

A03



Vai al contenuto multimediale

Maria Michela Salvatore, Francesco Filippelli, Francesco Salvatore

Acquisizione e interpretazione degli spettri di massa EI





Aracne editrice

www.aracneeditrice.it
info@aracneeditrice.it

Copyright © MMXIX
Giacchino Onorati editore S.r.l. – unipersonale

www.giacchinoonoratieditore.it
info@giacchinoonoratieditore.it

via Vittorio Veneto, 20
00020 Canterano (RM)
(06) 45551463

ISBN 978-88-255-2196-2

*I diritti di traduzione, di memorizzazione elettronica,
di riproduzione e di adattamento anche parziale,
con qualsiasi mezzo, sono riservati per tutti i Paesi.*

*Non sono assolutamente consentite le fotocopie
senza il permesso scritto dell'Editore.*

I edizione: febbraio 2019

Contenuti

Introduzione	9
Capitolo 1	
Funzione e output dello spettrometro di massa	
1.1 Risoluzione e output dello spettrometro di massa	20
1.2 Calibrazione dell'asse delle masse dello spettrometro di massa	22
1.3 Rappresentazione grafica dell'output dello spettrometro di massa	23
1.4 Estrarre informazioni chimiche dallo spettro di massa EI	27
1.5 Gas cromatografia & spettrometria di massa	29
1.6 Isotopi, Isotopologi e Patterns isotopici	33
1.6.1 Atomi e Isotopi naturali	33
1.6.1.2 <i>Massa atomica e abbondanza naturale degli isotopi di un elemento</i>	35
1.6.1.3 <i>Rappresentazioni del pool isotopico di un elemento</i>	38
1.6.2 Isotopologi e Isotopomeri	39
1.6.2.1 <i>Isotopologi</i>	39
1.6.2.2 <i>Isotopomeri</i>	41
1.6.2.3 <i>Specie neutre e ioni</i>	42
1.6.3 Patterns isotopici di molecole e clusters di atomi	42
1.6.3.1 <i>Patterns isotopici di molecole</i>	42
1.6.3.2 <i>Patterns isotopici di clusters di atomi identici di elementi di-isotopici (i.e., C_n, Cl_n, Br_n, etc...)</i>	45
1.6.3.3 <i>Patterns isotopici di clusters di atomi di elementi di-isotopici diversi e di atomi di elementi tri-isotopici</i>	50
1.6.4 La spettrometria di massa e i patterns isotopici di molecole e clusters di atomi	53
1.6.4.1 <i>Dal pattern isotopico alla composizione atomica di una molecola</i>	56
1.6.4.2 <i>Dal pattern isotopico sperimentale di uno ione al numero di atomi di carbonio</i>	58
1.6.4.3 <i>Dal pattern isotopico sperimentale di uno ione al numero di atomi di Cloro e/o Bromo</i>	60

Capitolo 2

Analizzatori di massa

2.1 Analizzatori di massa a quadrupolo (QMF)	69
2.1.1 Struttura hardware di un analizzatore di massa a quadrupolo	69
2.1.2 Il viaggio degli ioni dalla sorgente di ioni EI al rivelatore attraverso il filtro di massa	73
2.1.3 La traiettoria degli ioni attraverso il QMF	75
2.1.4 La scansione di massa del QMF	82
2.1.4.1 <i>Potere risolutivo del QMF</i>	84
2.1.5 Trasferimento della regione di stabilità del QMF dal piano $a_x \rightarrow q_x$ al piano $U \rightarrow V$	87
2.1.6 Tuning dello spettrometro di massa	90
2.1.7 Analizzatore di massa a triplo quadrupolo	92
2.1.7.1 <i>Uso dell'analizzatore di massa a triplo quadrupolo</i>	94
2.2 Analizzatori di massa a trappola ionica (QIT)	99
2.2.1 Struttura hardware di un analizzatore di massa a trappola ionica	99
2.2.2 Il moto degli ioni attraverso il QIT	101
2.2.3 Cattura degli ioni nel QIT e LMCO (<i>Low Mass Cut Off</i>)	106
2.2.4 Scansione di massa del QIT	109
2.2.5 Estensione del range di massa del QIT	110
2.2.6 Effetti spazio carica e AGC (<i>Automatic Gain Control</i>)	113
2.2.7 Funzioni di scansione speciali del QIT	116
2.2.8 Steps multipli di analisi di massa del QIT	118
2.2.9 Potere risolutivo del QIT	119
2.3 Analizzatori di massa Time of Flight (TOF)	120
2.3.1 Analizzatori TOF ad accelerazione verticale (oa-TOF)	122
2.3.2 Strategia di acquisizione dello spettro di massa TOF	123
2.3.3 Potere risolutivo dell'oa-TOF	124
2.3.4 Reflectron oa-TOF	126
2.3.5 Accuratezza delle misure di massa con il reflectron oa-TOF	129
2.3.6 Calibrazione dell'asse delle masse del TOF	130
2.3.7 Rivelazione degli ioni in uno spettrometro di massa TOF	133
2.3.8 Analizzatore di massa Quadrupolo - Time of Flight (QqTOF)	136

Capitolo 3

Gas Cromatografia & Spettrometria di Massa

3.1	La strategia della Gas Cromatografia/Spettrometria di massa	137
3.2	Stato Inattivo o <i>Idle</i> del gas cromatografo	143
3.2.1	Le fasi stazionarie della gas cromatografia	145
3.3	Stato Attivo o <i>Running</i> del gas cromatografo	148
3.3.1	Il processo di separazione gas cromatografico	154
3.3.2	Uso della temperatura della colonna per il controllo della ritenzione gas cromatografica	156
3.3.3	Sorgente di ioni EI e Sorgente di ioni CI	160
3.4	Post acquisizione o Post run	166
3.4.1	Risoluzione gas cromatografica	166
3.4.1.1	<i>Numero di piatti teorici, N, e Altezza Equivalente al Piatto Teorico (HETP)</i>	170
3.4.2	Estrarre informazioni chimiche dal TICC	175
3.4.2.1	<i>Indici di ritenzione di Kovats, RI^K</i>	177
3.4.2.2	<i>Quantificazione dei componenti di una miscela</i>	179
3.4.2.3	<i>Analisi Target e modo di acquisizione SIM del GC/MS</i>	181
3.4.2.4	<i>Deconvoluzione del TICC</i>	183

