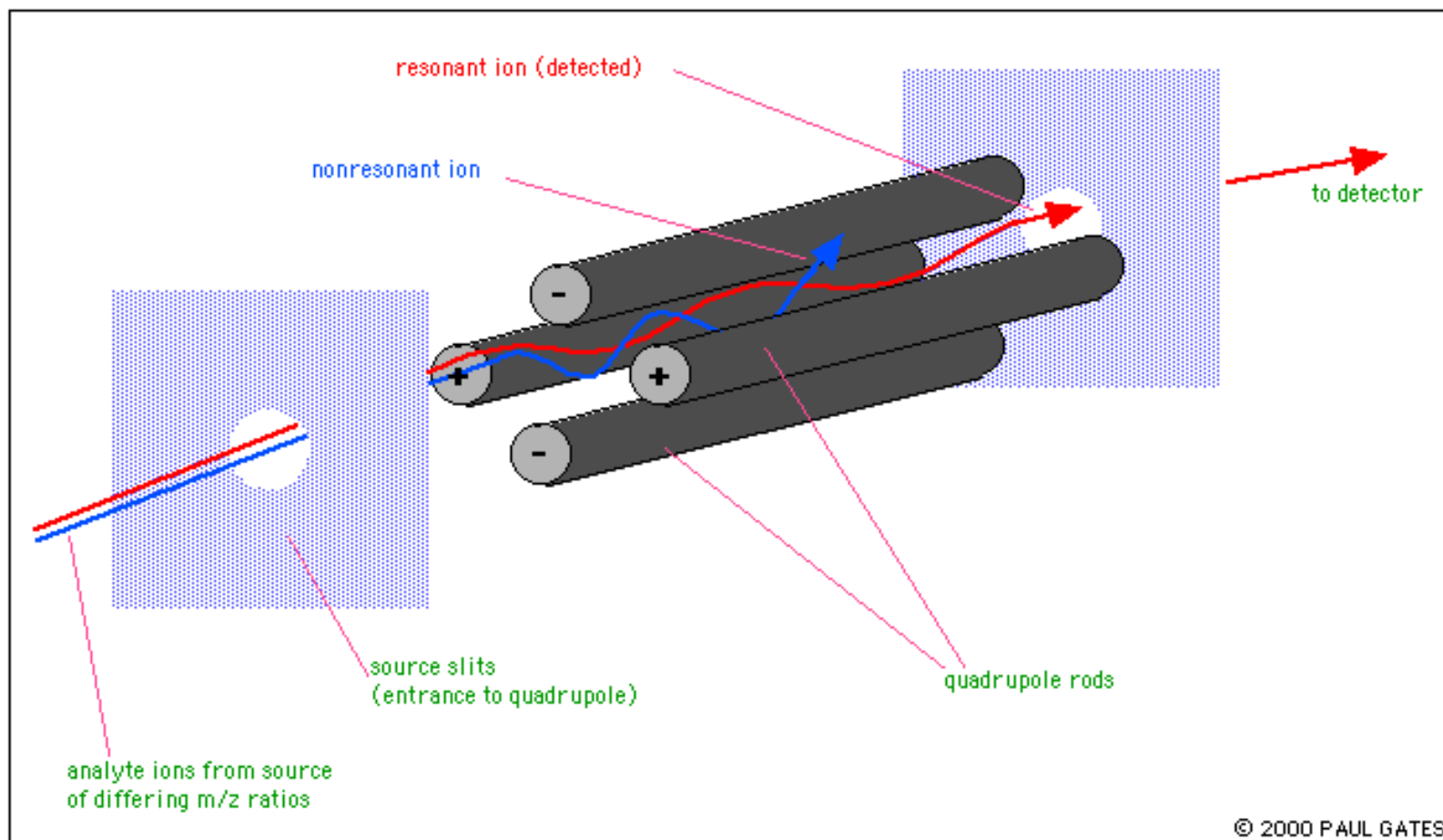
ANALIZZATORI

Gli ANALIZZATORI hanno il compito di separare gli ioni formati nella sorgente in base al rapporto massa/carica (m/z).

