

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO

CL in BIOTECNOLOGIE

Anno Accademico 2022/2023

CHIMICA ANALITICA

Spettrometria di Massa

SPETTROMETRIA DI MASSA

La spettrometria di massa è una tecnica analitica in grado di ionizzare atomi e/o molecole e quindi di separarli e rivelarli come ioni gassosi in base al rapporto massa/carica (m/z). Il suo impiego consente di identificare composti incogniti (organici, inorganici e biomolecole), di ottenere informazioni strutturali e, mediante l'accoppiamento con altre tecniche analitiche quali la gascromatografia e la cromatografia liquida, di effettuare un'analisi quantitativa di analiti in miscele complesse.

LA SPETTROMETRIA DI MASSA

Le più comuni tecniche spettroscopiche si basano sull'assorbimento da parte di una molecola di una radiazione elettromagnetica la cui energia sia in grado di indurre variazioni delle energie elettroniche (UV), delle energie vibrazionali (IR) o di orientazione di spin nucleare (NMR).

La spettrometria di massa si basa invece sulla ionizzazione di una molecola per assorbimento di energia (elettrica, termica, meccanica ed elettromagnetica).

I metodi di ionizzazione nella spettrometria di massa si possono distinguere in due categorie:

- tecniche in fase gassosa (per specie volatili)
- tecniche in fase condensata (per specie con scarsa volatilità).

TECNICHE IN FASE GASSOSA

Le tecniche in fase gassosa vengono utilizzate per produrre ioni nel vuoto da specie che sono naturalmente in fase gassosa o che possono essere vaporizzate senza decomposizione

Il campione viene prima vaporizzato e quindi introdotto in sorgente dove è ionizzato o mediante processi unimolecolari:

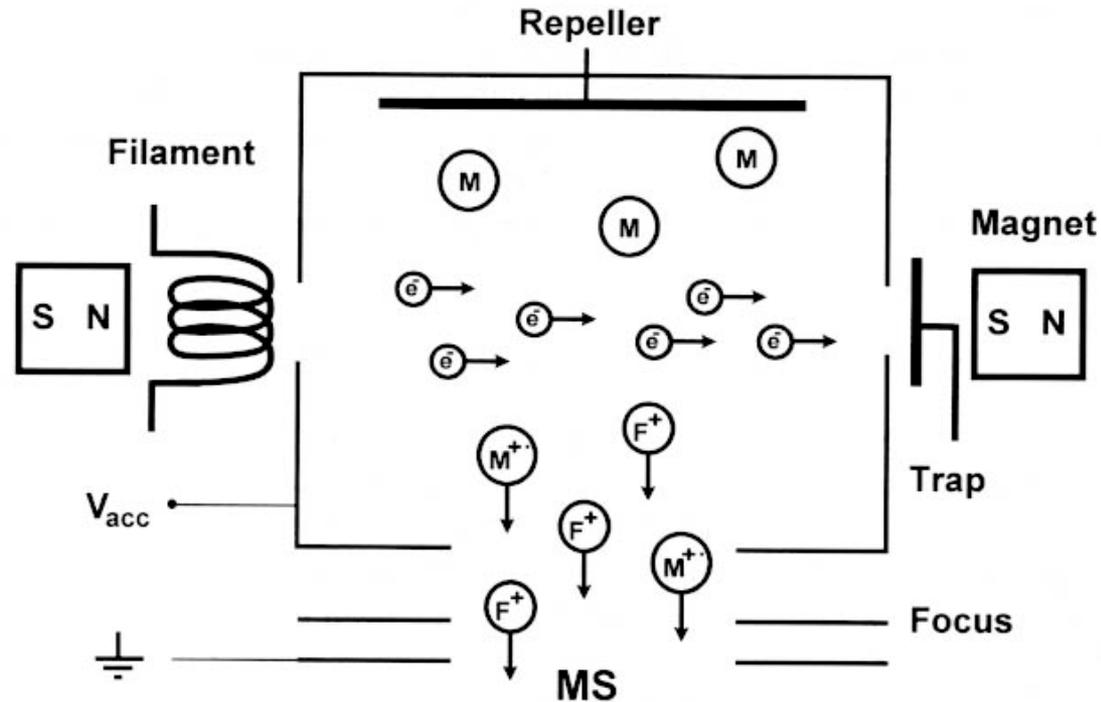
- **impatto elettronico (EI)** l'energia per la ionizzazione è fornita da un fascio di elettroni

o mediante processi bimolecolari:

- **ionizzazione chimica (CI)** si sfrutta la collisione con ioni di altre specie

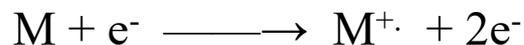
Tra queste tecniche l'impatto elettronico e la ionizzazione chimica sono le più utilizzate in accoppiamento con la gas-cromatografia (GC-MS), la EI in particolare è quella più ampiamente diffusa.

Impatto elettronico (EI)



L'energia del fascio elettronico e' tenuta per convenzione a 70eV.

Il fenomeno piu' immediato che avviene e' la rimozione di un elettrone dalla molecola ad opera del fascio di elettroni, generando cosi' un catione radicale detto **ione molecolare**.



Ionizzazione chimica

L'impatto elettronico è una tecnica di ionizzazione “hard” che spesso determina la completa frammentazione dello ione molecolare.

Il caso ideale per uno spettrometrista è quello di ottenere uno spettro di massa in cui oltre allo ione molecolare, da cui si deduce facilmente il peso molecolare dell'analita in esame, siano presenti un numero limitato di frammenti che forniscano informazioni strutturali.

In tal senso, ben si presta la ionizzazione chimica, tecnica “soft” risultato di interazioni chimiche ione-molecola coinvolgenti piccole quantità di campione ed una grandissima quantità di gas reagente.

Nella sorgente CI, il vapore del composto in esame è miscelato con un grande eccesso (tipicamente 1000 volte più grande) di un gas reagente ad una pressione di circa 1 torr.

La CI (positiva o negativa) è un processo che si articola in due stadi:

1. Il gas reagente è ionizzato per impatto elettronico da un fascio di elettroni che inizialmente possono avere energie da 50 fino a 500 Ev, rapidamente attenuati per collisione con le molecole del gas reagente per produrre un plasma stabilizzato di ioni secondari.
2. Nel secondo stadio la ionizzazione chimica delle molecole neutre del campione si può realizzare sulla base di un'ampia varietà di reazioni con gli ioni primari e secondari del plasma. Tra questi i più importanti sono il trasferimento di carica, la cattura elettronica e le reazioni acido-base.

- Il ***trasferimento di carica*** con ioni positivi prende luogo tra uno ione reagente ed una molecola del campione con un più basso potenziale di ionizzazione

- La ***cattura elettronica*** è probabile nel caso di molecole con alta affinità elettronica, quindi dotate di sostituenti elettronattrattori, producendo ioni frammento negativi.

- Le ***reazioni acido-base*** in fase gas sono senz'altro le più importanti.

In modalità *positiva* gli ioni reagenti sono acidi: CH_5^+ (molto forte), H_3O^+ , CH_3OH_2^+ e CH_3CNH^+ (medi) NH_4^+ (debole).

In modalità *negativa* gli ioni reagenti sono basi: lo ione OH^- ; CH_3O^- e CH_2CN^- ; CH_3COO^- e Cl^-

TECNICHE IN FASE CONDENSATA

Le tecniche in fase condensata sono utilizzate per specie non volatili e termicamente labili. Includono tecniche di ionizzazioni “soft” che si basano sulla produzione di ioni direttamente dal campione in fase condensata all’interno della sorgente. Si distinguono a loro volta in due categorie:

“Energy sudden methods” e “Field desorption methods “

Energy sudden methods: derivano dalla teoria della velocità per decomposizioni unimolecolari, sulla base della quale se un processo di riscaldamento è sufficientemente rapido una molecola vaporizza prima di decomporre.

1. Laser Desorption (LD),

Si basa sull’acquisizione quasi istantanea di un’elevata densità energetica in un campione disperso su o in una superficie solida o liquida.

Field Desorption Methods: questi metodi, piuttosto differenti nella pratica e nei principi dai precedenti metodi di ionizzazione, usano dei forti campi elettrici per estrarre ioni da un substrato.

desorbimento in un gas o vapore.(produzione di ioni a partire da una soluzione liquida)

- *ElectroSpray* (ES)
- *IonSpray* (IS)

Sono tecniche innovative, recenti ed oggi ampiamente utilizzate

ACCOPPIAMENTO CROMATOGRAFIA LIQUIDA- SPETTROMETRIA DI MASSA (LC-MS)

incompatibilità tra la cromatografia liquida e la spettrometria di massa

LC

- funzionamento in fase liquida
- funzionamento a 25-50°C
- praticamente nessuna limitazione per i composti analizzabili
- praticamente nessuna limitazione di peso molecolare
- poco costosa
- utilizza tamponi inorganici
- il flusso di 1ml/min di liquido può fornire da 150 a 1200 ml/min di gas, in dipendenza del solvente utilizzato

MS

- funzionamento in fase gassosa
- funzionamento a 100-350°C
- necessità di campioni con una certa volatilità
- ci sono limitazioni per il peso molecolare
- piuttosto costosa
- problemi con i tamponi inorganici
- accetta flussi di gas fino a 20ml/min al max

Interfacce Atmospheric Pressure Ionization (API): ElectroSpray (ES), IonSpray (IS), Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI).

L'attuale tecnologia API comprende essenzialmente due differenti interfacce per la LC-MS:

- ionizzazione electrospray (ESI)
- ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI).

Nel 1917 Zeleny produsse una nebbia di goccioline cariche, esponendo un liquido ad un alto campo elettrico, ma soltanto alla fine degli anni '80 la tecnologia API cominciò ad essere commercializzata dalle principali case produttrici. L'interfaccia ESI ha avuto una verticalizzazione nell'uso solo a partire dal 1992.

La ionizzazione a pressione atmosferica si articola su tre steps fondamentali:

- nebulizzazione di una soluzione
- produzione di ioni in fase gassosa
- trasporto degli ioni dalla regione a pressione atmosferica della sorgente di ionizzazione fino nella regione sottovuoto dello spettrometro di massa.

1) Nebulizzazione dell'effluente HPLC

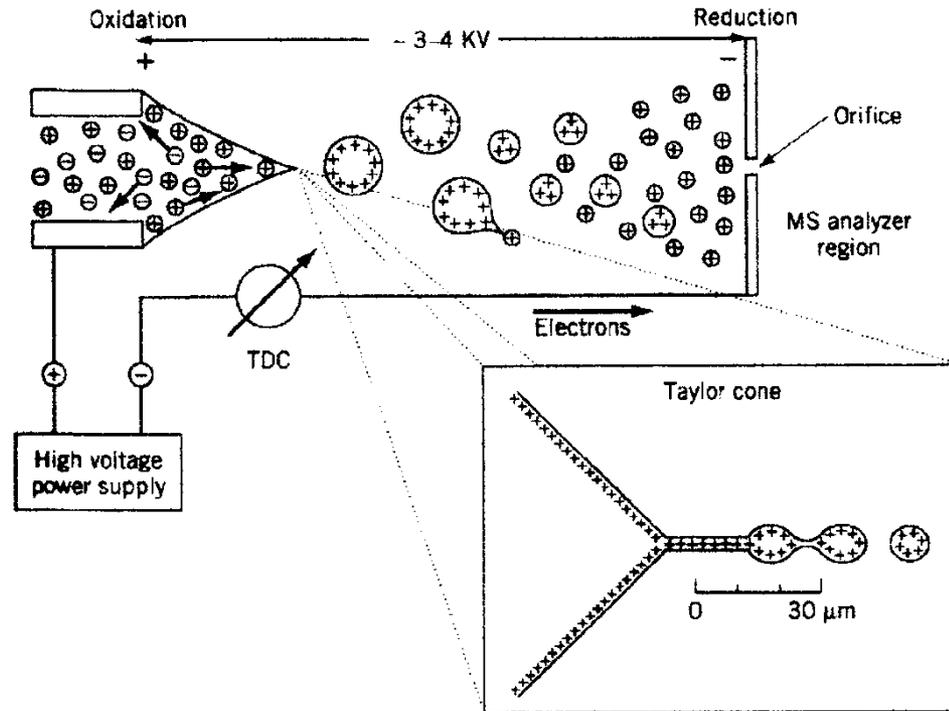
L'effluente HPLC, passando attraverso un capillare, subisce un'espansione supersonica ed un concomitante raffreddamento adiabatico, venendo nebulizzato in prossimità dell'orifizio.

2) Produzione di ioni in fase gassosa

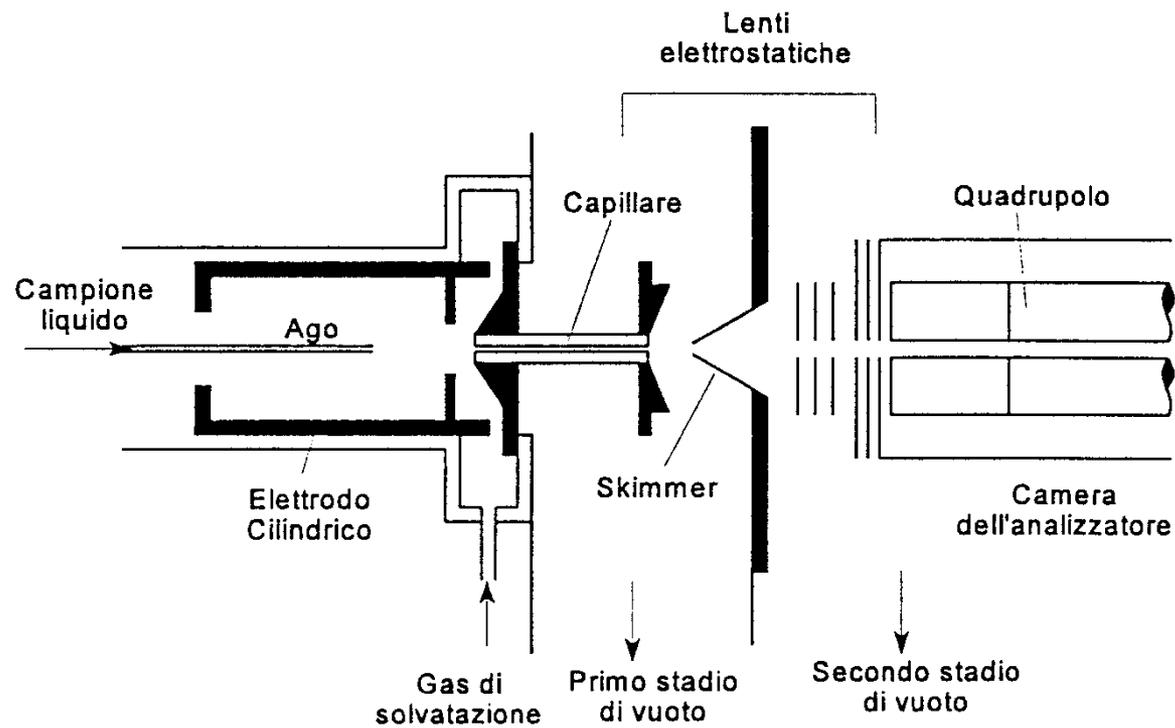
Nella ESI la nebulizzazione ed il caricamento delle gocce sono due eventi concomitanti.