Capitolo 4

Creazione e fato dello ione molecolare nella sorgente EI

4.1	Curve di Morse dell'energia potenziale e superfici dell'energia potenziale	192
4.2	Ionizzazione di una molecola nella sorgente EI	196
4.3	Scala dei tempi degli eventi in uno spettrometro di massa	197
4.4	Ridistribuzione dell'energia interna dello ione molecolare	201
4.5	Dipendenza della costante di velocità $k(E)$ dal meccanismo di frammentazione	204
4.6	Velocità di frammentazione e stabilità termodinamica dei prodotti di frammentazione dello ione molecolare	206

Capitolo 5

Esplorazione e rappresentazione delle connessioni fra struttura molecolare e spettro di massa EI

5.1	La struttura dello ione molecolare, M ⁺	211
5.2	Rappresentazioni dello ione molecolare	212
5.3	Grammatica delle reazioni di frammentazione dello ione molecolare	213
5.3.1	Numero di elettroni e formule di composti, di radicali e di ioni radicalici	213
5.3.2	Numero di Anelli e/o di Doppi Legami dalla formula di una specie chimica (<i>Ring and/or Double Bonds, RDB</i>)	215
5.3.3	Regola dell'azoto	216
5.3.4	Alberi di frammentazione	218
5.3.5	Tecniche di scissione dei legami sigma	220
5.3.5.1	<i>Scissione di un legame sigma nel modello dello ione molecolare con la carica localizzata</i>	220
5.3.5.2	<i>Scissione di un legame sigma nel modello dello ione molecolare con la carica non localizzata</i>	224
5.3.6	Regola di Stevenson	225
5.3.7	Ambito di applicazione della regola di Stevenson e valutazione delle Energie di Dissociazione (DE) dei legami dello ione molecolare	229
5.3.7.1	<i>Energia di apparizione (AE, Appearance Energy) di uno ione frammento</i>	232
5.3.8	Regola degli Elettroni Pari (EER, <i>Even Electron Rule</i>)	234
5.3.9	Stabilità termodinamica di ioni e radicali	235
5.4	Overview delle reazioni di frammentazione dello ione molecolare e degli ioni primari	237
5.4.1	Ioni Primari EE ⁺ dalla scissione di un singolo legame dello ione molecolare nativo	239
5.4.1.1	<i>Scissione-σ degli idrocarburi saturi e ioni alchil carbenio</i>	239
5.4.1.2	<i>Ioni EE⁺ da scissione di legame iniziata a un sito radicalico</i>	241
5.4.1.3	<i>Regola del Radicale più Grande e/o più Ramificato (regola RGR)</i>	244
5.4.1.4	<i>Scissione-α nelle ammine alifatiche e ioni immonio</i>	246
5.4.1.5	<i>Scissione-α negli alcoli e negli eteri alifatici e ioni ossonio</i>	247
5.4.1.5.1	<i>Scissione-ω negli eteri alifatici</i>	250
5.4.1.6	<i>Scissione-α nei tioli e tioeteri alifatici e ioni sulfonio</i>	253
5.4.1.7	<i>Scissione-α negli alogenuri alifatici e ioni ciclici bromonio e cloronio</i>	253

5.4.1.8	Scissione- α nei chetoni e nelle aldeidi e ioni acilio	255
5.4.1.9	Scissione- α negli acidi carbossilici e nei loro esteri alifatici	257
5.4.1.10	Scissione- α negli alcheni e alchini alifatici (ioni alchenile e alchinile)	258
5.4.1.11	Scissione- α negli alchil benzeni e ioni fenilico e tropilico	261
5.4.1.12	Scissione- α negli alcohols benzilici e negli alchil fenoli e ioni tropiliolo	263
5.4.2	Ioni primari $OE^{+\bullet}$ dalla scissione di due legami nello ione molecolare nativo di molecole acicliche	265
5.4.2.1	Isomerizzazione per shift di atomi di idrogeno (<i>Hydrogen Shift</i>)	267
5.4.2.2	Riarrangiamento di <i>McLafferty</i>	269
5.4.2.3	Altri riarrangiamenti via shift di un atomo di idrogeno	274
5.4.2.4	Eliminazione Orto (<i>Effetto Orto</i>)	277
5.4.3	Ioni primari $OE^{+\bullet}$ dalla scissione di due legami nello ione molecolare nativo di molecole cicliche	279
5.4.3.1	Riarrangiamento retro- <i>Diels-Alder</i>	282
5.4.3.2	Frammentazione di eterocicli saturi	283
5.4.4	Ioni primari EE^+ dalla scissione di tre legami nello ione molecolare nativo	285
5.4.4.1	Perdita di propile dagli ioni molecolari di cicloesano e di cicloesano	285
5.4.4.2	Riarrangiamento di <i>McLafferty</i> con doppio trasferimento di idrogeno	288
5.4.5	Commento riassuntivo alle reazioni primarie di frammentazione dello ione molecolare (e uno sguardo in avanti)	291
5.5	Il fato degli ioni primari prodotti dalla frammentazione dello ione molecolare	300
5.5.1	Il fato degli ioni alchil carbenio	303
5.5.2	Il fato degli ioni immonio	307
5.5.3	Il fato degli ioni ossonio	310
5.5.4	Il fato degli ioni acilio	313
5.5.5	Il fato degli ioni fenilico, $C_6H_5^+$, e tropilico, $C_7H_7^+$	317
5.5.6	Il fato degli ioni Tropiliolo, $C_7H_7O^+$	319
5.6	Overview delle Perdite Neutre (<i>Neutral Losses</i>)	322
5.6.1	Eliminazione di acido cianidrico, HCN	327
5.6.2	Eliminazione di diossido di azoto, $\bullet NO_2$, e ossido nitrico, $\bullet NO$	334
5.6.3	Eliminazione di ossido di carbonio, CO (decarbonilazione)	334
5.6.4	Eliminazione di anidride carbonica, CO_2 (decarbossilazione)	341
5.6.5	Eliminazione di acqua, H_2O	345
5.6.6	Eliminazione di acido solfidrico, H_2S , sulfanile, HS^\bullet , e monosolfuro di carbonio, CS	350