Gli analizzatori più usati in GC-MS sono il quadrupolo e la trappola ionica.

Il triplo quadrupolo e la trappola ionica possono anche fare esperimenti di massa/massa (MS/MS): si parla di spettrometria MS/MS o tandem-MS.

ANALIZZATORE A QUADRUPOLO



Il filtro di massa a quadrupolo, il più usato, consiste di 4 o 8 barre metalliche disposte parallelamente alle quali viene applicata una corrente continua (DC) e una radiofrequenza (RF) (le barre diametralmente opposte sono collegate elettricamente tra di loro). Variando la forza dei campi, si realizza la deviazione iperbolica selettiva degli ioni in funzione del rapporto m/z . Facilmente collegabili a sistemi introduzione.

Misura masse fino a 4000 m/z .

Risolve picchi separati di 0.3 m/z (strumento a bassa risoluzione).

Opera a risoluzione costante (ioni a m/z 100 e 101 hanno lo stesso grado di separazione di ioni a m/z 500 e 501).

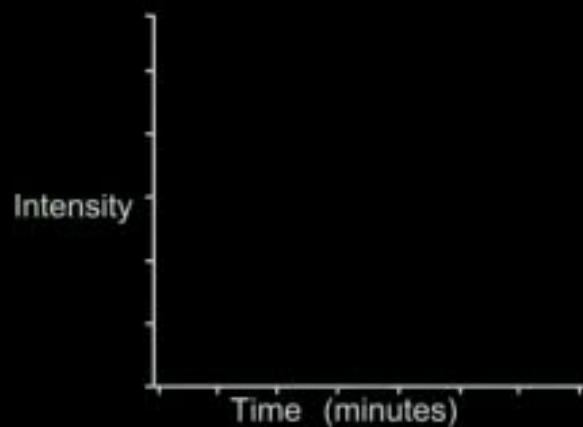
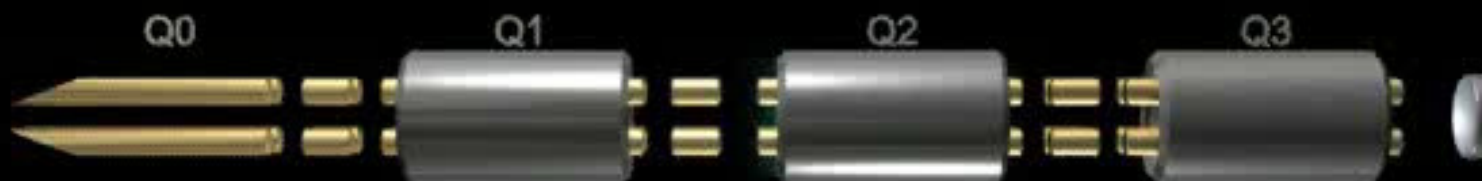
Il quadrupolo può acquisire gli spettri in due modalità differenti:

SIM (single ion monitoring): si monitorano solo specifici m/z (analisi target). Aumento della sensibilità, perché posso aumentare il tempo di acquisizione.

SCAN MODE: si acquisiscono gli spettri in un determinato range di masse. La sensibilità è funzione del range di masse osservato, della velocità di scansione e della risoluzione (o riduco il range ma perdo delle informazioni, o aumento il tempo di scansione che però non origina un buon spettro di massa).