L'alto voltaggio applicato alla punta del capillare nella ESI ha lo scopo sia di generare che di caricare le gocce

Una parziale separazione di carica avviene all'interno del capillare, ove, in positive ion mode, gli ioni positivi P^+ vengono respinti ed addensati sul fronte del liquido, che assume una tipica forma conica chiamata "cono di Taylor" da cui si staccano gocce micrometriche arricchite di cariche positive.

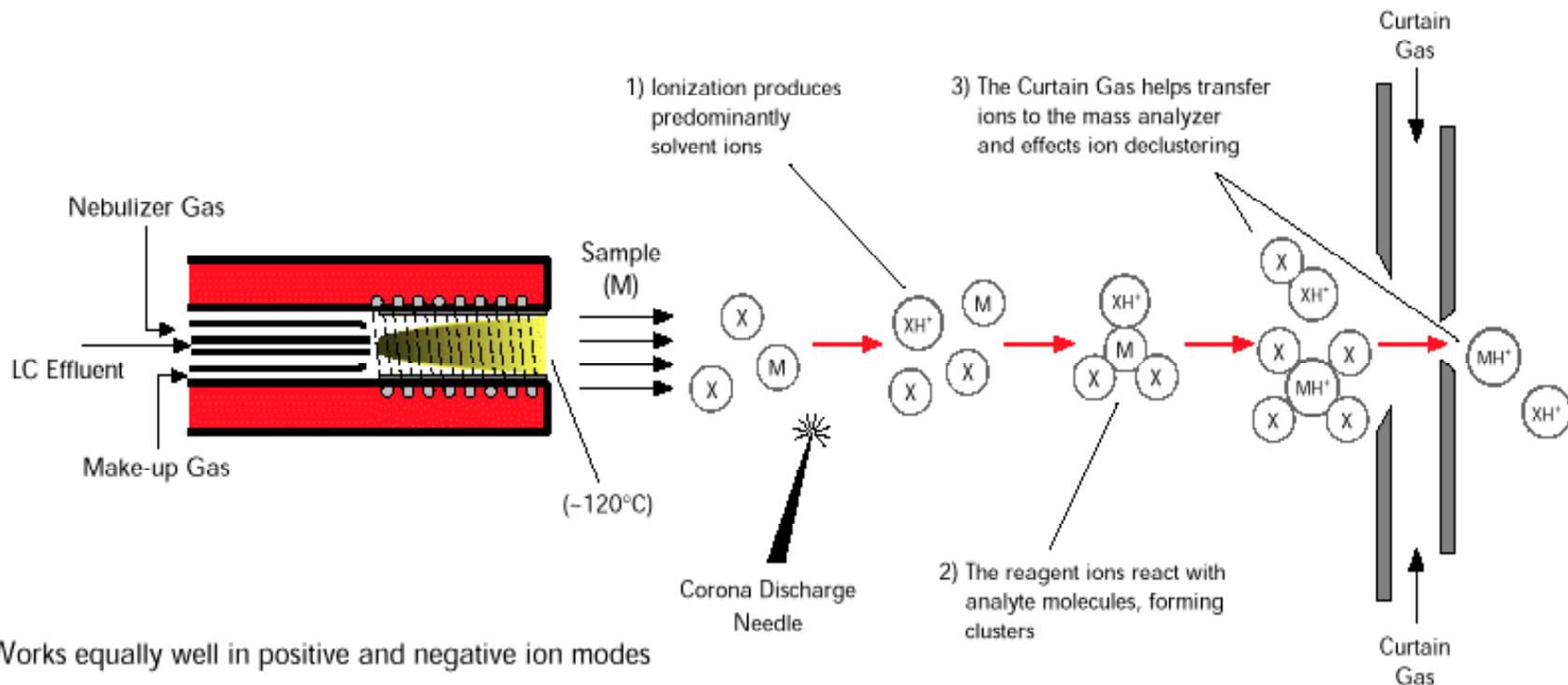


Le gocce cariche generate viaggiano nella sorgente attraverso un gas denso in controcorrente (curtain gas) attratte dal controelettrodo planare e subiscono una progressiva diminuzione delle loro dimensioni a causa dell'evaporazione del solvente, mentre sono contemporaneamente soggette a forze di taglio del flusso gassoso => esplosione coulombiana => microgocce ($r \sim 0.5-1.5 \mu\text{m}$) => gocce figlie ($r \sim 0.1 \mu\text{m}$) con più elevata densità superficiale di carica; sia le gocce prodotte sia la goccia d'origine continueranno ad evaporare ed esplodere fino a raggiungere un raggio di circa 10 nm (limite di Rayleigh di Ion Evaporation) => emissione diretta di ioni in fase gassosa



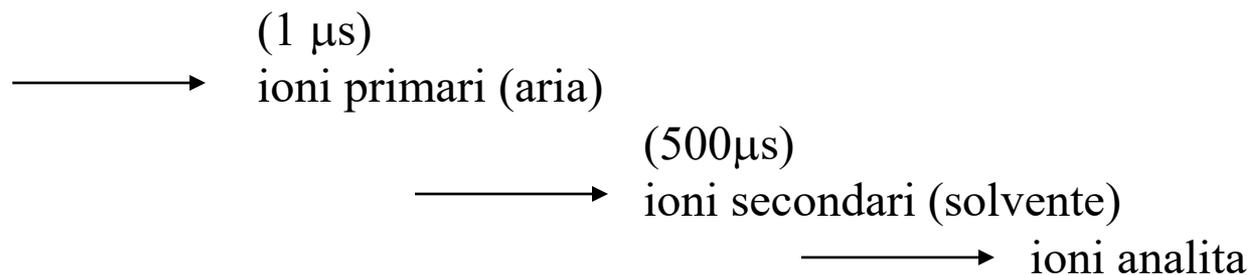
ESI

APCI



†Atmospheric Pressure Chemical Ionization
 X = solvent molecules, e.g. H₂O, NH₃, etc.

elettroni della scarica a corona



L'interfaccia APCI è una combinazione tra un nebulizzatore pneumatico concentrico ed un tubo caldo di desolvatazione (da cui “Heated pneumatic nebulizer”, altro nome con cui questa interfaccia è nota)

Le gocce sono formate prima della ionizzazione.

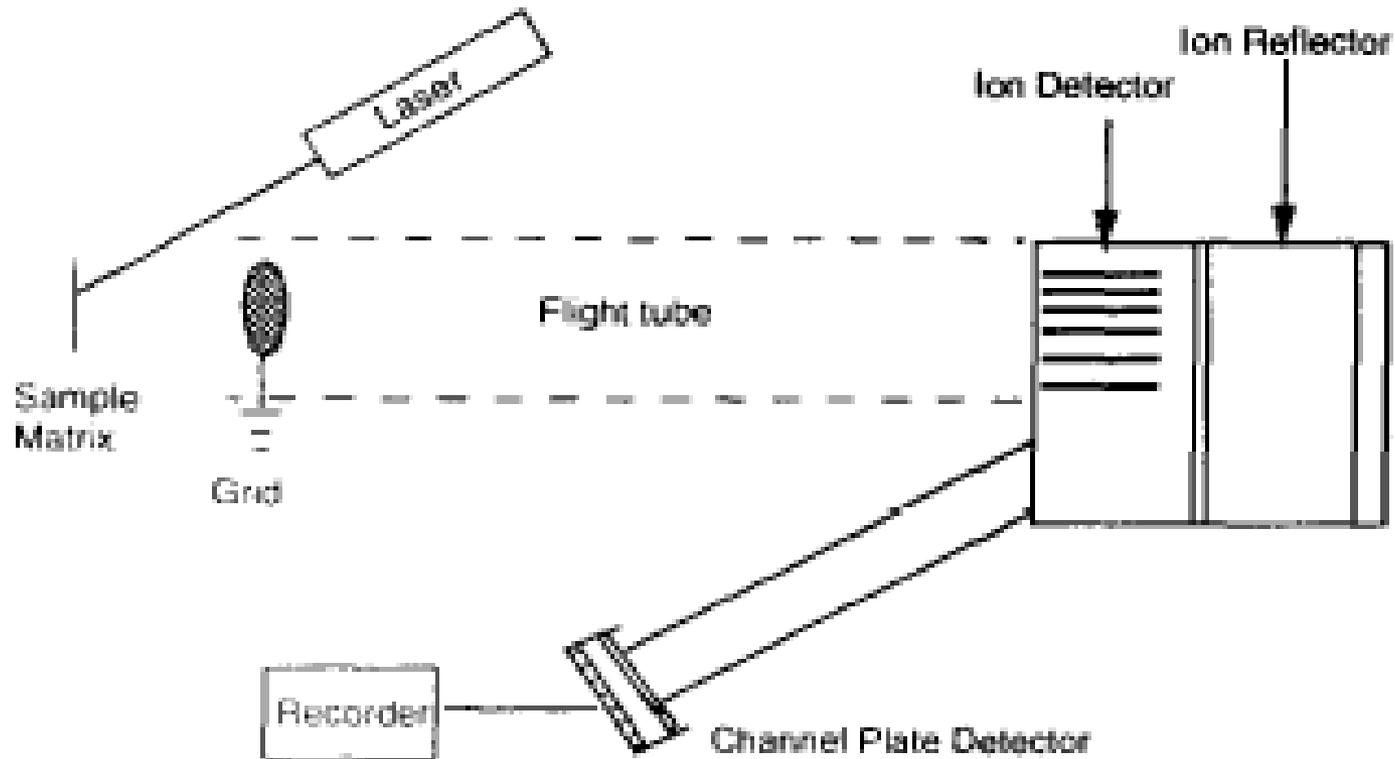
La desolvatazione dell'aerosol è completata all'interno del tubo caldo se la temperatura è sufficientemente alta.

Il gas di “make up” assiste il trasporto del campione nella regione della scarica a corona, generata da un ago settato ad un voltaggio (3-6kV).

La ionizzazione dell'analita in fase gassosa è indotta da processi analoghi a quelli osservati nelle sorgenti a ionizzazione chimica:
gli elettroni della scarica a corona ionizzano per impatto elettronico le molecole del gas di nebulizzazione e “make up” dando **ioni primari** che, mediante processi bimolecolari, ionizzano a loro volta le **molecole del solvente** dando ioni secondari che ionizzano le **molecole dell'analita**.

Sorgente MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization).

Messa a punto nel 1985 da Karas, Bachmann e Hillekamp



Laser più utilizzati: laser che emettono nel lontano IR e nel lontano UV con ampiezze d'impulso tra 1 e 100 ns per ridurre la decomposizione termica.

GLI ANALIZZATORI

Negli spettrometri di massa la funzione degli analizzatori è quella di separare gli ioni in base al rapporto carica/massa.

Sulla base della dipendenza dal tempo di uno o più parametri del sistema analizzatore sono stati suddivisi in due gruppi:

1. analizzatori statici:

- *settori magnetici* a semplice o doppia focalizzazione; (originariamente i campi elettrici e magnetici venivano mantenuti costanti rispetto al tempo). Sono noti anche come analizzatori di quantità di moto.

2. analizzatori dinamici: a loro volta possono essere suddivisi in diversi sottogruppi:

- analizzatori a stabilità di percorso (*quadrupolo*)
- analizzatori a tempo di volo (*TOF=Time Of Flight*)
- analizzatori a trappola ionica (ion trap e FT-ICR= Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance)

ANALIZZATORE A SETTORE MAGNETICO

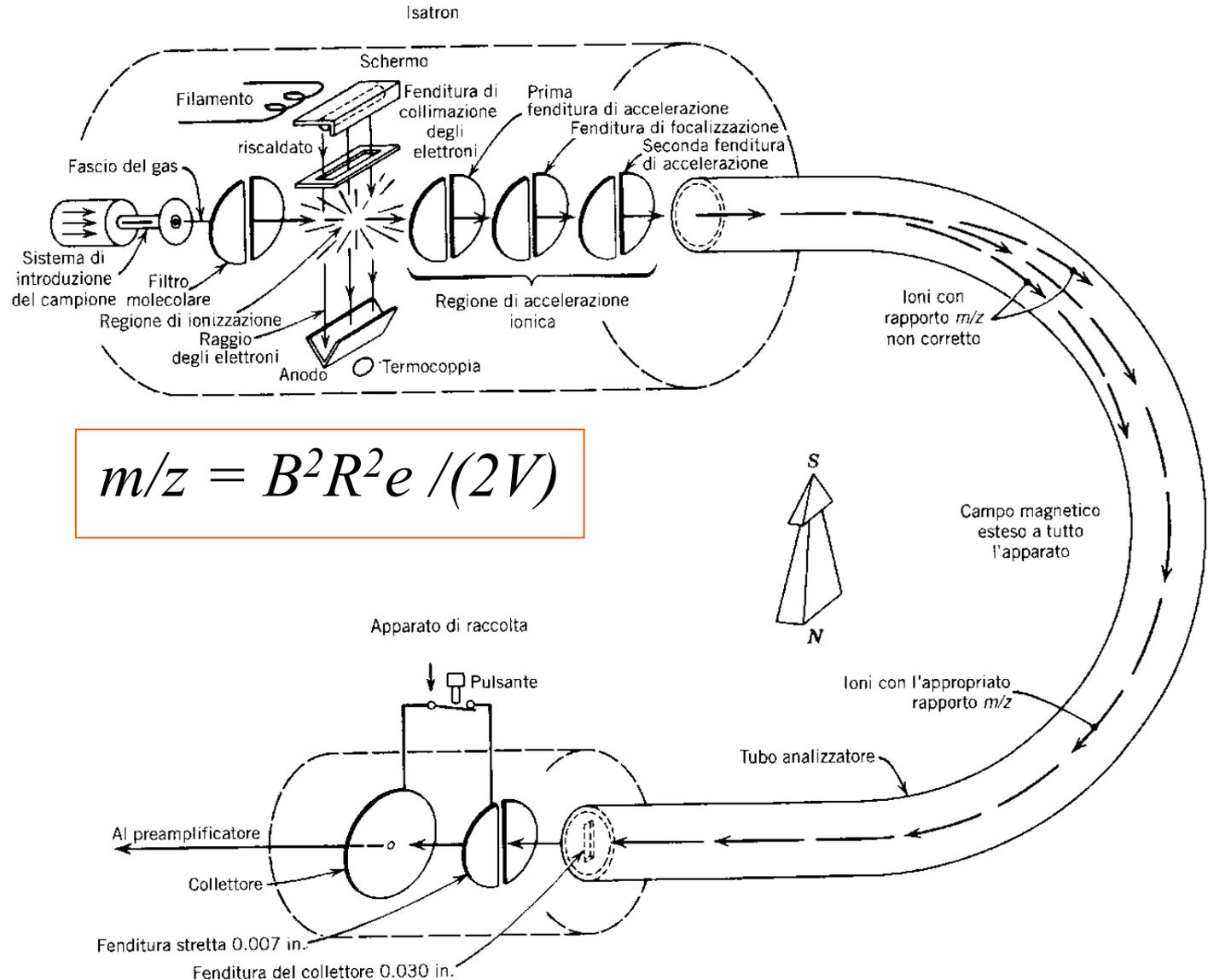


FIGURA 2.2. Diagramma schematico di un analizzatore di massa a singola focalizzazione con sezione a 180°. Il campo magnetico è perpendicolare alla pagina. Il raggio di curvatura cambia da uno strumento all'altro.