Capitolo 6

Librerie di spettri di massa EI e programmi di ricerca e confronto

6.1	La filosofia della strategia di confronto di spettri di massa	358
6.1.1	Algoritmi di ricerca e confronto	358
6.1.2	Quanto riproducibili sono gli spettri di massa EI?	360
6.1.3	Quanto differenti sono gli spettri di massa di composti diversi?	364
6.1.4	Range di m/z dell'acquisizione	365
6.2	Il programma di ricerca e confronto MS Search e la libreria di spettri di massa NIST17	367
6.2.1	Tipi di ricerca e opzioni di ricerca in MS Search	370
6.2.2	Hit List e basi per l'interpretazione dei risultati della procedura di ricerca e confronto di MS Search	378
6.2.2.1	La logica e il significato del <i>Reverse Matching</i>	383
6.2.2.2	La colonna <i>Prob (%)</i> della <i>Hit List</i> di MS Search	388
6.2.2.3	L'indicatore <i>InLib</i> di MS Search	394
6.2.2.4	Il significato combinato dei parametri <i>Prob (%)</i> e <i>InLib</i> di MS Search	397
6.2.2.5	Lo strumento <i>Substructure Identification</i> di MS Search	400

Capitolo 7

Valutazione della composizione atomica dello ione molecolare dal suo pattern isotopico

7.1	Difficoltà di individuazione del pattern isotopico dello ione molecolare nello spettro di massa EI	407
7.2	Procedura di riferimento per il calcolo del pattern isotopico di uno ione in uno spettro di massa EI dalla sua composizione atomica	409
7.2.1	Calcolo del pattern isotopico dello ione molecolare del propene, $C_3H_6^{+\bullet}$	412
7.2.2	Calcolo del pattern isotopico dello ione molecolare di tetracloropropene, $C_3H_2Cl_4^{+\bullet}$	417
7.2.3	Calcolo dell'abbondanza relativa del picco X + 1 del pattern isotopico di uno ione	421
7.2.4	Calcolo dell'abbondanza relativa del picco X + 2 del pattern isotopico di uno ione	423
7.3	Valutazione della composizione atomica dello ione molecolare dal suo pattern isotopico estratto da uno spettro di massa EI	426

8 *Contenuti*

§ Step 1: Valutazioni relative al picco X + 2 del pattern isotopico	430
§ Step 2: Valutazioni relative al picco X + 1 del pattern	432
§ Step 3: Valutazione dei residui della massa molecolare, $\langle mMR_1 \rangle$, del picco X+1, $\langle {}^1AR^{X+1} \rangle$, e del picco X+2, $\langle {}^1AR^{X+2} \rangle$	432
§ Step 4: Valutazione dei residui $\langle {}^2AR^{X+1} \rangle$ e $\langle mMR_2 \rangle$	433
§ Step 5: Validazione della formula	434
§ Esempi dell'applicazione della strategia di valutazione della composizione dello ione molecolare dal suo pattern isotopico	434
7.4 Uso degli strumenti di MS Search per verificare e modificare la formula dello ione molecolare dedotta dal suo pattern isotopico	440
7.5 Test della procedura di analisi del pattern isotopico di uno ione	447

Capitolo 8

Epilogo

8.1 Confronto dello spettro di massa EI con gli spettri di massa di una libreria	450
8.2 Interpretazione <i>ab initio</i> dello spettro di massa EI	450
8.3 Uso di databases <i>non-spettrali</i> per l'identificazione di una sostanza incognita	457
8.4 Accrescere l'attendibilità dell'identificazione	466

Introduzione

Negli ultimi quindici anni, la spettrometria di massa ha compiuto straordinari avanzamenti grazie al continuo accrescimento delle capacità e della facilità d'uso di sorgenti di ioni, analizzatori di massa, rivelatori e computer.

Ciò, insieme al costo e all'ingombro contenuti degli strumenti, ha consentito la diffusione della spettrometria di massa, che è presentemente considerata la tecnica standard per risolvere problemi chimici e analitici complessi che sarebbe impossibile affrontare con altre tecniche.

Infatti, l'applicazione della spettrometria di massa ha rivoluzionato l'approccio a una varietà di problemi in settori delle scienze di base e applicate (come la biologia, la biochimica, le scienze ambientali, l'industria del petrolio, la produzione industriale di farmaci e altri beni di consumo, la chimica analitica forense, etc...) che condividono l'esigenza quotidiana di identificare rapidamente e attendibilmente tracce di sostanze organiche in campioni con una matrice più o meno complessa.

L'utilità pratica della spettrometria di massa è stata enormemente dilatata dall'ifenzione dello spettrometro di massa con un cromatografo e, presentemente, praticamente tutti gli spettri di massa sono acquisiti con un sistema ifenato GC/MS (Gas cromatografia/Spettrometria di massa) o LC/MS (Cromatografia Liquida/Spettrometria di massa).

Infatti, ciò consente l'acquisizione degli spettri di massa dei componenti puri di un campione anche molto complesso riducendo a un minimo il lavoro preliminare di preparazione del campione prima che esso sia presentato allo spettrometro di massa.

Pertanto, nel presentare la spettrometria di massa è impossibile evitare di introdurre argomenti connessi con la cromatografia.

Tuttavia, in questo testo l'attenzione è focalizzata sugli spettri di massa ottenuti con una *Sorgente di ioni EI (Electronic Ionization)* che sono pressoché invariabilmente acquisiti con un sistema GC/MS.

Pertanto, i principali concetti alla base delle separazioni gas cromatografiche e delle problematiche connesse con l'ifenzione di un gas cromatografo con uno

spettrometro di massa sono presentati nel Capitolo 3, mentre la cromatografia liquida è, per scelta, praticamente ignorata.

Poiché, per acquisire il suo spettro di massa EI, una molecola deve essere volatilizzata nell'iniettore del gas cromatografo (o, più raramente, direttamente nella sorgente di ioni dello spettrometro di massa), la ionizzazione EI è applicabile soltanto a molecole di massa inferiore a circa 1000 u.

Cionondimeno, vi sono centinaia di migliaia di molecole che possono essere identificate e quantificate via GC/MS (eventualmente, dopo la loro conversione in surrogati con più convenienti proprietà gas cromatografiche).

L'ifenzione di un gas cromatografo con uno spettrometro di massa ha creato valore aggiunto sia alla gas cromatografia che alla spettrometria di massa poiché i dati GC/MS si prestano a una serie di valutazioni che sono impossibili con dati acquisiti con un gas cromatografo provvisto di un rivelatore convenzionale o con uno spettrometro di massa isolato.

Molti softwares *ad hoc* sono stati e continuano a essere specificamente sviluppati per estrarre informazioni chimiche, qualitative e quantitative, dai dati GC/MS in maniera rapida e attendibile.

Nell'ultimo decennio, principalmente grazie ai decisivi avanzamenti nella tecnologia degli analizzatori *Time of Flight* (TOF), l'acquisizione di dati GC/MS *ad alta risoluzione* si è notevolmente diffusa.