Q0 through Q3

TRIPLO QUADRUPOLO



QTRAP® System

Let's look inside to see the state of the art technology at the heart of the QTRAP® System

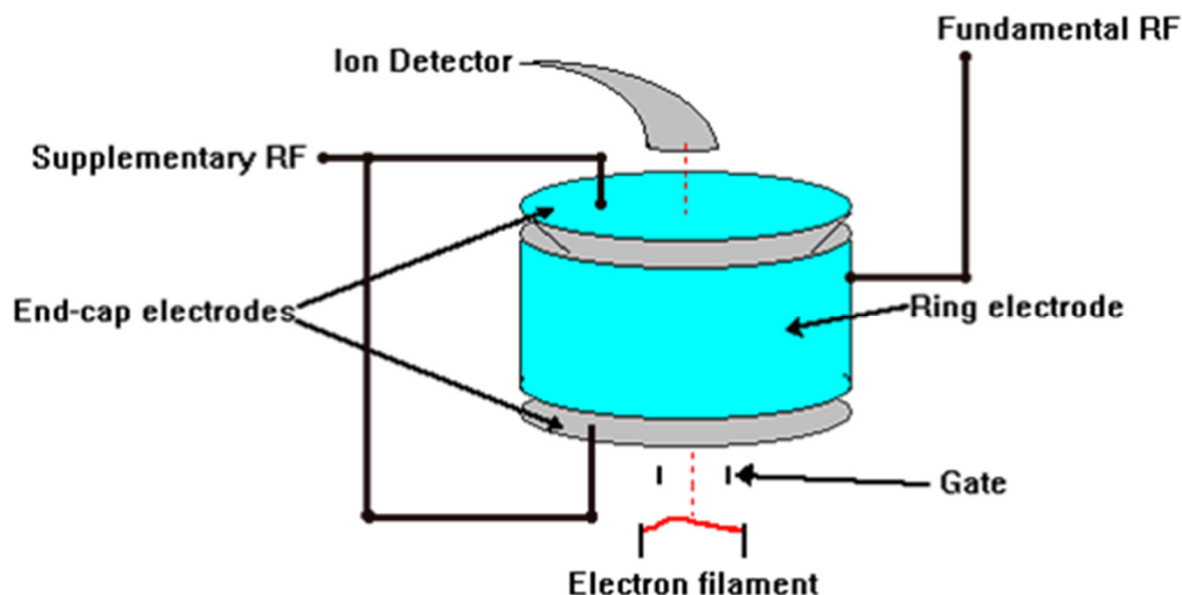
ANALIZZATORE A TRAPPOLA IONICA

Opera con un principio simile a quello del quadrupolo tuttavia non funziona da filtro.

Anziché permettere agli ioni di attraversare il campo quadrupolare, la IT trattiene tutti gli ioni al suo interno

LA IT è costituita da 3 elettrodi in acciaio inossidabile le cui superfici interne sono di forma iperbolica.

Gli elettrodi sono disposti in una geometria a «sandwich» con un elettrodo ad anello nel centro (ring electrode) e due elettrodi laterali (end-cup) uno di entrata ed uno di uscita degli ioni posti sopra e sotto il ring electrode



Misura masse fino a 6000 m/z
Risolve picchi separati di 0.1 m/z

Potere risolvante di 1000-4000
Da 10 a 100 volte più sensibile rispetto al quadrupolo

Gli ioni provenienti dalla sorgente sono raccolti nella trappola e mantenuti in orbite attraverso la combinazione di voltaggi di corrente continua e di radiofrequenze.

All'interno della IT è presente elio ad una pressione di 10^{-3} Torr che collide con gli ioni determinando una diminuzione della loro energia cinetica che si riflette in una riduzione dell'ampiezza delle loro oscillazioni (raffreddamento o «cooling»).

In questo modo l'elio contribuisce a focalizzare gli ioni verso il centro della IT aumentando sensibilità e risoluzione.

Si vede lo spettro di tutti gli ioni presenti nella trappola ad un dato momento. La trappola ripete in modo continuo il seguente ciclo:

- Riempimento della trappola con ioni
- Scansione degli ioni in funzione del rapporto m/z .

Non fa quindi un'analisi in continuo ma una serie di analisi in breve tempo.

Ideale per analisi di MS/MS.