L'energia traslazionale di uno ione e' data da:

$$zeV = mv^2 / 2$$

mentre la forza centrifuga provocata dal campo magnetico B e':

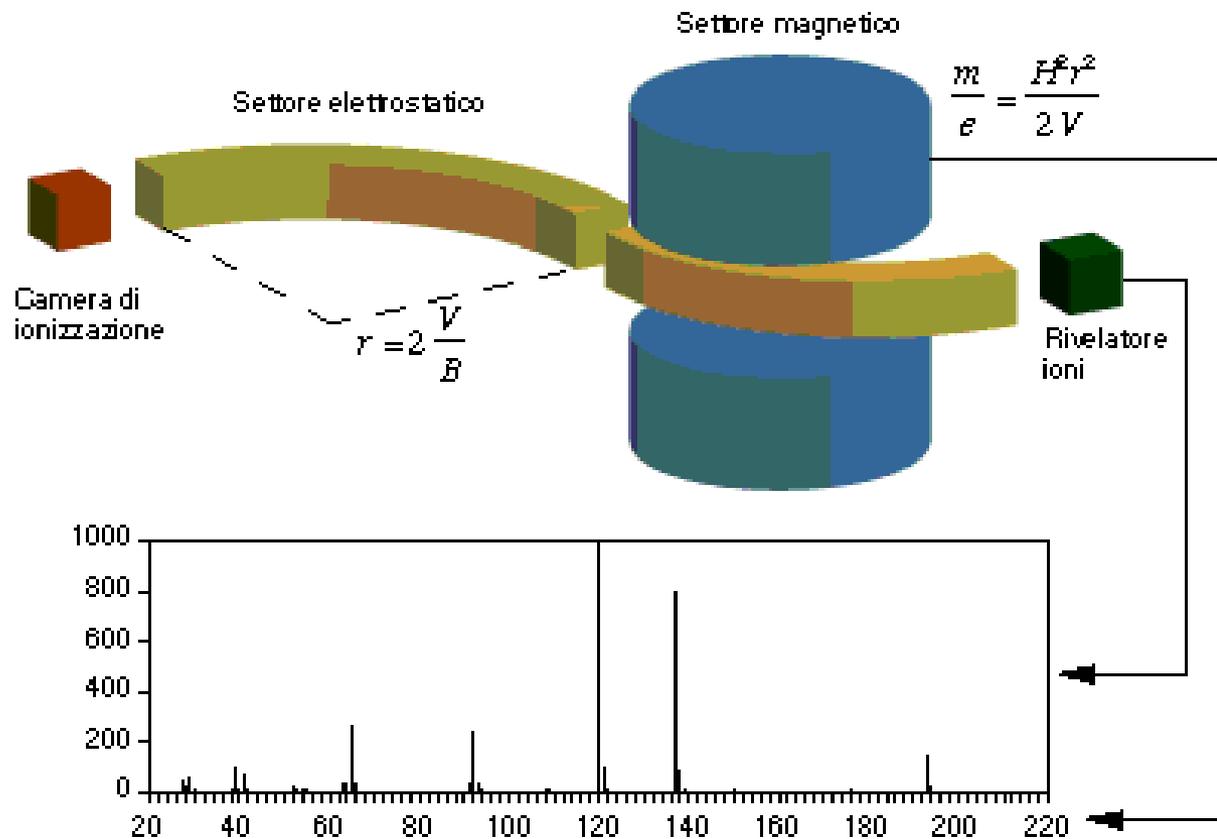
$$Bzev = mv^2 / R$$

Combinando:

$$m/z = B^2 R^2 e / (2V)$$

Ad un dato valore di campo magnetico B e di potenziale di accelerazione V , ogni valore di m/z corrispondera' ad un raggio di curvatura R .

Nel settore elettrostatico gli ioni non vengono separati in funzione del rapporto massa/carica, ma solo focalizzati in base alla loro energia traslazionale



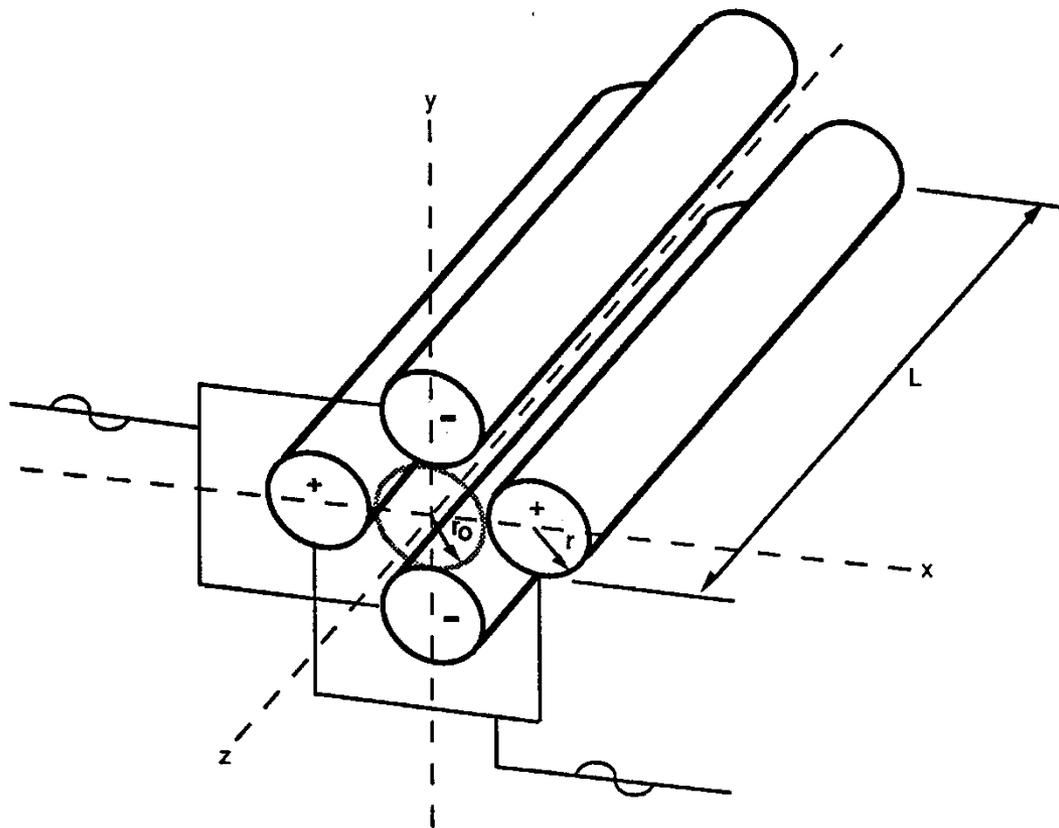
IL QUADRUPOLO

Un quadrupolo funziona come un filtro di massa a banda stretta

Trasmette soltanto gli ioni entro un piccolo intervallo di valori m/z

La scansione dello spettro si ottiene spostando tale intervallo lungo l'asse m/z grazie ad una regolazione dei potenziali applicati a questo analizzatore

Barre opposte sono collegate elettricamente tra loro: una coppia al polo positivo e l'altra al polo negativo di un generatore variabile di corrente continua (DC), inoltre alla prima coppia è applicato un potenziale variabile in corrente alternata a radiofrequenza e alla seconda coppia un segnale sfasato di 180°



Ipotizziamo di lavorare con ioni positivi:

- la coppia di elettrodi nel **piano xz** cui è applicata una DC +, per repulsione, focalizzerà gli ioni nel canale centrale del quadrupolo (lungo l'asse z); l'effetto dell'applicazione della RF+ è nullo sulla traiettoria degli ioni perché si somma al potenziale + della DC, mentre quando la RF diventa – gli ioni + vengono attratti dagli elettrodi;
- l'altra coppia di elettrodi nel **piano yz** cui è applicata una DC – attrarrà gli ioni, defocalizzandoli dall'asse z; quando la RF applicata è negativa il suo effetto si somma a quello della DC, mentre quando diventa + respinge gli ioni al centro dell'asse z.

Poiché uno ione pesante viene deviato più difficilmente di uno ione leggero la corrente continua fa sentire il suo effetto sugli ioni pesanti e la corrente alternata su quelli più leggeri:

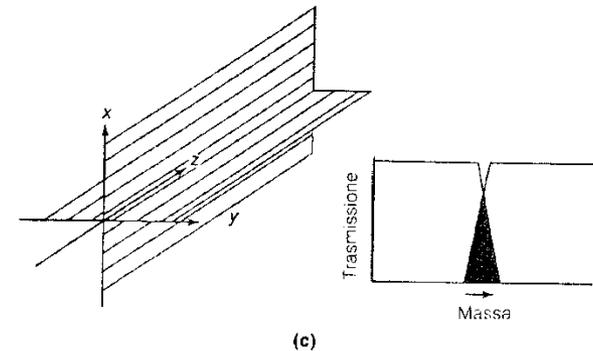
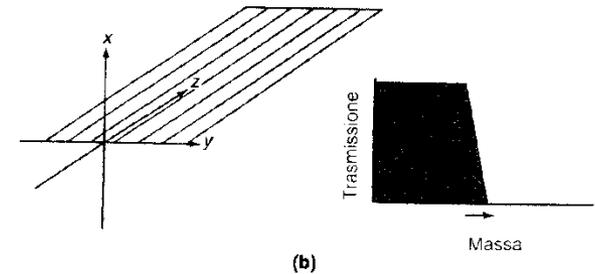
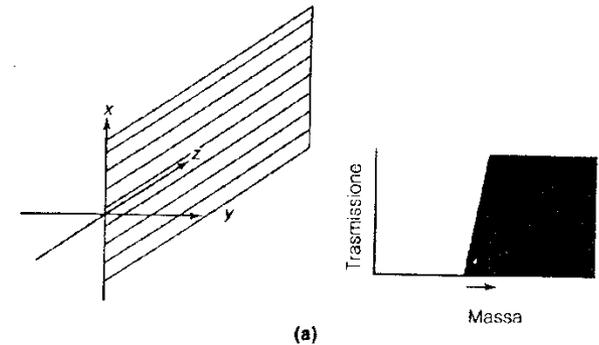
=> **nel piano xz** gli ioni pesanti sentiranno principalmente dell'effetto di focalizzazione della corrente continua, mentre quelli leggeri dell'effetto di defocalizzazione durante l'escursione negativa del potenziale in corrente alternata

=> **nel piano yz**, invece, gli ioni pesanti risentiranno principalmente dell'effetto di defocalizzazione della corrente continua, mentre quelli più leggeri potranno essere facilmente deviati e focalizzati per repulsione durante l'escursione positiva del potenziale in corrente alternata

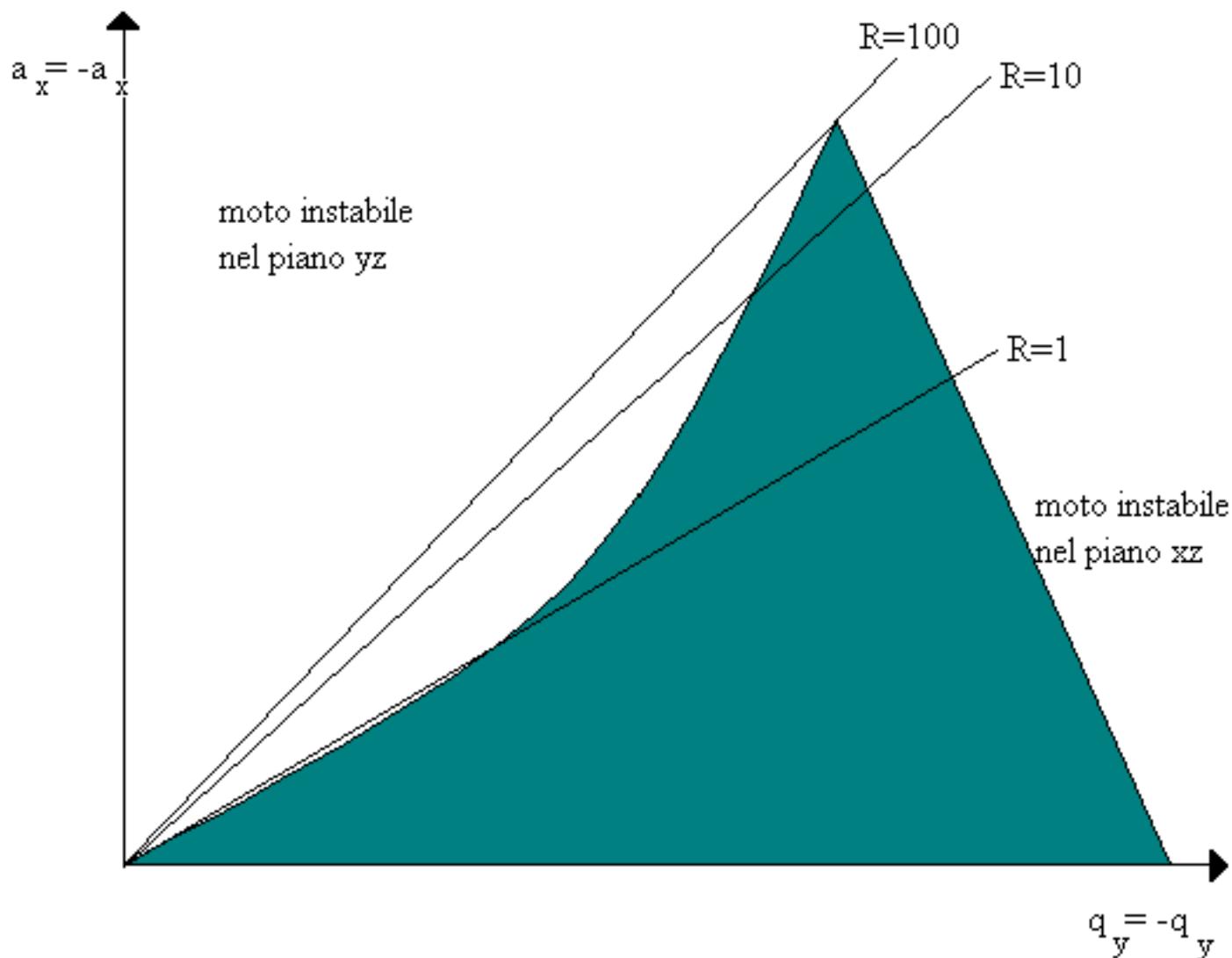
Nel **piano xz** trasmette preferenzialmente gli ioni più pesanti agendo come un filtro di massa passa alto

Nel **piano yz** trasmette preferenzialmente gli ioni più piccoli rispetto a quelli più grandi agendo come filtro di massa passa basso

L'effetto totale del quadrupolo è quello di trasmettere solo ioni con un limitato intervallo di valori m/z
Il centro della banda passante può essere variato regolando i potenziali in corrente continua ed alternata.