Cionondimeno, il *cavallo da lavoro* della GC/MS è un gas cromatografo, provvisto di una colonna capillare *low bleeding*, interfacciato con uno spettrometro di massa provvisto di un analizzatore di massa a bassa risoluzione (o, come si suol dire, *con la risoluzione posta all'unità di massa*) e una sorgente di ioni EI, ad alta efficienza di ionizzazione, che può essere operata con elettroni di energie fra 15 eV e 100 eV.

Nel Capitolo 1, che è un capitolo introduttivo, che presenta diversi argomenti che saranno successivamente sviluppati nei capitoli successivi, è, fra l'altro, messo in evidenza che uno spettro di massa EI, acquisito con un analizzatore di massa a bassa risoluzione, contiene un numero minore di informazioni chimiche dirette del corrispondente spettro di massa ad alta risoluzione.

Cionondimeno, uno spettro di massa EI a bassa risoluzione, acquisito sotto condizioni controllate, è altamente riproducibile e si presta magnificamente a una

procedura di riconoscimento completamente automatizzata che consente di identificare una sostanza dal suo spettro di massa EI in poche decine di secondi.

Questa procedura consiste nel confrontare lo spettro di massa di una sostanza incognita, acquisito nel proprio laboratorio, con gli spettri di massa collezionati in una libreria commerciale di spettri di massa EI.

La procedura di identificazione di una sostanza incognita, per confronto dello spettro di massa con gli spettri di massa di una libreria commerciale, è la ragione della grande popolarità e diffusione dei sistemi GC/MS a bassa risoluzione e, pertanto, il Capitolo 6 è dedicato all'implementazione, ai vantaggi e alle problematiche connessi con questa strategia di identificazione.

Sfortunatamente, poiché la procedura di confronto di spettri di massa EI può essere eseguita, anche da parte di utenti inesperti, con alcuni click del mouse (dopo aver importato lo spettro di massa in softwares commerciali dotati di estese librerie di spettri di massa e degli strumenti necessari per eseguire l'operazione di confronto), la disciplina classica, conosciuta come *Interpretazione degli spettri di massa EI*, ha subito un ingiustificato declino.

L'evento primordiale, da cui deriva lo spettro di massa EI di una sostanza, è la formazione nella sorgente EI di uno ione molecolare, M^+ , che è formato dalla molecola neutra, M , per perdita di un elettrone a seguito dell'interazione con un fascio di elettroni ionizzanti di alta energia.

Questo primordiale evento, che insieme alle caratteristiche strutturali della molecola neutra, definisce il numero e posizione dei picchi di massa lungo l'asse m/z di uno spettro di massa EI, è presentato e discusso da un punto di vista teorico nel Capitolo 4.

I picchi di massa in uno spettro di massa EI corrispondono a frammenti ionici prodotti nella sorgente di ioni EI dalle reazioni di decomposizione allo stato gassoso dello ione molecolare che sono governate dalla struttura chimica di M^+ e, quindi, della molecola M .

Classicamente, la disciplina di interpretazione, per così dire, *ab initio* degli spettri di massa EI è fondata sull'idea che, conoscendo la chimica che governa la formazione di ioni nella sorgente EI (i.e., *regole di frammentazione*), sia possibile, almeno in astratto, ricostruire dai frammenti osservati, la struttura della molecola intera da cui essi sono stati generati.

La teoria e le strategie per l'interpretazione degli spettri di massa EI sono state sviluppate negli ultimi decenni dello scorso secolo, dopodiché esse sono rapidamente delegate dal curriculum degli studenti di discipline chimiche sopravanzate dal semplice approccio computerizzato al riconoscimento di sostanze incognite.

Sebbene la procedura di confronto di spettri di massa ne abbia, nella pratica quotidiana, eroso il significato pratico, la disciplina classica dell'interpretazione *ab initio* dello spettro di massa EI, sulla base di definite regole di frammentazione, ha conservato intatto il suo valore didattico per la sua capacità di mettere a fuoco una serie di problematiche e correlazioni che costituiscono il background chimico della spettrometria di massa (indipendentemente dal tipo di strumentazione con cui uno spettro di massa può essere acquisito).

Inoltre, un particolare campo in cui la GC/MS si è guadagnata una posizione importante è la *metabolomica*, che si può intendere come la disciplina che ha per oggetto l'identificazione di nuovi composti di basso peso molecolare di origine biologica come, per esempio, le *piccole* molecole sintetizzate da una varietà di microorganismi e non ancora descritte. Infatti, i microorganismi sintetizzano piccole molecole che svolgono una qualche funzione biologica nel loro ciclo vitale e che, pertanto, sono bioattive e possono servire come modelli strutturali per la sintesi e produzione di farmaci e composti utili per l'uomo.

Composti che non sono mai stati descritti non sono ovviamente presenti in alcun database e, pertanto, informazioni sulla loro struttura possono essere acquisite, dalla spettrometria di massa, solo attraverso l'interpretazione *ab initio* del loro spettro di massa.

Uno degli scopi di questo testo è, quindi, di sviluppare in maniera comprensibile e logicamente organizzata i temi fondamentali della disciplina classica di interpretazione degli spettri di massa EI, almeno fino al punto ritenuto appropriato per evitare un uso acritico dei numerosi softwares sviluppati per assistere il chimico nel processo di identificazione di una sostanza dal suo spettro di massa.

La maggior parte della chimica connessa con le reazioni di frammentazione dello ione molecolare, che hanno luogo nella sorgente EI dopo l'interazione della molecola con gli elettroni ionizzanti, è presentata nel Capitolo 5.

Deliberatamente, al fine di enfatizzare le connessioni fra i diversi meccanismi di frammentazione di molecole di classi diverse ed esaltarne la loro comune logica, l'argomento è stato confinato in un singolo capitolo.

Pertanto, il Capitolo 5 è piuttosto complesso e contiene un cospicuo numero di schemi di frammentazione, di strutture e di spettri di massa che servono per veicolare i concetti fondamentali.

Inoltre, nel Capitolo 5, sono esposte un certo numero di correlazioni di significato strutturale espresse attraverso sequenze di valori numerici (valori di m/z) che sarebbe desiderabile imparare a memoria poiché, in casi favorevoli, consentono, a colpo d'occhio, di attribuire significato chimico alla sequenza di segmenti, dislocati lungo l'asse m/z , da cui è costituito un tipico spettro di massa EI.

Tuttavia, i picchi di uno spettro di massa sono collocati nel duplice contesto delle reazioni di frammentazione e dei *patterns isotopici* degli ioni.

Il fondamentale tema dei patterns isotopici associati a molecole, ioni e clusters di atomi e del loro ruolo nella spettrometria di massa è introdotto nel paragrafo finale del Capitolo 1. Pertanto, in generale, il Capitolo 5 non dovrebbe essere letto prima di aver letto il Capitolo 1.

Il tema dell'interpretazione dei patterns isotopici degli ioni, esposti in uno spettro di massa, è ulteriormente esteso nel Capitolo 7, che è specificamente orientato all'interpretazione del pattern isotopico dello ione molecolare, da cui si può derivare la formula empirica della sostanza da cui lo spettro di massa EI è stato generato.

Il Capitolo 2 tratta, in un certo dettaglio, la teoria alla base del funzionamento dei tre principali tipi di analizzatori di massa (i.e., l'analizzatore di massa a quadrupolo (QMF, *Quadrupole Mass Filter*), l'analizzatore a trappola ionica (QIT, *Quadrupole Ion Trap*) e l'analizzatore TOF (*Time of Flight*) e introduce alcuni dei più popolari arrays di analizzatori di massa (Analizzatore di massa a triplo quadrupolo (QqQ) e Analizzatore di massa Quadrupolo-Time of Flight (QqTOF)) che sono usati nella spettrometria di massa *tandem* o MS/MS.

A una prima lettura, per acquisire almeno un'idea di base dei principi fisici che presiedono al funzionamento di un analizzatore di massa, si può leggere solo la prima parte del Capitolo 2, riguardante la teoria del filtro di massa a quadrupolo. Oppure, si può ritornare successivamente al Capitolo 2 leggendo eventualmente solo la parte relativa al tipo di analizzatore di massa di specifico interesse.

Infine, nel Capitolo 8 è tracciata e descritta una strategia sistematica attraverso cui, impiegando le proprie capacità interpretative e un certo numero di strumenti software e databases, dovrebbe essere possibile finalizzare tutte le informazioni raccolte da uno spettro di massa EI e individuare la struttura della sostanza da cui lo spettro di massa è stato generato.

Molti degli strumenti e databases necessari per implementare la strategia di riconoscimento descritta nel Capitolo 8 sono resi disponibili gratuitamente attraverso il WEB, con l'eccezione delle librerie di spettri di massa EI che sono prodotti commerciali che possono essere acquistati o dai produttori di strumentazione per la spettrometria di massa o da siti WEB specializzati nella vendita di softwares scientifici (e.g., <https://www.sisweb.com/software.htm>, SIS, Scientific Instruments Services,).

Del resto, i moderni sistemi GC/MS hanno di default, fra le loro risorse software, anche una collezione di spettri di massa EI a 70 eV o una libreria di spettri di massa EI è fra le opzioni disponibili al momento dell'acquisto.

Nel Box 8.1 (del Capitolo 8) sono stati raccolti un certo numero di indirizzi WEB per accedere a risorse *on line* o eseguire il download di applicazioni a cui si fa riferimento nel testo.

Il Box 8.1 contiene anche un numero limitato di riferimenti a libri classici, principalmente orientati all'interpretazione degli spettri di massa EI, e ad articoli *open source* che possono servire sia per espandere vari argomenti oltre i limiti di questo testo sia per ottenere ulteriori riferimenti.

Gli autori
M. M. Salvatore
F. Filippelli
F. Salvatore

Maria Michela Salvatore

Francesco Filippelli

Francesco Salvatore

Acquisizione e Interpretazione degli spettri di massa EI

Funzione e output dello spettrometro di massa

Uno spettrometro di massa è uno strumento complesso, che è il prodotto di una tecnologia avanzata, progettato per eseguire predeterminate funzioni e per produrre un output da cui sia possibile estrarre informazioni di carattere chimico concernenti una sostanza o un campione che viene presentato allo strumento.

In questo capitolo introduttivo viene presentata la logica alla base delle funzioni di uno spettrometro di massa e le caratteristiche del suo output. I dettagli dell'hardware, che rende possibile l'esecuzione delle funzioni a cui uno spettrometro di massa è deputato, sono esposti nei successivi capitoli.

Si può cominciare notando che, nella *spettrometria di massa*, la massa ha un ruolo centrale ma, ovviamente, uno spettrometro di massa non è una bilancia, sebbene anche per una bilancia la massa abbia un ruolo fondamentale.

La differenza fra una bilancia e uno spettrometro di massa è incorporata nel termine *spettrometria*.

Per una bilancia, la massa è semplicemente un attributo di una sostanza o di un oggetto che viene misurato producendo un numero che costituisce il risultato della misura.

Per contro, per uno spettrometro di massa, la massa è una variabile indipendente che viene modificata in maniera controllata nel corso dell'esperimento e in corrispondenza di ciascun valore della variabile massa viene misurato un segnale da un rivelatore.

In sostanza, per uno spettrometro di massa, la massa ha lo stesso significato della lunghezza d'onda per uno spettrometro UV/Vis, e ciò giustifica il termine *spettrometria* usato per questa tecnica strumentale.

Uno spettrometro di massa è, da un punto di vista logico, costituito da tre componenti fondamentali che sono chiamati, *sorgente di ioni*, *analizzatore di massa* e *rivelatore* e ciascuno dei quali svolge una specifica funzione.

La funzione della sorgente di ioni è di convertire le molecole neutre, M, di una sostanza presentata allo spettrometro di massa in una popolazione di ioni da essa derivati attraverso un processo che è chiamato *frammentazione*.

Il tipo di ioni, che vengono prodotti nella sorgente di ioni dalla frammentazione di una molecola, dipende, ovviamente, dal tipo di sostanza che è presentata allo spettrometro di massa e dal principio chimico e/o fisico impiegato dalla sorgente di ioni per eseguire la sua funzione.

Sebbene esistano una varietà di sorgenti di ioni, che operano sulla base di principi diversi, la sorgente di ioni considerata in questo testo è la sorgente di ioni a *Ionizzazione Elettronica* o *Sorgente EI (Electronic Ionization)*.

La Sorgente EI opera sulla base di un principio fisico molto semplice che consiste nel bombardare le molecole, M, che accedono alla sorgente di ioni allo stato gassoso, con un fascio di elettroni di alta energia (tipicamente 15 - 100 eV) che provengono da un elettrodo metallico.

La caratteristica fondamentale, che rende la Sorgente EI così utile e popolare, è che essa è in grado di frammentare qualunque molecola, di massa inferiore a circa 1000 u, producendo una ricca popolazione di ioni. Inoltre, il grado di frammentazione della molecola si può facilmente attenuare o accentuare modificando l'energia del fascio di elettroni ionizzanti. Per ragioni che verranno via via spiegate, una Sorgente EI viene di solito operata con elettroni di energia di 70 eV.