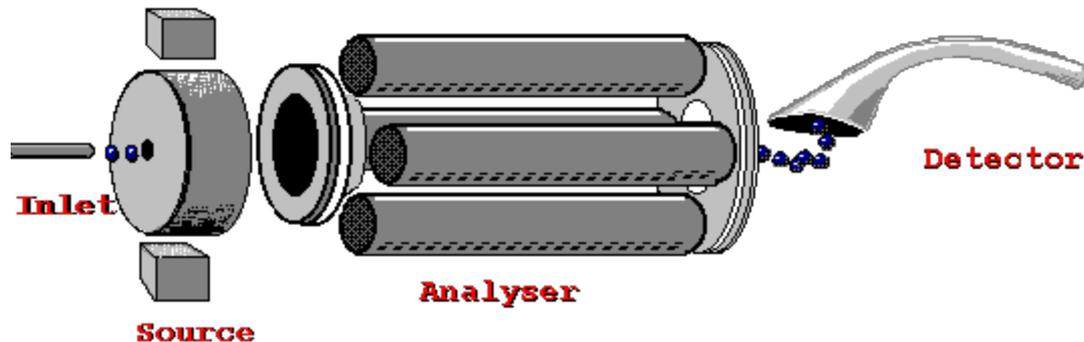


Se in un grafico si riporta $a \propto (\text{DC})$ vs $b \propto (\text{RF})$ è possibile visualizzare campi di esistenza in cui le traiettorie degli ioni sono stabili:



CARATTERISTICHE DEL QUADRUPOLO

- semplicità e la compattezza
- elevata velocità di scansione
- elevata sensibilità
- sufficiente risoluzione
- possibilità di effettuare rapide inversioni di polarità degli elettrodi

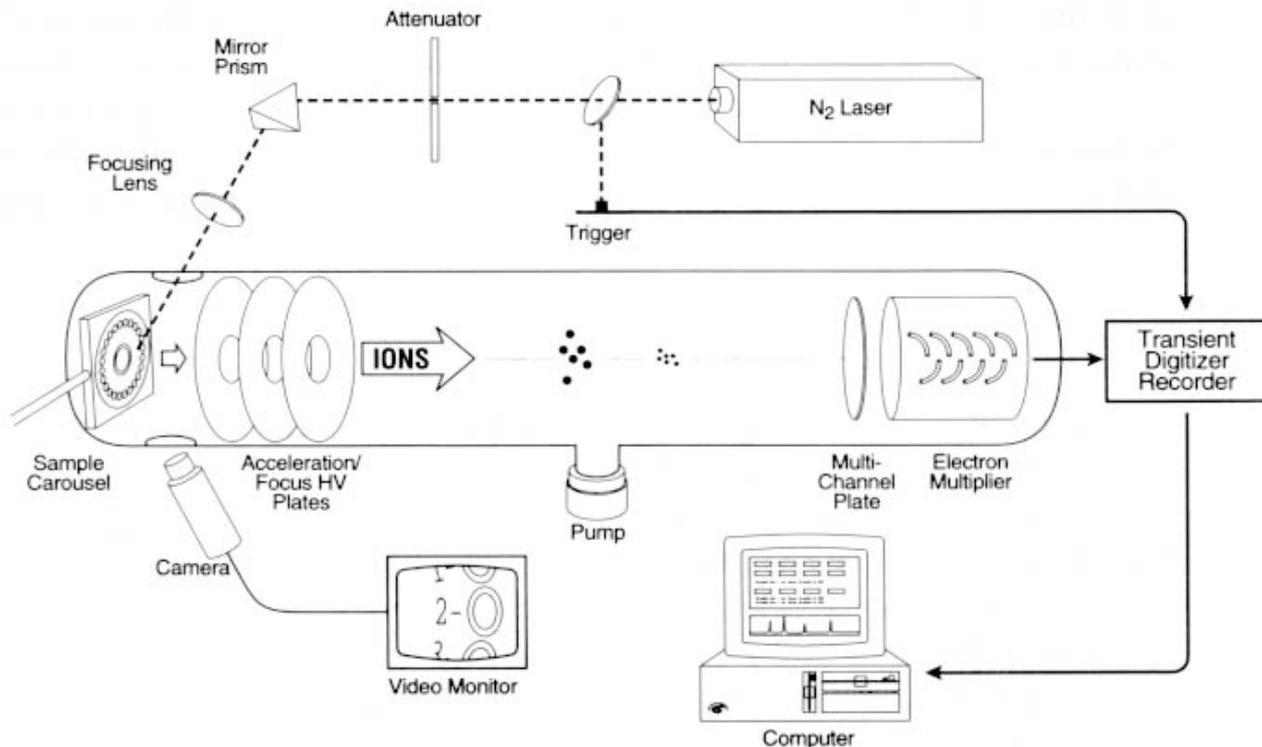


ANALIZZATORI A TEMPO DI VOLO (TOF)

Due sono gli stadi in cui si articola il suo funzionamento:

1. accelerazione degli ioni
2. misura del tempo di volo

Gli ioni sono formati nella sorgente come pacchetto discreto di ioni, inizialmente consistente di ioni con diversi valori di m/z , che è pulsato (mediante le slitte di accelerazione all'uscita della sorgente) nella regione del tubo di volo (lungo 30-100cm) libera da campi elettrici.



Il principio essenziale dell'analizzatore a tempo di volo è che se gli ioni con differenti masse sono accelerati alla stessa energia cinetica, ciascuno ione acquista una velocità caratteristica che dipende dal suo valore di m/z .

Ciascuno ione ha un'energia cinetica zV e poiché tutti gli ioni hanno essenzialmente la stessa energia le loro velocità sono inversamente proporzionali alle radici quadrate delle loro masse.

Ioni con differenti m/z si separano spazialmente viaggiando lungo il tubo di volo: ioni con bassi rapporti m/z , essendo più veloci viaggiano in testa e colpiscono il detector prima degli ioni con rapporti m/z più alti.

Il raggio originale risulta separato in “pacchetti” di ioni in base ai loro rapporti m/z . I pacchetti di ioni impattano sequenzialmente sul catodo piatto del detector.

$$E_p = qU$$

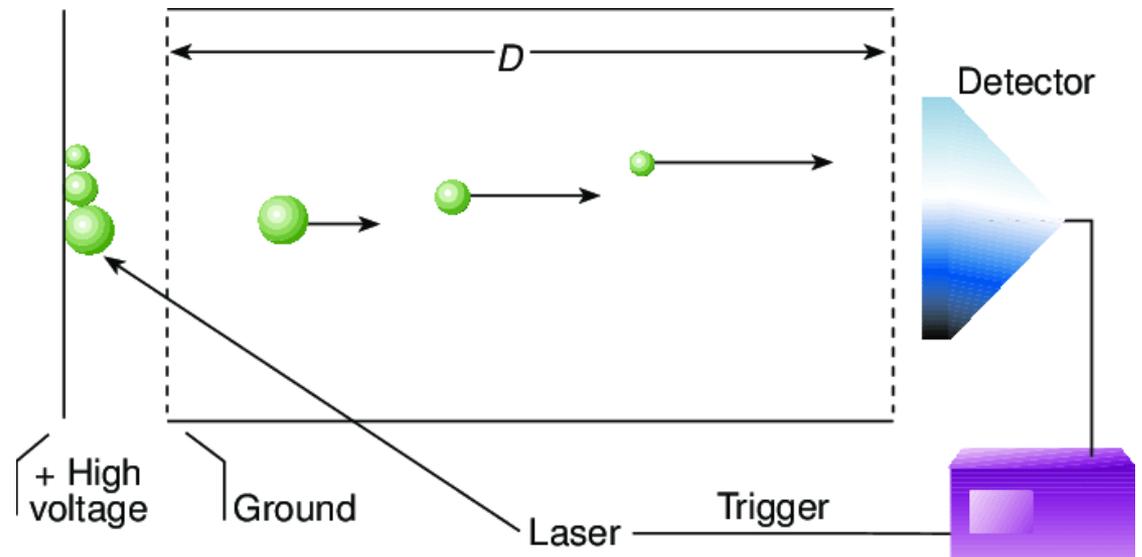
$$E_k = \frac{1}{2}mv^2$$

$$E_p = E_k$$

$$qU = \frac{1}{2}mv^2$$

$$t = k \sqrt{\frac{m}{q}}$$

$$v = \frac{d}{t}$$

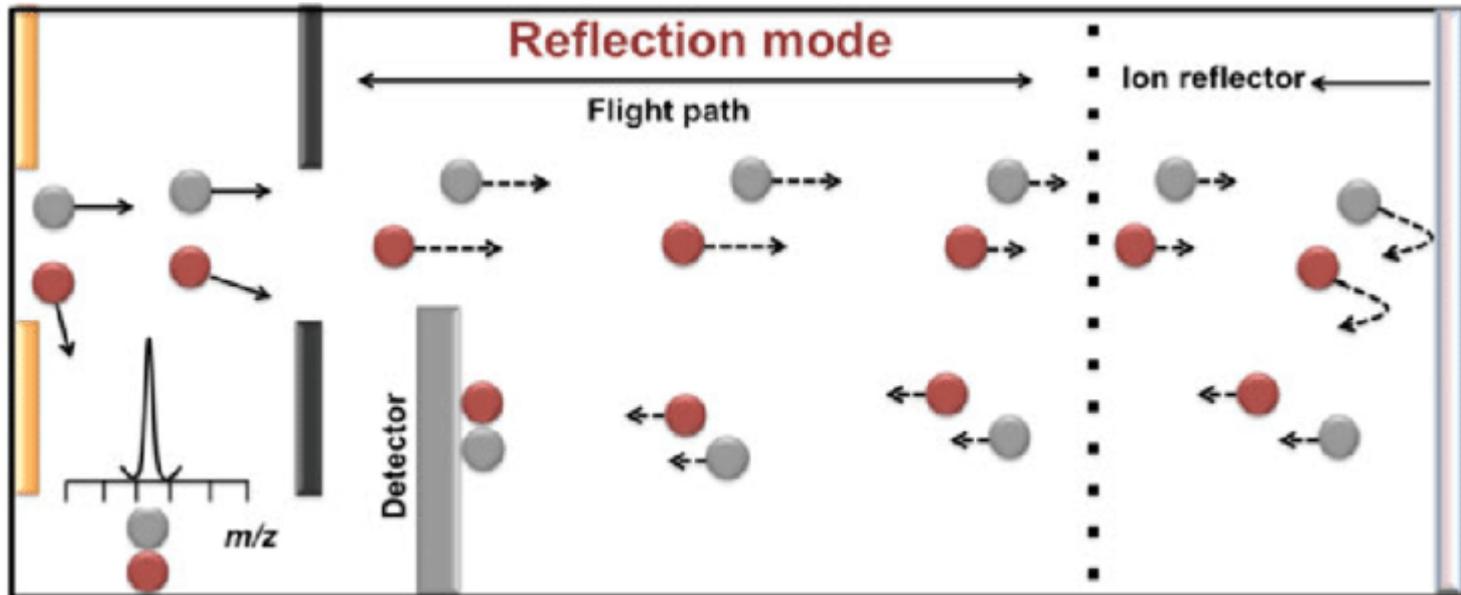


Il tempo di volo presenta altri **vantaggi** oltre alla sua *semplicità* e *robustezza*:

- *la velocità*: l'intero spettro di massa è ottenuto in ogni singolo ciclo di misura senza necessità di scansione di voltaggi e correnti ed i tempi di volo richiedono da 1 a 30 μs ;
- *la sensibilità*: poiché gli ioni attraversano pochi elementi ottici, la loro trasmissione dal punto di ionizzazione al detector è usualmente più alta di qualsiasi altro analizzatore (si potrebbe arrivare ad analizzare quantità femtomolari);
- *un intervallo di masse da analizzare praticamente illimitato* (potrebbero essere rilevati ioni a singola carica fino a 1Mda).

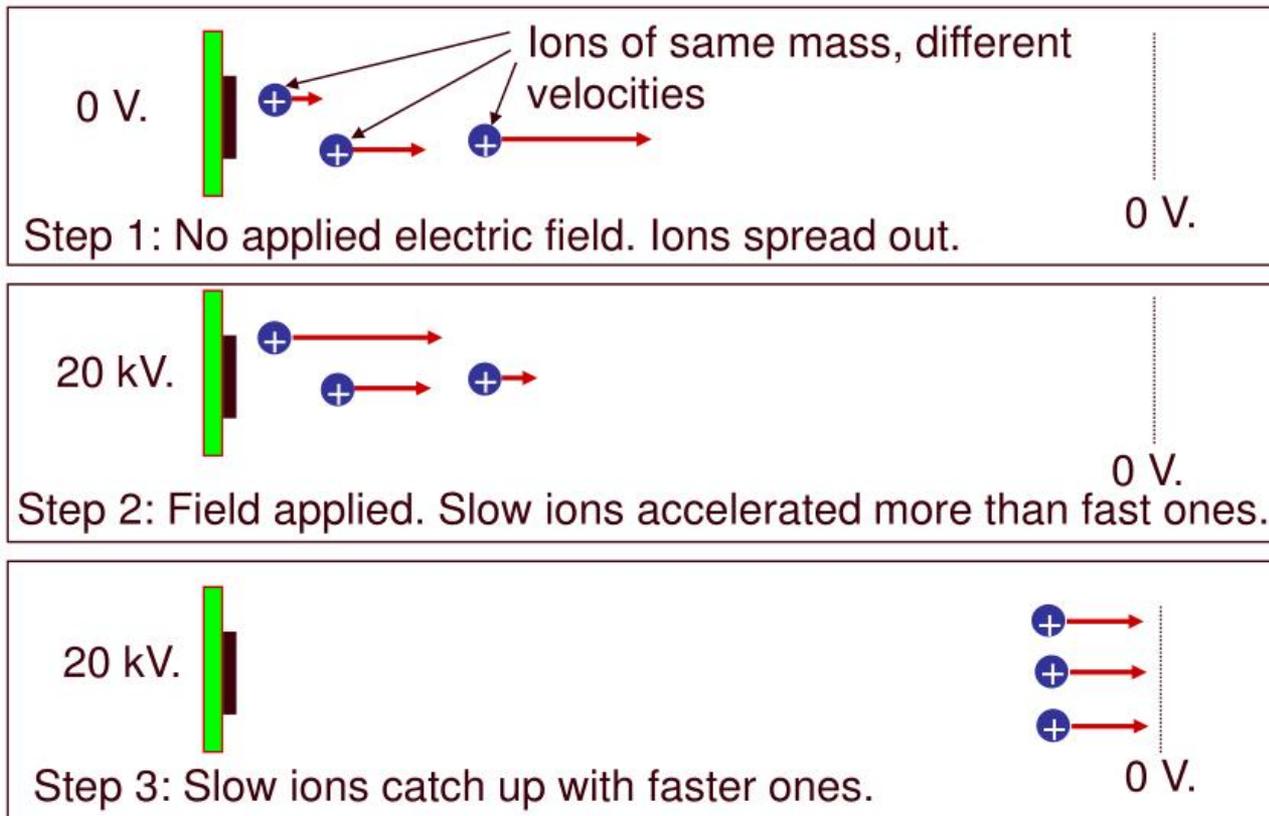
Il Reflectron: TOF a riflessione

Si definisce Reflectron uno spettrometro di massa a tempo di volo in cui la correzione delle differenze energetiche di un gruppo di ioni con lo stesso valore di m/z viene realizzato grazie all'uso di un campo elettrico di decelerazione (Reflector): in un tale dispositivo gli ioni con lo stesso m/z ed energie cinetiche differenti sono dapprima rallentati, poi fermati ed infine respinti (per azione di un potenziale dello stesso segno della polarità degli ioni) con un'inversione della loro direzione di volo. Gli ioni a più alta energia penetrano più profondamente nel campo di riflessione e quindi vi trascorrono più tempo di quelli a bassa energia. Se l'azione ritardante del campo del reflector è adeguata, questo effetto compensa le differenze nel tempo di volo di ioni con lo stesso m/z ed il pacchetto viene rifocalizzato in uscita.