Per queste sue caratteristiche la Sorgente EI è considerata una sorgente di ioni *hard* e ciò la distingue dalle sorgenti di ioni cosiddette *soft*, che producono una frammentazione molto ridotta delle molecole. Fra le sorgenti di ioni *soft* la più diffusa è la sorgente ESI (*Electrospray Ionization*).

Cionondimeno, in generale, solo una piccola frazione delle molecole che, allo stato gassoso, accedono alla sorgente di ioni è frammentata, e convertita in un assortimento di ioni, ciascuno di definita composizione e carica elettrica, che sono raccolti in un fascio e presentati all'*analizzatore di massa*.

Ciascuno ione, nel fascio che perviene all'analizzatore di massa, ha un preciso valore del rapporto massa/carica che è indicato con m/z (in cui m rappresenta il valore numerico della massa dello ione espressa in unità di massa atomica, u, e z è un numero intero che rappresenta il numero di cariche elettriche elementari recate dallo ione).

Pertanto, in spettrometria di massa, il rapporto m/z è, per definizione, un numero adimensionale definito come il rapporto fra il numero che rappresenta la massa di uno ione e il numero delle sue cariche elementari.

Il rapporto *massa/carica* ha un ruolo chiave per la spettrometria di massa poiché, a dispetto del suo nome, un analizzatore di massa distingue gli ioni di un fascio non esclusivamente sulla base della loro massa ma del loro rapporto m/z ed è assolutamente cieco alle specie neutre.

Nella Sorgente EI, gli ioni prodotti, salvo rare eccezioni, sono cationi monopositivi (i.e., $z = +1$) cosicché il rapporto m/z è numericamente uguale alla massa dello ione, e ciò spiega sia perché la tecnica è chiamata *spettrometria di massa*, sia perché correntemente noi parliamo di *analizzatori di massa* piuttosto che di *analizzatori di m/z* .

Nella logica delle funzioni di uno spettrometro di massa, il compito dell'analizzatore di massa è analogo a quello di una colonna cromatografica in un cromatografo, nel senso che l'analizzatore di massa deve separare l'assortimento di ioni, che provengono dalla sorgente di ioni, negli ioni componenti sulla base del loro valore di m/z .

Dopo la separazione, gli ioni sono diretti verso un rivelatore che procede al conteggio degli ioni, di ciascun tipo, separati dall'analizzatore di massa e, in output, produce, per ciascun tipo di ioni, un numero che è chiamato *abbondanza* e che si può pensare sia il numero di ioni di un dato tipo che sono pervenuti al rivelatore. La Figura 1.1 è un diagramma che presenta concettualmente le funzioni dei tre blocchi di uno spettrometro di massa equipaggiato con una Sorgente EI.

Da ciò si deve capire che fondamentalmente l'output standard di uno spettrometro di massa è molto semplice. Esso è costituito da una tabella a due colonne, in ogni riga della quale sono elencati rispettivamente un valore di m/z e il corrispondente valore dell'abbondanza misurata (vedi Figura 1.1).

Come si dirà più avanti, lo *spettro di massa* è una rappresentazione grafica della tabella (m/z , *abbondanza*) che è il prodotto primordiale di qualunque spettrometro di massa.

Un punto chiave è di definire esattamente che cosa si intende quando si dice che l'analizzatore di massa separa un fascio assortito di ioni in base al valore di m/z .

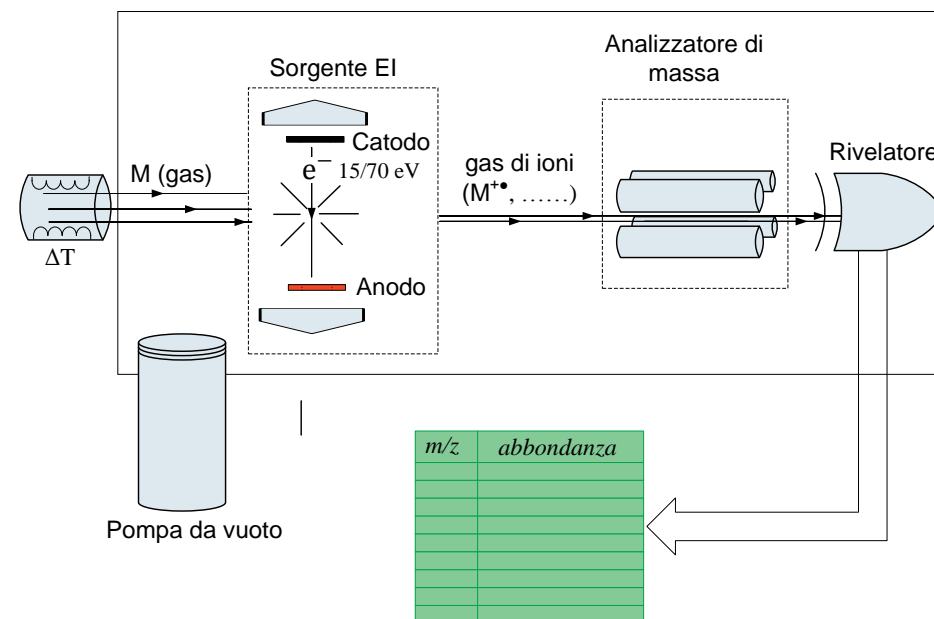


Figura 1.1 Schema concettuale dei tre blocchi di uno spettrometro di massa.

Qualitativamente, ciò significa che un analizzatore di massa considera diversi due ioni, se essi hanno diversi valori del rapporto m/z o, assunto che z sia uguale a +1, se essi hanno diversi valori della massa.

Tuttavia, dietro questa apparentemente semplice spiegazione si cela una notevole complessità.

Da un punto di vista logico, occorre comprendere che un chimico che acquisisce uno spettro di massa di una particolare sostanza, M, non è strettamente interessato, in sé e per sé, a conoscere i valori di m/z degli ioni del fascio prodotto nella sorgente di ioni dalla molecola, M.

Piuttosto, l'informazione importante per il chimico è la composizione chimica degli ioni presenti nel fascio e il numero di ioni di ciascuna composizione.

Pertanto, nella pratica, l'informazione richiesta dal chimico non necessariamente coincide con la tabella (m/z , *abbondanza*) che è l'output dello spettrometro di massa.

Per comprendere la differenza che può nella pratica esistere fra l'informazione richiesta da un chimico e l'informazione fornita da uno spettrometro di massa, considera che gli ioni che pervengono all'analizzatore di massa sono composti da un numero intero di atomi, ciascuno dei quali ha una propria massa, e che in natura vi è un numero limitato di atomi di masse diverse.

Da ciò si può facilmente dedurre che la massa di uno ione non può assumere tutti i possibili valori reali positivi ma solo valori che corrispondono alla combinazione di un numero intero di atomi di ciascuno dei tipi presenti in natura.

In questo contesto, un dato di fondamentale interesse sarebbe di calcolare tutti i valori discreti che la massa di uno ione può assumere e riunirli in una lista.

Infatti, da questa lista di valori discreti della massa degli ioni, noi potremmo valutare quale deve essere la capacità di discriminazione (rispetto a m/z) di un analizzatore di massa che consenta al chimico di desumere, dalla tabella (m/z , *abbondanza*), esposta dallo spettrometro di massa, l'informazione di suo interesse (che è essenzialmente di stabilire la composizione chimica degli ioni corrispondenti a ciascuna delle abbondanze misurate). Infatti, affinché ciò sia possibile, la capacità di discriminazione rispetto a m/z dell'analizzatore di massa deve essere sufficientemente alta cosicché la separazione in base ai valori di m/z (eseguita da un analizzatore di massa) sia anche una separazione degli ioni in base alla loro composizione.

Tabella 1.1 Masse atomiche esatte degli undici elementi più comuni della chimica organica e abbondanze relative degli isotopi naturali.

#	Simbolo Atomico	Numero Atomico	Numero di Massa	Abbondanza naturale	Massa, [u]
1	C	6	12	100	12.000000
			13	1.08	13.003355
2	H	1	1	100	1.007825
			2	0.0115	2.014101
3	O	8	16	100	15.994915
			17	0.038	16.999132
			18	0.205	17.999116
4	N	7	14	100	14.003070
			15	0.369	15.000109
5	S	16	32	100	31.972071
			33	0.80	32.971459
			34	4.52	33.967867
			36	0.02	35.967081
6	P	15	31	100	30.973762
7	Si	14	28	100	27.976927
			29	5.0778	28.976495
			30	3.3473	29.973770
8	F	9	19	100	18.998403
9	Cl	17	35	100	34.968853
			37	31.96	36.965903
10	Br	35	79	100	78.918338
			81	97.28	80.916291
			11	100	11.009306
11	I	53	127	100	126.904468

Per trasferire nella pratica il significato e le implicazioni del precedente ragionamento, è utile limitare l'attenzione a soli undici dei 90, e oltre, tipi di atomi che esistono in natura. Questi undici elementi sono quelli che comunemente costituiscono le molecole organiche e cioè: (C, H, O, N, S, P, Si, F, Cl, Br, I).

Per il momento, noi supporremo che ciascuno di questi atomi sia presente in natura sotto forma di un singolo isotopo, cioè: (^{12}C , ^1H , ^{16}O , ^{14}N , ^{32}S , ^{31}P , ^{28}Si , ^{19}F , ^{35}Cl , ^{79}Br , ^{127}I). Gli isotopi degli elementi hanno un ruolo importante nella spettrometria di massa, su cui ritorneremo più avanti.

La domanda, a cui si vuole rispondere, è la seguente: supponendo che uno ione organico possa contenere una qualunque combinazione degli undici nuclidi (^{12}C , ^1H , ^{16}O , ^{14}N , ^{32}S , ^{31}P , ^{28}Si , ^{19}F , ^{35}Cl , ^{79}Br , ^{127}I), quali sono i valori discreti della massa che gli ioni organici possono assumere?

In primis, per affrontare questo problema noi abbiamo bisogno di conoscere la massa degli undici nuclidi (^{12}C , ^1H , ^{16}O , ^{14}N , ^{32}S , ^{31}P , ^{28}Si , ^{19}F , ^{35}Cl , ^{79}Br , ^{127}I) che sono esposte, insieme ad altri dati pertinenti, nella Tabella 1.1.

Non dovrebbe sfuggire che, come rappresentativo di elementi che esistono in natura sotto forma di più isotopi, è stato scelto l'isotopo più abbondante. Infatti, come si vedrà più avanti, l'isotopo più abbondante di un elemento ha uno speciale significato per la spettrometria di massa. Dalla Tabella 1.1, si potrà notare che, per gli elementi che possono esistere sotto forma di più isotopi, invariabilmente l'isotopo più leggero è anche quello più abbondante.

Questo è un caso molto fortunato che evita molte complicazioni e su cui ritorneremo in seguito.

A parte ciò, anche una superficiale riflessione mostrerà che la lista di numeri reali a cui siamo interessati è in effetti molto lunga, specialmente se non si pone alcun limite al numero di atomi che possono essere presenti in uno ione o alla sua massa.

Un approccio migliore, per avere un'idea di quale sia la differenza fra numeri della massa consecutivi che uno ione organico può assumere, è quello di capovolgere la questione. E cioè, di fissare un intervallo di valori della massa e di esaminare quanti sono i valori possibili nell'intervallo fissato.

Per esempio, si può scegliere una massa intera, X , ed esaminare quanti valori della massa sono possibili nell'intervallo $X \pm 0.5$.

Si può anche introdurre un poco di conoscenza chimica nel problema, limitando il numero massimo di atomi di ciascun tipo che può essere presente in uno ione.

Per esempio, è improbabile che si incontrino molecole organiche o ioni organici con più di 50 atomi di carbonio o più di 100 atomi di idrogeno o più di 5-10 atomi degli altri comuni elementi della chimica organica.

Ciò è senza dubbio vero, se si conviene di escludere dalla presente discussione le macromolecole, come i polimeri naturali e sintetici che non rientrano nella presente trattazione poiché, tra l'altro, non possono essere ionizzati nella Sorgente EI e costituiscono un tema separato della spettrometria di massa.

Quindi, in astratto, si può assumere, senza perdita di generalità, che alla sorgente di ioni pervenga una molecola $M^* = \text{C}_{50}\text{H}_{100}\text{N}_{10}\text{O}_{10}\text{P}_5\text{Si}_5\text{S}_5\text{F}_{10}\text{Cl}_{10}\text{Br}_{10}\text{I}_5$ cosicché gli ioni formati da questa ipotetica molecola siano costituiti da un qualunque sottoinsieme dei 220 atomi da cui è composta.

Qualunque molecola organica, M , e qualunque ione organico reale conterrà certamente un numero di atomi inferiore a quello della molecola M^* e avrà una massa che coincide con uno dei frammenti da essa derivati.