DELAYED EXTRACTION

Delayed Extraction (DE) improves performance



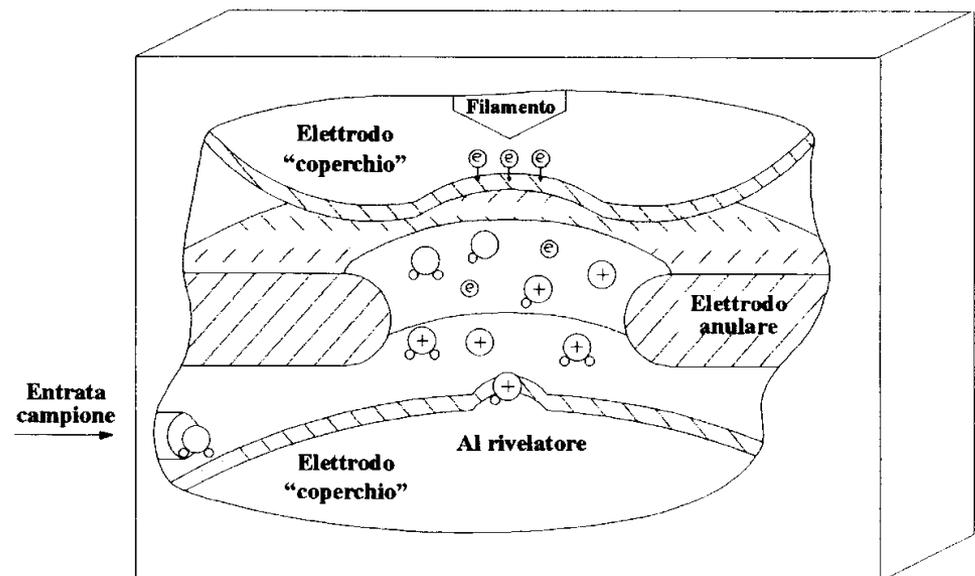
ANALIZZATORI A TRAPPOLA IONICA

Una trappola ionica è un dispositivo in cui ioni gassosi possono essere trattieneuti nel suo interno per prolungati periodi di tempo mediante l'applicazione di campi elettrici e/o magnetici.

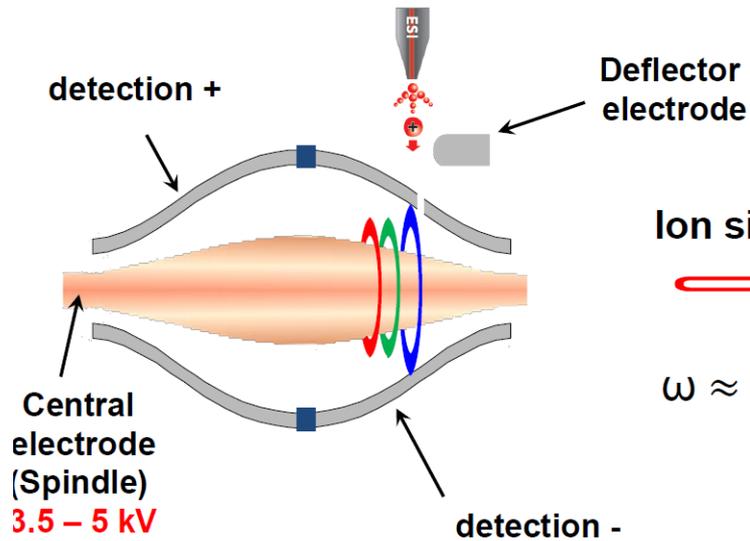
Sono state studiate diversi tipi di trappole, ma quelle più comuni sono due:

1. trappola ionica quadrupolare (più semplice)
2. trappola ionica a risonanza di ciclotrone (più complessa)
3. Trappola ionica orbitale (Orbitrap)

E' simile al quadrupolo, ma in esso il filtro a quadrupolo e' sferico e trattiene tutti gli ioni che vengono rilasciati progressivamente verso il rivelatore variando il campo elettrico.



ORBITRAP



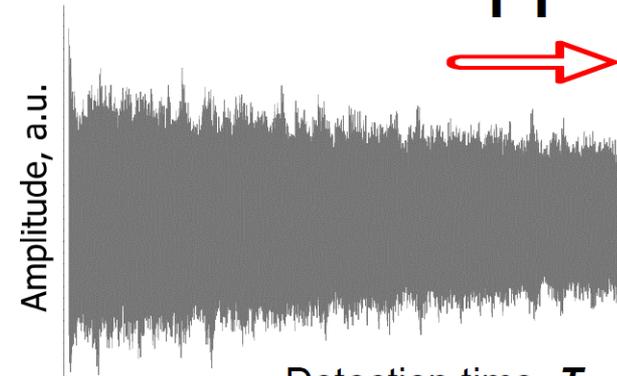
Ion signals



$$\omega \approx \sqrt{\frac{k}{m/z}}$$

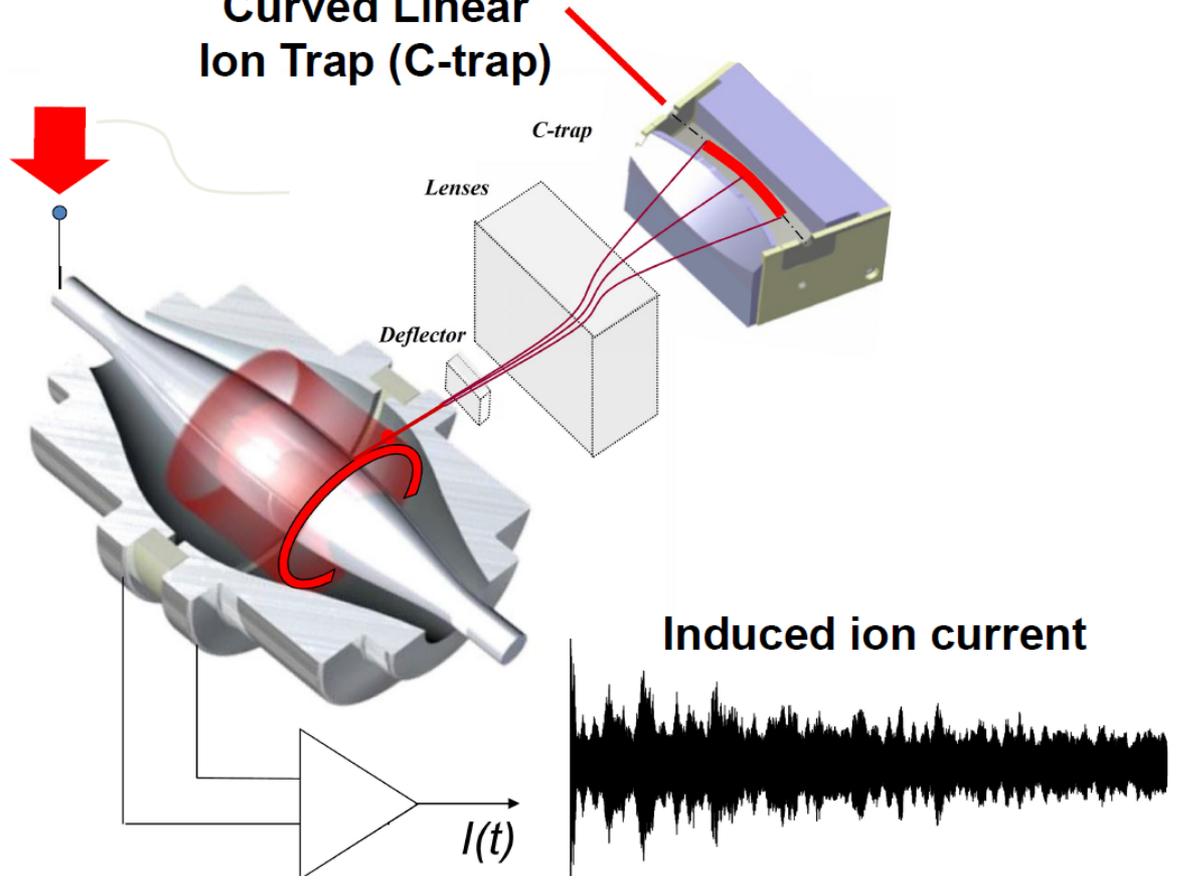
Time-domain transient

FT



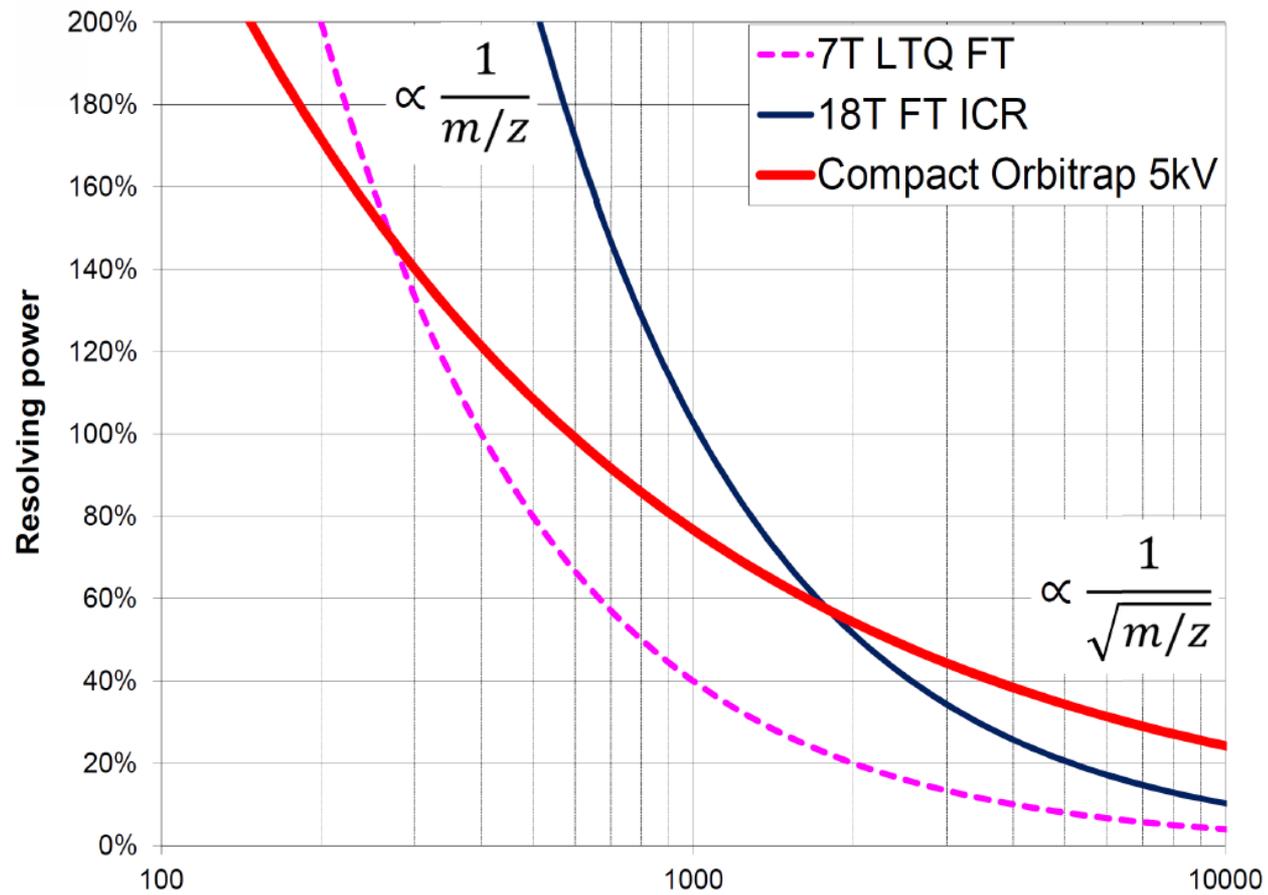
Induced ion current
(signal difference between
1st & 2nd detection electrodes)

Curved Linear Ion Trap (C-trap)