È evidente che il valore più basso che può avere la massa di uno ione derivato da M^* è 1.0078 u e coincide con la massa dell'atomo di idrogeno.

Del resto, lo ione più pesante che si può formare da M^* è uno ione monopositivo ottenuto sottraendo alla molecola un singolo elettrone.

Si può anticipare che lo ione di massa più elevata che si può formare da una molecola, M , è chiamato *ione molecolare* e indicato con il simbolo speciale $M^{+\bullet}$, in cui il bullet posto all'apice indica un elettrone in meno.

Pertanto, lo ione molecolare della nostra ipotetica molecola M^* sarebbe $\text{C}_{50}\text{H}_{100}\text{N}_{10}\text{O}_{10}\text{P}_5\text{Si}_5\text{S}_5\text{F}_{10}\text{Cl}_{10}\text{Br}_{10}\text{I}_5^{+\bullet}$ e la sua massa 3418.7550 u (intendendo, come detto sopra, che ciascun elemento sia presente sotto forma del nuclide naturalmente più abbondante).

Nessuno ione, creato dalla molecola $\text{C}_{50}\text{H}_{100}\text{N}_{10}\text{O}_{10}\text{P}_5\text{Si}_5\text{S}_5\text{F}_{10}\text{Cl}_{10}\text{Br}_{10}\text{I}_5$, può avere massa superiore a 3418.7550 u né può contenere un numero di atomi di ciascun tipo superiore a quello contenuto nella molecola o nel suo ione molecolare.

In altre parole, sotto le restrizioni poste, il fascio di ioni che lascia la sorgente di ioni contiene ioni la cui massa è un numero reale compreso nell'intervallo [1.0078 u, 3418.7550 u]. Tuttavia, data la natura discreta della materia, solo un

Per esempio, la Tabella 1.2 è un estratto della *Tabella delle masse degli ioni organici* che espone complessivamente 36 ioni che hanno masse nell'immediato intorno di 144 u (144.000 ± 0.0015 u) e che sono un sottoinsieme dei 1080 ioni nell'intervallo 144 ± 0.5 u.

Pertanto, si può assumere che la *Tabella delle masse degli ioni organici* sia stata calcolata e sia allocata nella memoria di un computer.

Se si prende come riferimento $X = 144$, dalla *Tabella delle masse degli ioni organici* noi vediamo che i valori che la massa che uno ione può assumere, nell'intervallo $X = 144 \pm 0.5$, sono compresi fra la massa dello ione C_9H_{36} (144.2817 u) e la massa di un ipotetico ione SSi_4 (143.87923 u).

Da ciò si può notare, in un caso particolare ma estensibile a tutti i valori di X , che le masse degli ioni sono comprese a ogni valore di X in uno stretto intervallo intorno a X , mantenendosi piuttosto distanti dai valori estremi dell'intervallo, i.e., $X + 0.5$ e $X - 0.5$.

Le conseguenze di questi fatti per la spettrometria di massa sono molteplici.

In primis, la massa di uno ione organico non si allontana mai più di circa 0.3 frazioni di una massa atomica da un intero. Non ci sono mai ioni a massa $X + 0.5$ o $X - 0.5$, ma solo ioni in un intervallo ± 0.3 intorno a X .

Quindi, la massa di uno ione, compreso la massa dello ione molecolare e degli ioni monoatomici, si può sempre approssimare senza ambiguità alla massa intera più vicina.

La massa approssimata di uno ione (o molecola o atomo), ottenuta approssimando la sua massa esatta alla più vicina massa intera, è, appunto, chiamata *massa intera* dello ione (o della molecola o dell'atomo).

A parte ciò, se nell'intervallo fra 144.2817 u e 143.87923 u vi sono 1080 possibili ioni e valori della massa, affinché l'analizzatore di massa sia in grado di separare ioni di diversa composizione, di massa intera 144, deve essere in grado di distinguere valori di m/z che differiscono in media di $\Delta(m/z) = (144.2817 - 143.87923)/1080 \approx 0.0005$.

Per coincidenza, il valore $\Delta(m/z) = 0.0005$ valutato sopra è molto prossimo al valore numerico della massa dell'elettrone, m_e , che è esattamente 0.000548 u.

Quindi, estrapolando il precedente risultato, noi possiamo dire che un analizzatore di massa, che fosse in grado di distinguere ioni i cui valori di m/z differiscono

almeno per il valore numerico corrispondente alla massa dell'elettrone, distinguerebbe gli ioni anche in base alla composizione.

In altre parole, se all'abbondanza misurata dal rivelatore di uno spettrometro di massa fosse possibile associare un valore di m/z la cui incertezza non eccede il valore numerico della massa dell'elettrone, sarebbe possibile anche convertire il valore di m/z in una formula chimica e associare a ciascuna abbondanza misurata la specifica composizione dello ione a cui si riferisce.

A tal fine, sarebbe sufficiente estrarre dalla *Tabella delle masse degli ioni organici* la composizione dello ione con la massa più prossima a un dato valore di m/z .

Questo è esattamente il tipo d'informazione che il chimico cerca di ottenere dallo spettrometro di massa.

Le conseguenze di questo stato di cose per la spettrometria di massa sono di vasta portata e sono esposte nei successivi paragrafi.

1.1 Risoluzione e output dello spettrometro di massa

La differenza minima, $\Delta(m/z)$, fra i valori di m/z di due ioni, che un analizzatore di massa è in grado di distinguere, è chiamata *risoluzione*.

Per esempio, un astratto analizzatore di massa che fosse in grado di distinguere valori di m/z che differiscono per il valore numerico della massa dell'elettrone, avrebbe una risoluzione $\Delta(m/z) = 0.0005$.

Per contro, il *potere risolutivo* di un analizzatore di massa è un attributo che è inversamente proporzionale alla risoluzione. Pertanto un analizzatore di massa di alto potere risolutivo ha, in effetti, valori relativamente bassi della risoluzione, e viceversa.

Gli analizzatori di massa possono avere risoluzione largamente variabile. Inoltre, per alcuni analizzatori la risoluzione può essere indipendente dalla massa e altri possono mostrare un aumento della risoluzione (i.e., del valore di $\Delta(m/z)$) con l'aumentare della massa.

Per esempio, un analizzatore potrebbe avere $\Delta(m/z) = 0.0005$ per ioni che hanno m/z intorno a 144, ma $\Delta(m/z) = 0.005$ per ioni di m/z prossimo a 650.

Ciò significa che l'analizzatore considera diversi ioni che hanno m/z intorno a 144, se essi differiscono per non meno di 0.0005 nel valore di m/z ; ma, se m/z