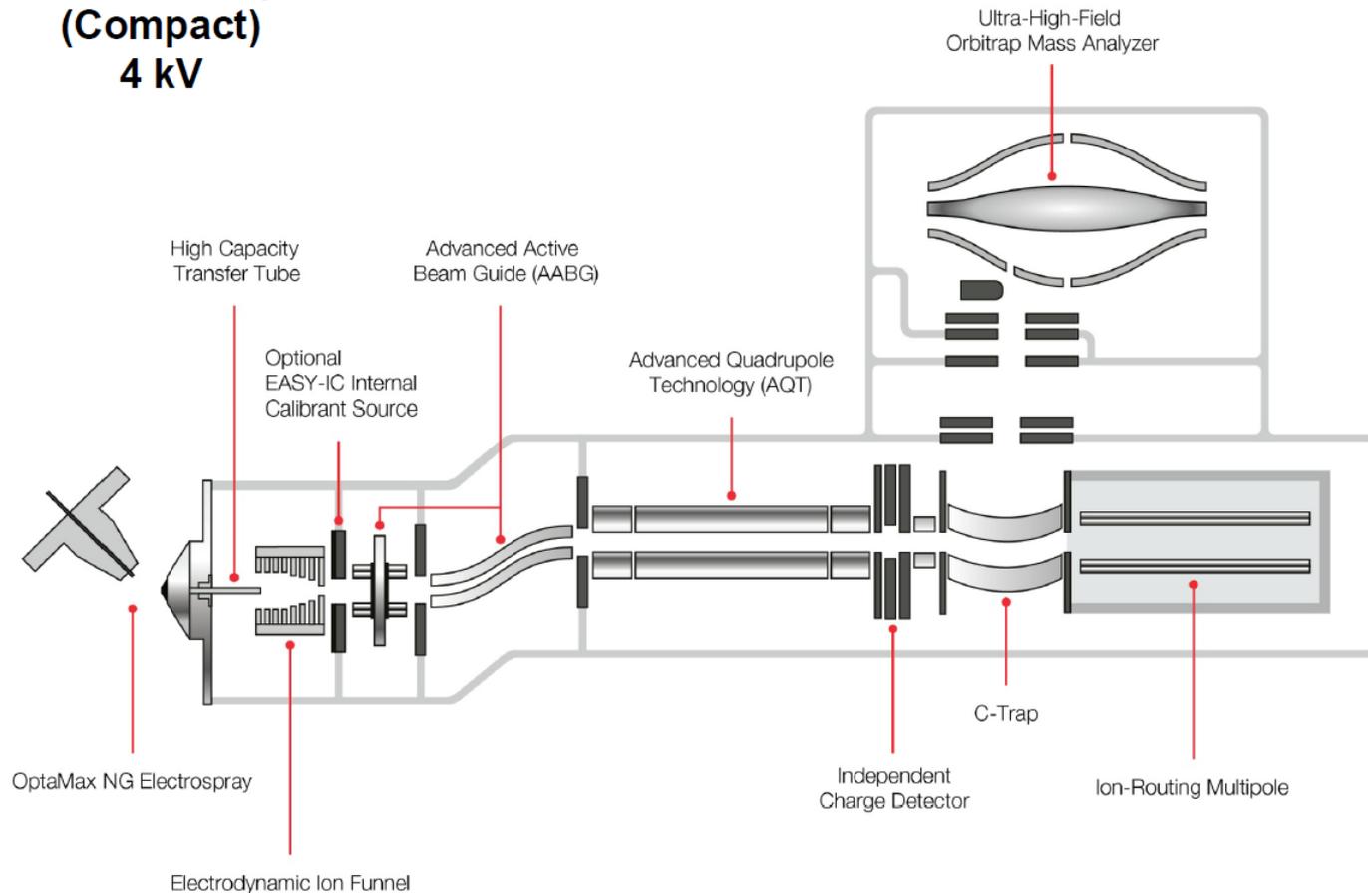


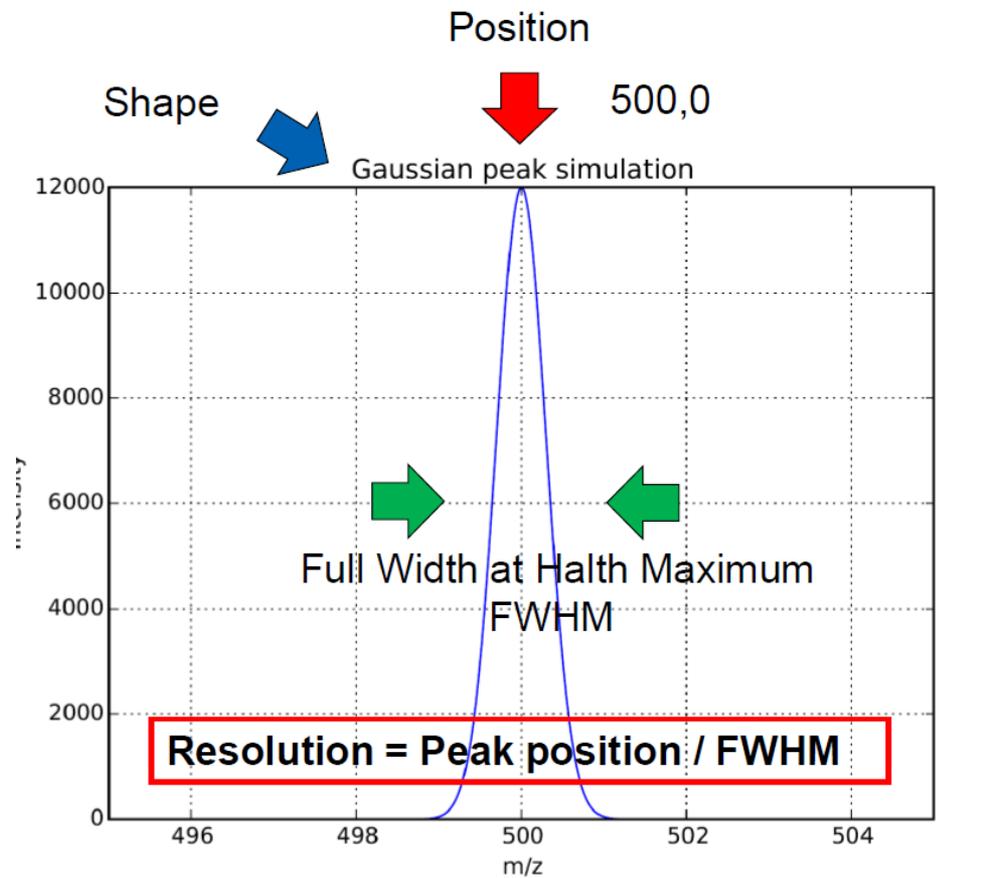
Induced ion current

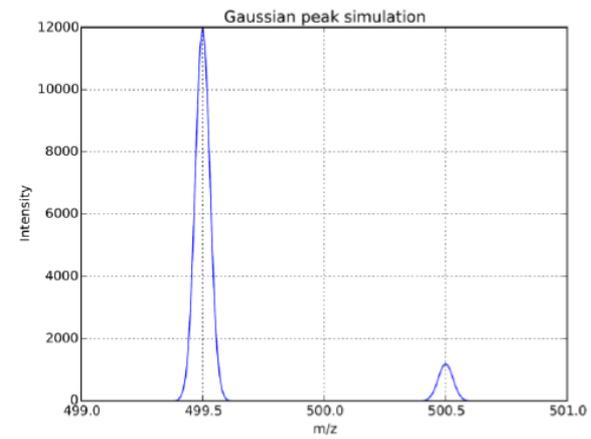
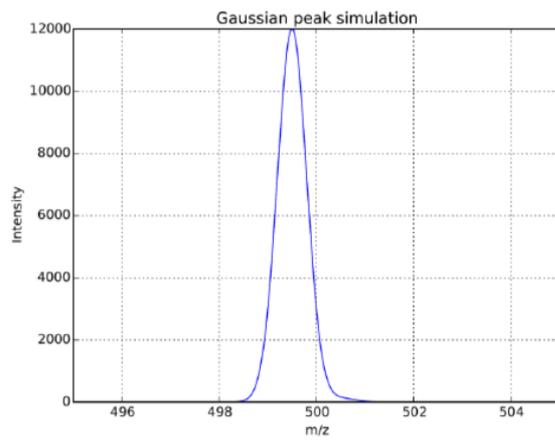
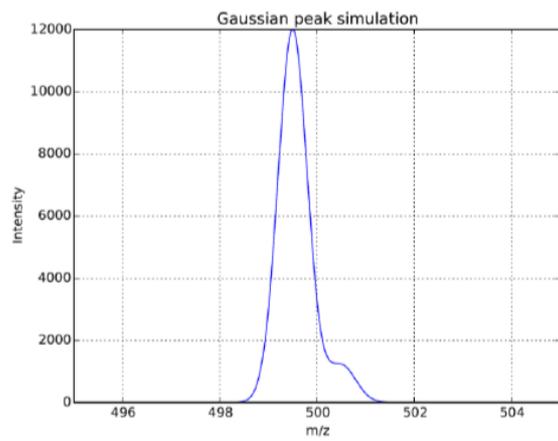
$$I(t)$$



D20 Orbitrap (Compact) 4 kV





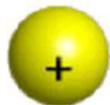


Mass Analyzer	Mass Range (u)	Mass Resolution	Mass Accuracy (ppm)
Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT ICR)	30.000	1.000.000+	< 1 (@ 400 u)
Orbitrap	50.000	500.000	< 2 (@ 100-2000)
Magnetic Sector (BE)	20.000	100.000	< 10
Time-of-Flight (TOF, RTOF)	> 1.000.000	5.000-20.000	200; 5-10
Quadrupole (Q)	4.000	2.000	100
Iontrap (IT)	6.000	4.000	100

<i>Isotope</i>	<i>Mass</i>	<i>Abundance</i>	<i>Chemical mass</i>	<i>Deviation from the whole number</i>
¹H	1.00782510	99.9852%	1.00794	+0.0079
²H (D)	2.01410222	0.0148%		
¹²C	12.0(0)	98.892%	12.011	+0.011
¹³C	13.0033544	1.108%		
¹⁴N	14.00307439	99.635%	14.00674	+0.007
¹⁵N	15.0001077	0.365%		
¹⁶O	15.99491502	99.759%	15.9994	-0.0006
¹⁷O	16.9991329	0.037%		
¹⁸O	17.99916002	0.204%		
³¹P	30.9737647	100%	30.9737647	-0.0262
³²S	31.9720737	95.0%	32.066	+0.066
³³S	32.9714619	0.76%		
³⁴S	33.9678646	4.22%		
³⁶S	35.967090	0.014%		

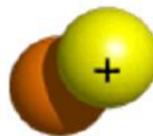
The Nuclei of the Three Isotopes of Hydrogen

Protium



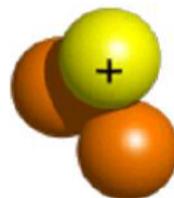
1 proton

Deuterium



1 proton
1 neutron

Tritium



1 proton
2 neutrons

Hydrogen
1 proton



${}^1\text{H}$



${}^2\text{H}$

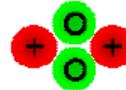


${}^3\text{H}$

Helium
2 protons

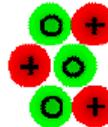


${}^3\text{He}$

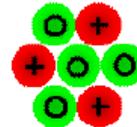


${}^4\text{He}$

Lithium
3 protons



${}^6\text{Li}$



${}^7\text{Li}$

Proton: 

1.00727

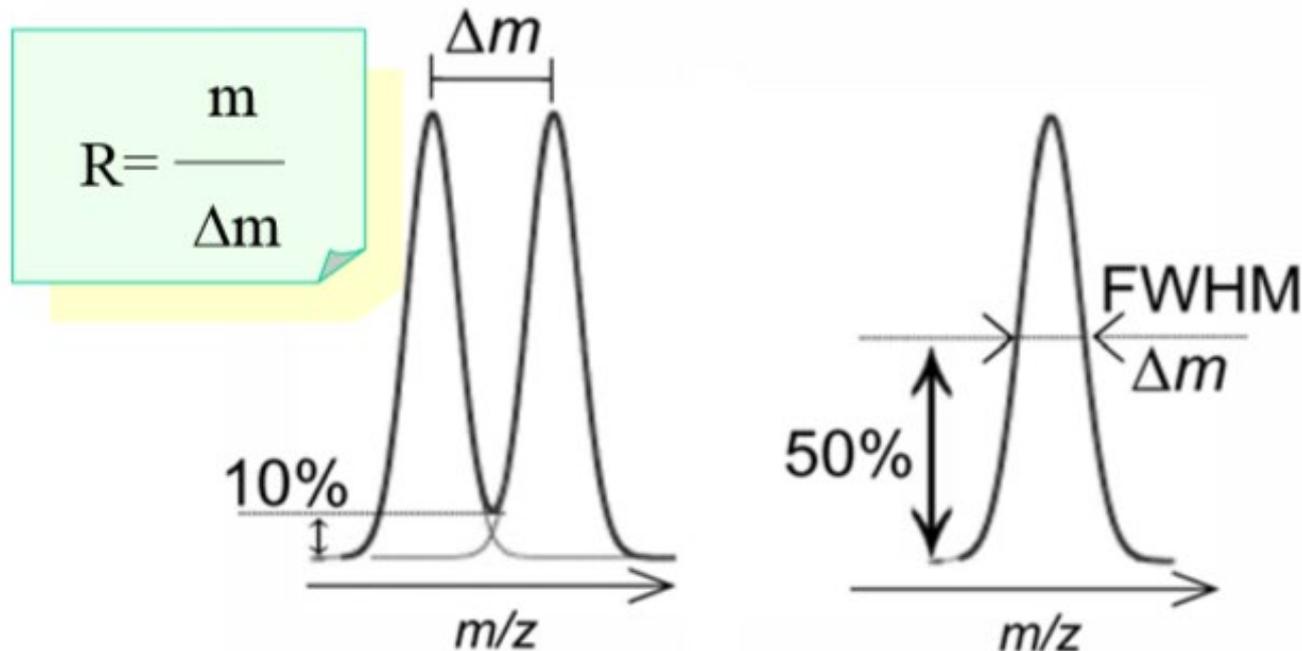
Neutron: 

1.00866

	mass	probability	¹ H	² H	¹² C	¹³ C	¹⁴ N	¹⁵ N	¹⁶ O	¹⁷ O	¹⁸ O	³² S	³³ S	³⁴ S	³⁶ S
1	5731.6075806688	0.1123023514	377	0	252	2	65	0	75	0	0	6	0	0	0
2	5732.6109355040	0.1028778936	377	0	251	3	65	0	75	0	0	6	0	0	0
3	5730.6042258336	0.0814037470	377	0	253	1	65	0	75	0	0	6	0	0	0
4	5733.6142903392	0.0704027660	377	0	250	4	65	0	75	0	0	6	0	0	0
5	5734.6176451744	0.0383896060	377	0	249	5	65	0	75	0	0	6	0	0	0
7	5733.6033765247	0.0301636876	377	0	252	2	65	0	75	0	0	5	0	1	0
6	5729.6008709984	0.0293871014	377	0	254	0	65	0	75	0	0	6	0	0	0
8	5734.6067313599	0.0276323390	377	0	251	3	65	0	75	0	0	5	0	1	0
9	5732.6046155640	0.0266824062	377	0	252	2	64	1	75	0	0	6	0	0	0

RISOLUZIONE

Il potere risolutivo di uno strumento consiste nella capacità di separare due picchi di massa M_n ed M_m . Si sceglie arbitrariamente e per convenzione di misurare il potere risolutivo di uno strumento su picchi separati tra loro da una valle alta il 10% dell'altezza dei picchi stessi.



In tali condizioni il potere risolutivo e' dato da:

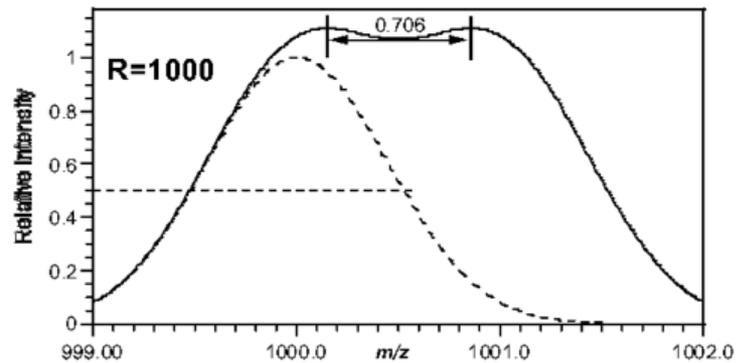
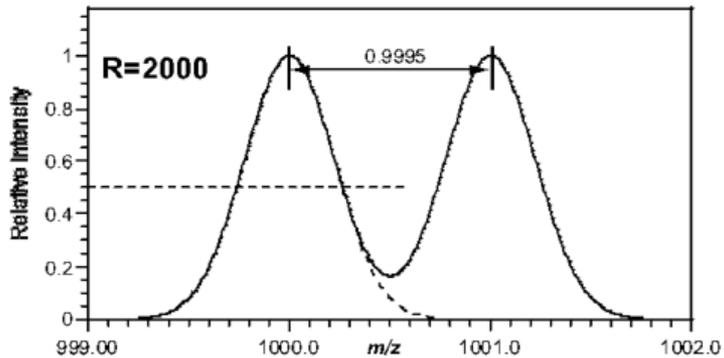
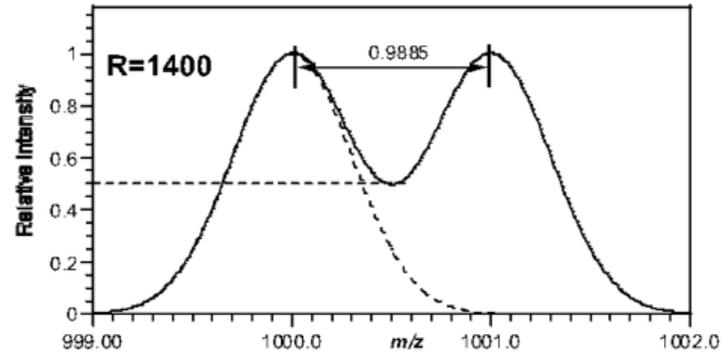
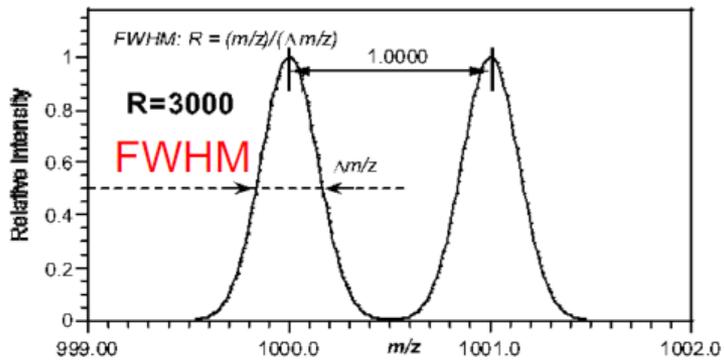
$$R = \frac{M_n}{M_n - M_m}$$

Uno strumento si definisce “a bassa risoluzione” se separa masse unitarie fino a 2000 m/z ($R = 2000/[2000-1999]=2000$).

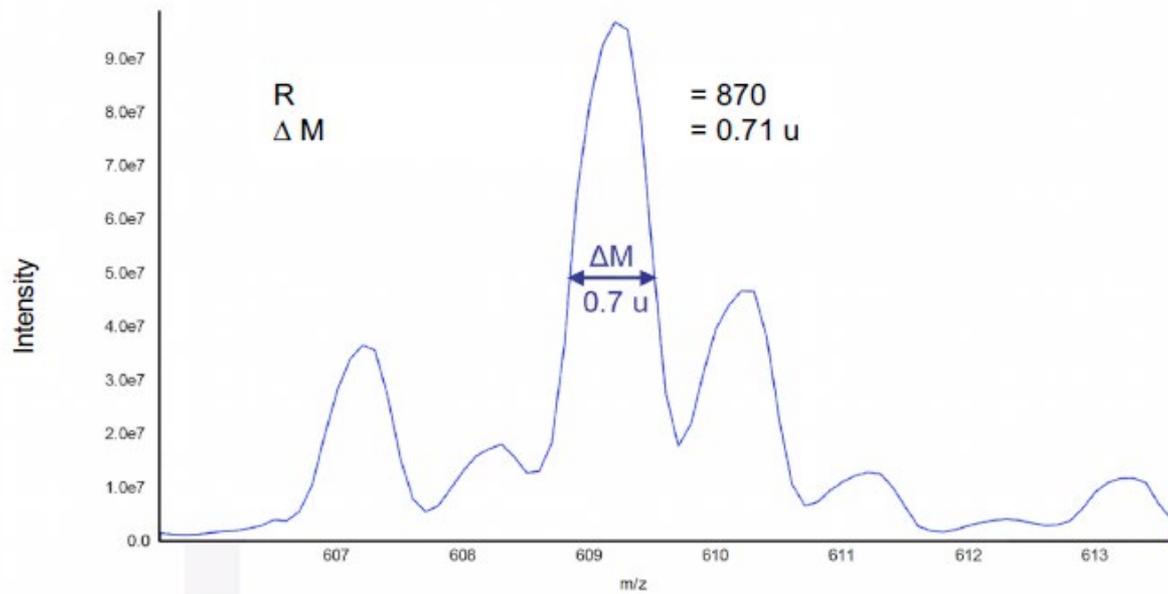
Uno strumento ad alta risoluzione con $R=20000$ puo' distinguere tra i picchi di $C_{16}H_{26}O_2$ e $C_{15}H_{24}NO_2$.

$$R = \frac{250.1933}{250.1933 - 250.1807} \approx 20000$$

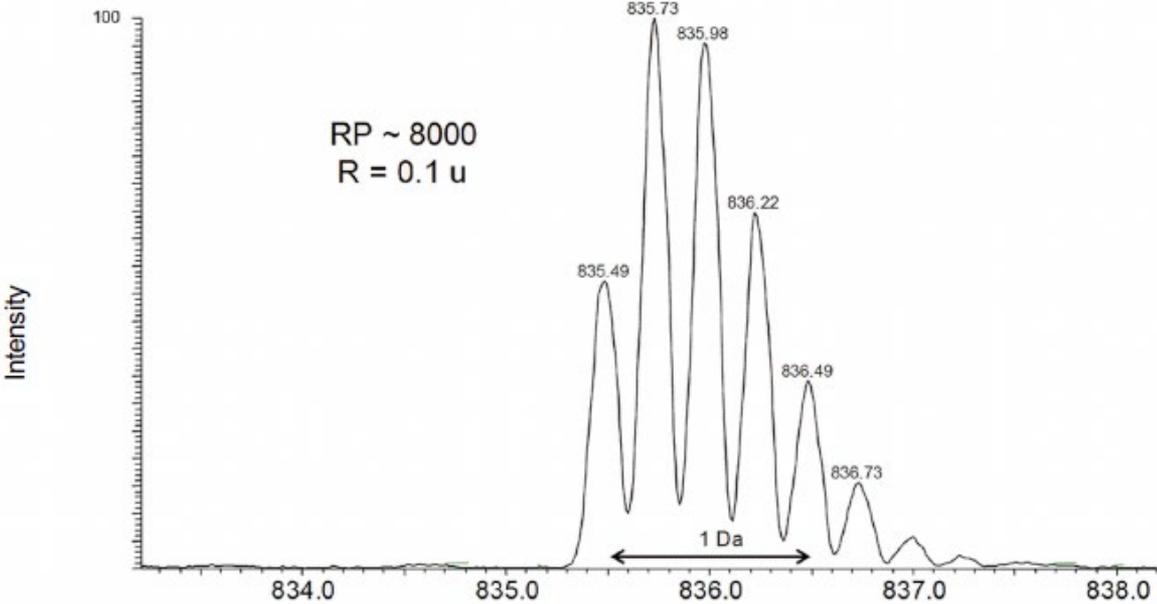
$R = (m/z)_0 / \text{FWHM}(m/z)$
 FWHM: full width at half maximum



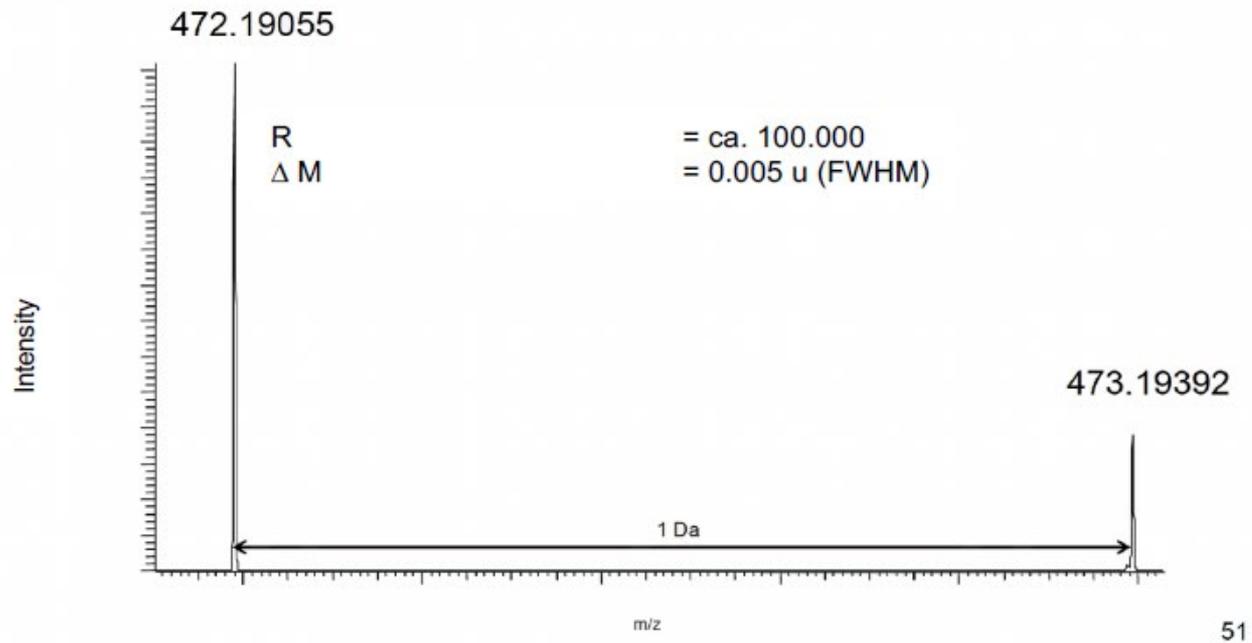
low resolution



moderate resolution



high resolution



Average Mass e.g. C=12.01115

Mass of an ion or molecule weighted for its *isotopic composition*.

Monoisotopic Mass (Exact Mass) e.g. C=12.000000

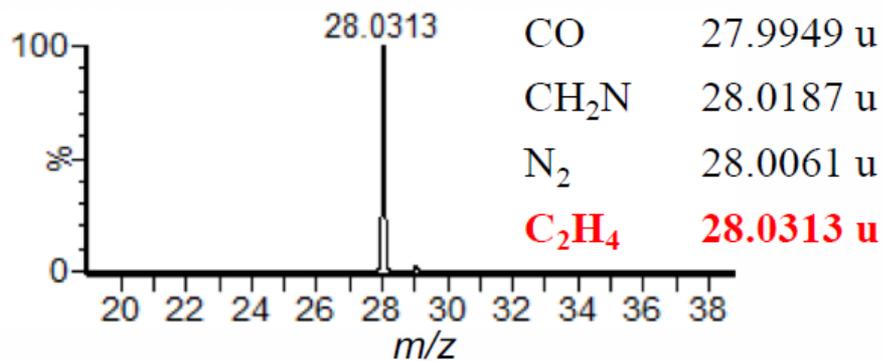
Exact mass of an ion or molecule calculated using the *mass of the most abundant isotope* of each element.

Nominal Mass e.g. C=12

Mass of a molecular ion or molecule calculated using the *isotope mass of the most abundant constituent* (ignoring mass defect) element isotope of each element rounded to the *nearest integer* value and multiplied by the number of atoms of each element (C=12, H=1, N=14, O=16,)

e.g. m/z 28 can have 4 different elemental compositions with different exact mass values.

CO	27.9949 u	CH ₂ N	28.0187 u
N ₂	28.0061 u	C ₂ H ₄	28.0313 u



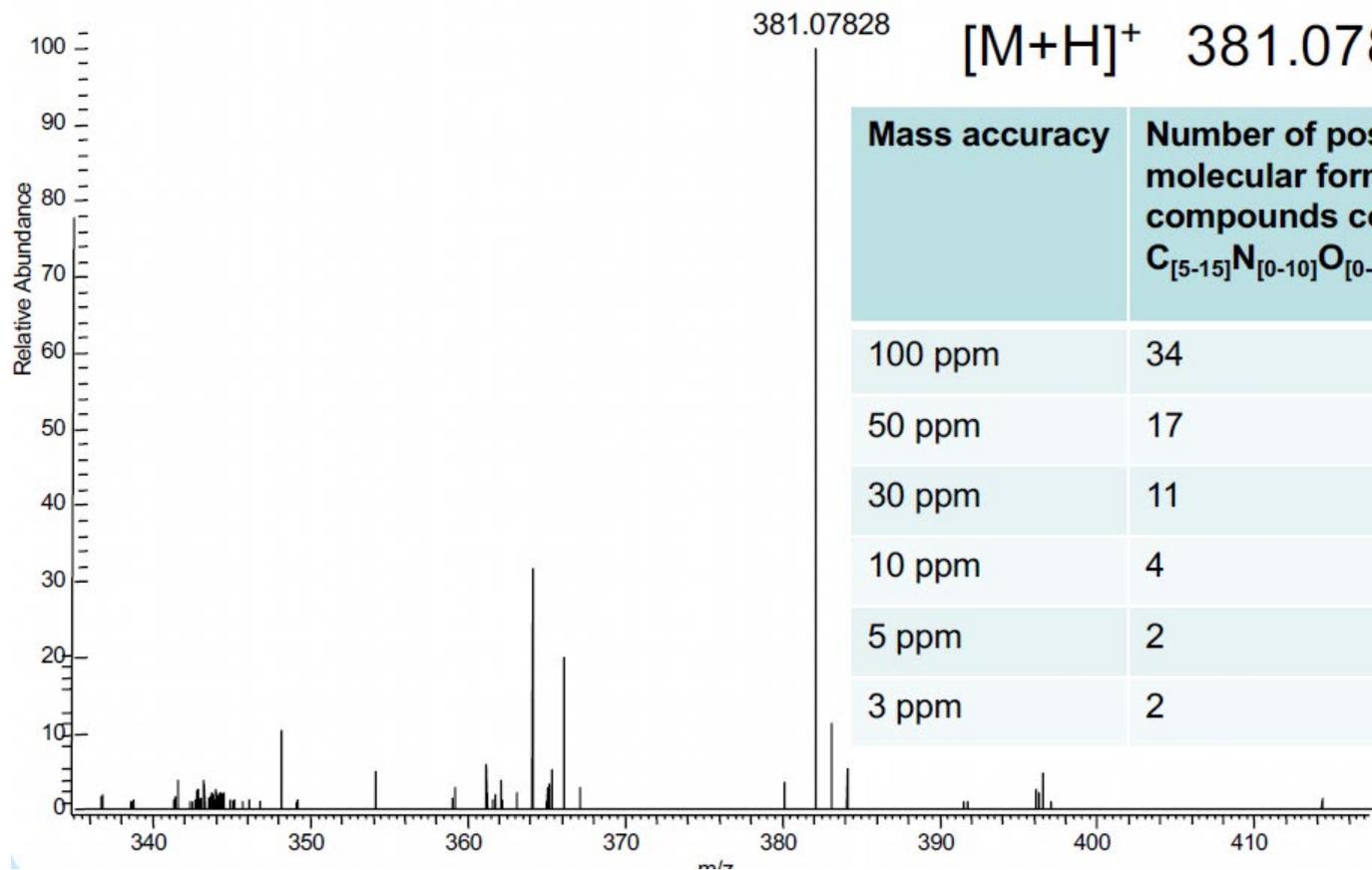
– Mass error in millimass units (mmu)

$$[\text{measured mass (u)} - \text{theoretical mass (u)}] \times 1000$$

– Mass error in parts per million (ppm)

$$\frac{[\text{measured mass (u)} - \text{theoretical mass (u)}] \times 1000000}{\text{theoretical mass (u)}}$$

Measured Mass	Theoretical Mass	Mass Difference (u)	ppm error
200.0020	200.0000	0.002	$(0.002/200)1e^6 = 10 \text{ ppm}$
400.0020	400.0000	0.002	$(0.002/400)1e^6 = 5 \text{ ppm}$
800.0020	800.0000	0.002	$(0.002/800)1e^6 = 2.5 \text{ ppm}$
1000.0020	1000.0000	0.002	$(0.002/1000)1e^6 = 2 \text{ ppm}$
		Constant with mass	Varies with mass



$[M+H]^+$ 381.07828

Mass accuracy	Number of possible molecular formulae for compounds containing $C_{[5-15]}N_{[0-10]}O_{[0-15]}H_{[0-40]}$
100 ppm	34
50 ppm	17
30 ppm	11
10 ppm	4
5 ppm	2
3 ppm	2

SPETTOMETRIA DI MASSA TANDEM: DISSOCIAZIONE ATTIVATA MEDIANTE COLLISIONI (CAD)

Le tecniche di ionizzazione soft producono abbondanti ioni quasi-molecolari, ma una ridotta frammentazione che fornisce scarse informazioni strutturali per l'identificazione dei composti incogniti

La *spettrometria di massa tandem* (MS/MS) consente di superare questi problemi selezionando lo ione d'interesse ed attivandolo, mediante una o più collisioni, per generare frammenti caratteristici.

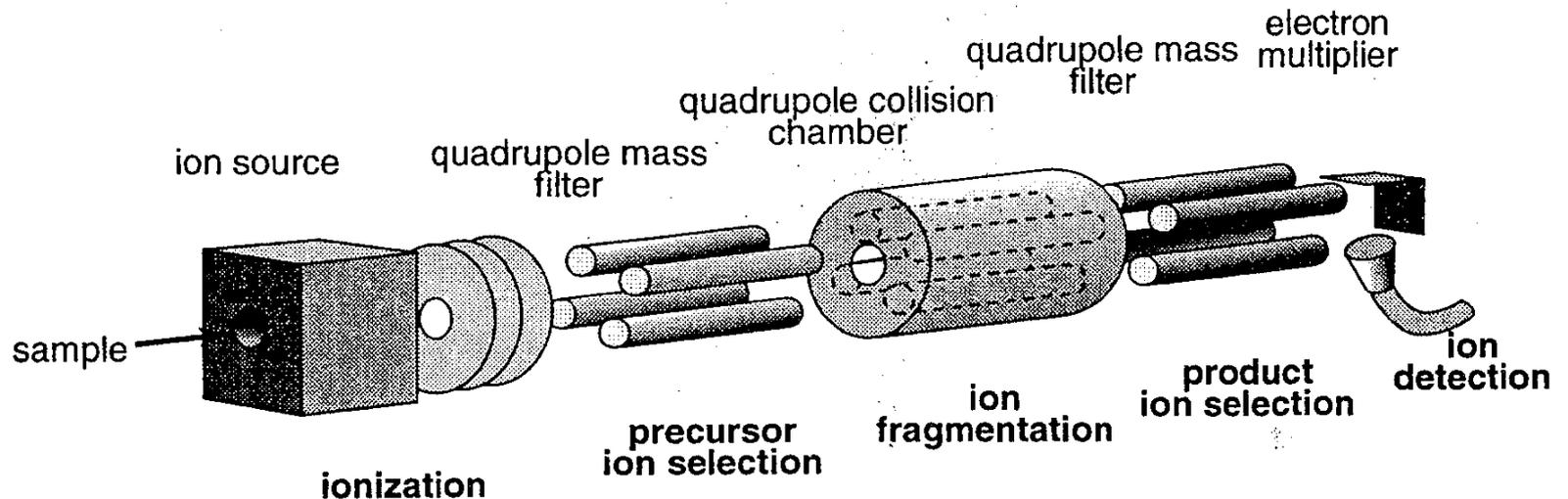
Quando la frammentazione è indotta da collisioni con un gas neutro si parla di *Dissociazione Attivata da Collisione* (CAD, Collision-Activated Dissociation)

Nel processo di collisione, una frazione dell'energia cinetica dello ione è trasformata in energia interna, determinandone la dissociazione in vari frammenti; l'estensione della frammentazione dipende dal contenuto totale di energia interna dello ione eccitato.

Ci sono due principali categorie di strumenti che permettono esperimenti MS/MS.

1. spettrometri *tandem nello spazio*, i primi ad essere ideati, all'inizio per assemblaggio sequenziale di due analizzatori a settore successivamente di due quadrupoli, time-of-flight (TOF) o loro combinazioni (ibridi quadrupolo-settore e quadrupolo-TOF).
2. spettrometri *tandem nel tempo*, in cui la selezione dello ione e la sua dissociazione avvengono entro lo stesso spazio ma in tempi successivi; strumenti di questo tipo sono la trappola ionica quadrupolare e la trappola ionica a risonanza di ciclotrone.

Attualmente lo spettrometro di massa tandem più utilizzato è il triplo quadrupolo

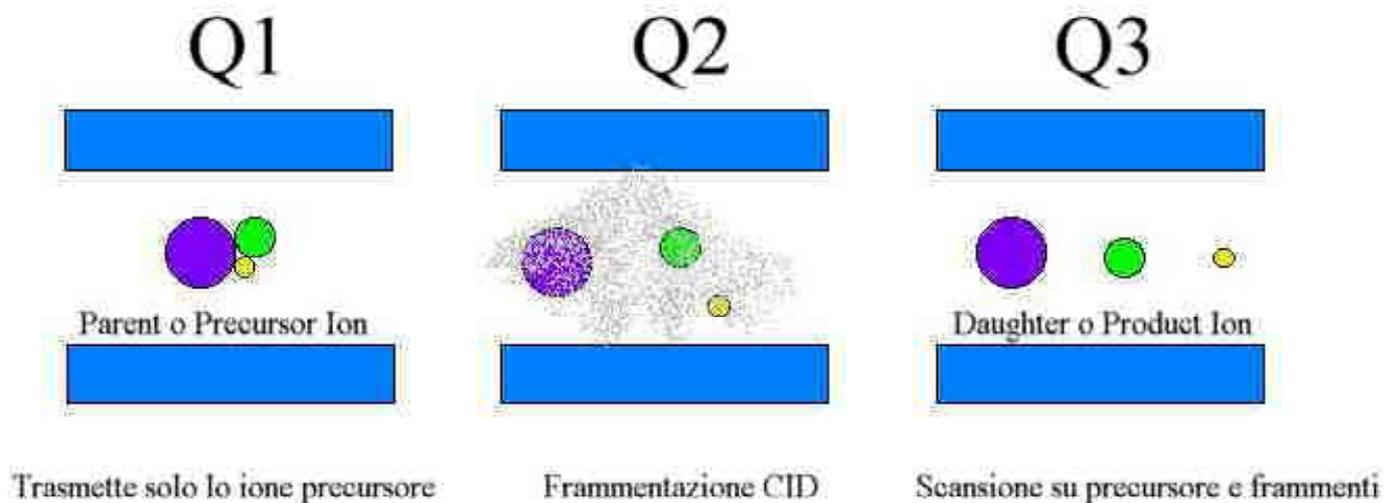


Le modalità MS/MS per gli spettrometri di massa tandem nello spazio sono quattro:

1. Product Ion Scan
2. Precursor Ion Scan
3. Neutral Loss Scan
4. Selected/ Multi Reaction Monitoring (SRM o MRM)

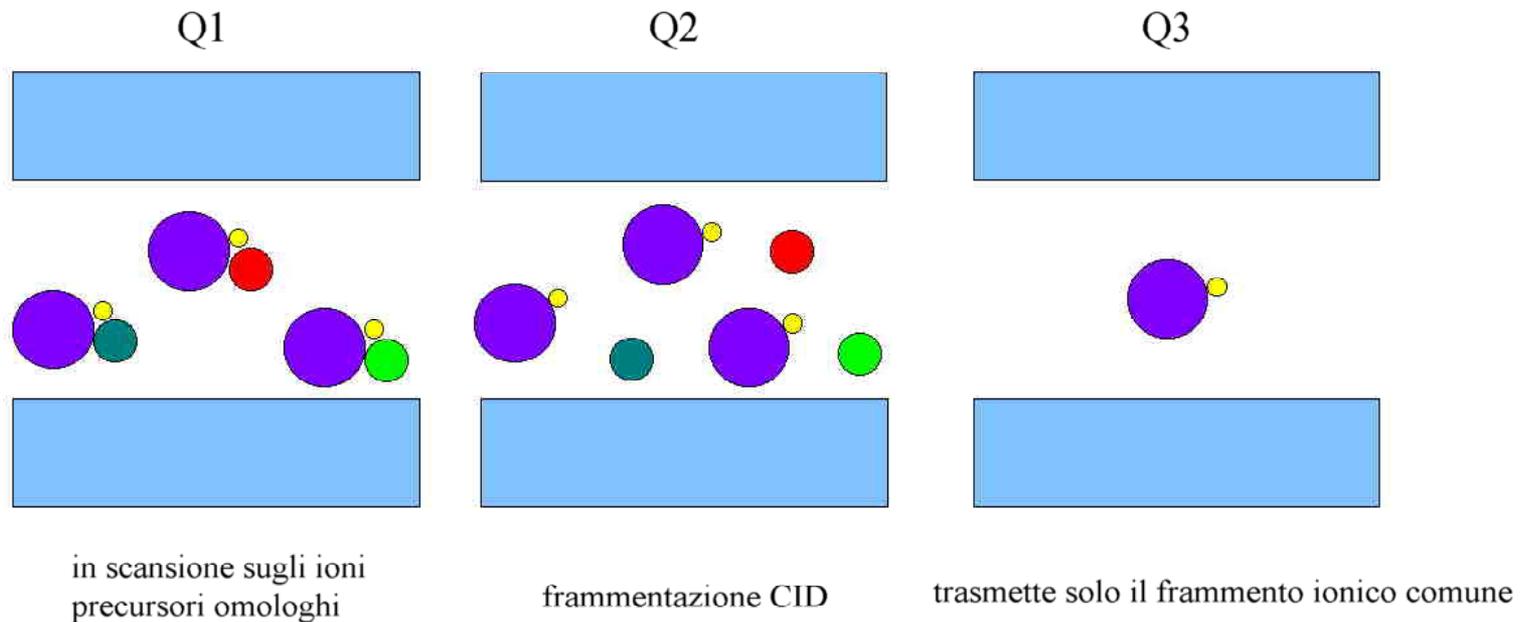
Product Ion Scan: è la più utilizzata e prevede che uno ione (detto “parent ion”, ma oggi definito più correttamente “precursor ion”) selezionato dal primo analizzatore di massa (quadrupolo o sistema a settore) venga opportunamente frammentato nella cella di collisione ed i frammenti così generati (detti “daughter ion”, ma oggi definiti “product ion”) siano caratterizzati da un secondo analizzatore di massa.

Nel caso in cui gli analizzatori siano dei quadrupoli, si parla di configurazione strumentale a triplo quadrupolo, in quanto la frammentazione avviene in una cella che è di fatto un altro quadrupolo (Q_1 fisso, Q_2 cella di collisione, Q_3 in scansione).



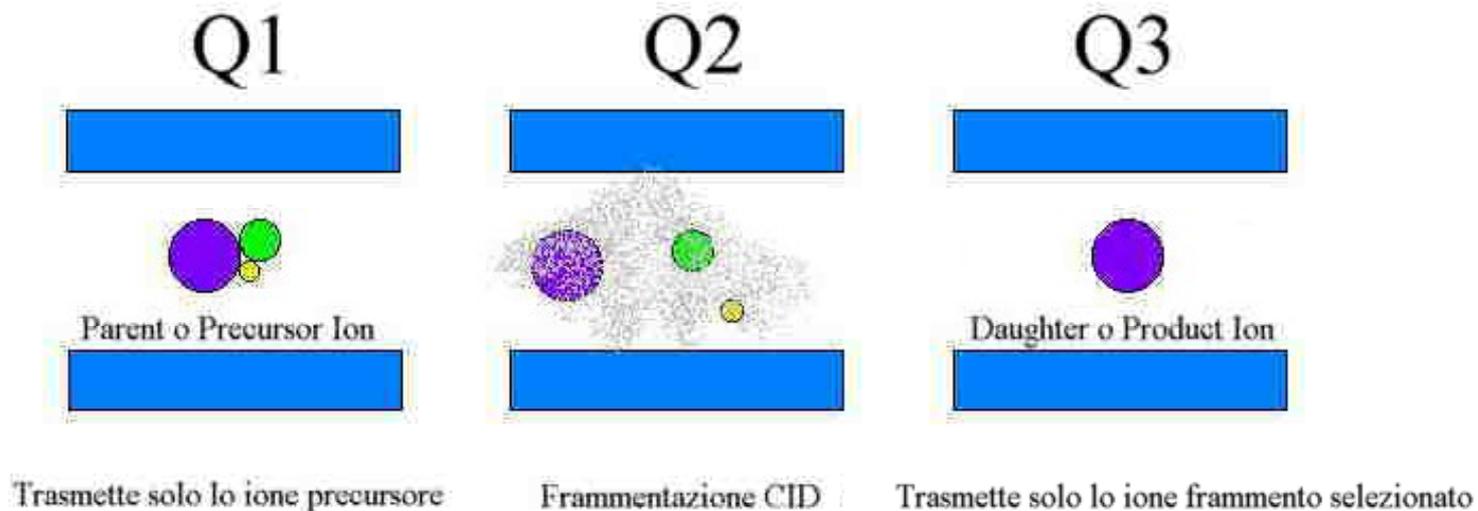
Precursor Ion Scan: nota anche come “parent ion scan”, inverte i compiti dei quadrupoli rispetto alla prima tecnica (Q_1 scan su ioni precursori, Q_3 fisso sul frammento comune), esplorando quali ioni precursori producono per scissione un particolare e specifico frammento.

Questa tecnica è utilizzata per l'identificazione di omologhi e metaboliti.



- Neutral Loss Scan: è una tecnica più raffinata della precedente che consente di esplorare con il primo quadrupolo (Q_1 in scansione) quegli ioni precursori che nella scissione possono produrre frammenti ionici con masse diverse per perdita dello stesso frammento neutro. Anche questa tecnica è utilizzata per l'identificazione di omologhi e di metaboliti.

Multi-Reaction-Monitoring (MRM): in questo caso il quadrupolo Q_1 è fisso sullo ione pseudomolecolare ed il quadrupolo Q_3 sullo ione frammento
In questa modalità, la MS-MS è utilizzata per dosaggi quantitativi come un vero e proprio detector.



In MS/MS la resa di ioni che giunge al detector è minore rispetto a quella di singolo quadrupolo per la maggior manipolazione che subiscono durante la trasmissione; tuttavia a causa della maggiore selezione ionica il rapporto S/N è senz'altro maggiore e di conseguenza la sensibilità.

Sito per la simulazione della frammentazione:

<https://cfmid.wishartlab.com>