

*Spectrometria
de masă*

Metodă analitică

Spectrometrie = înrudire cu celelalte metode

Diferențiere: - se bazează pe reacții chimice →

substanța trebuie distrusă → fragmente

Aparatul: **Spectrometru de masă**

Funcții:

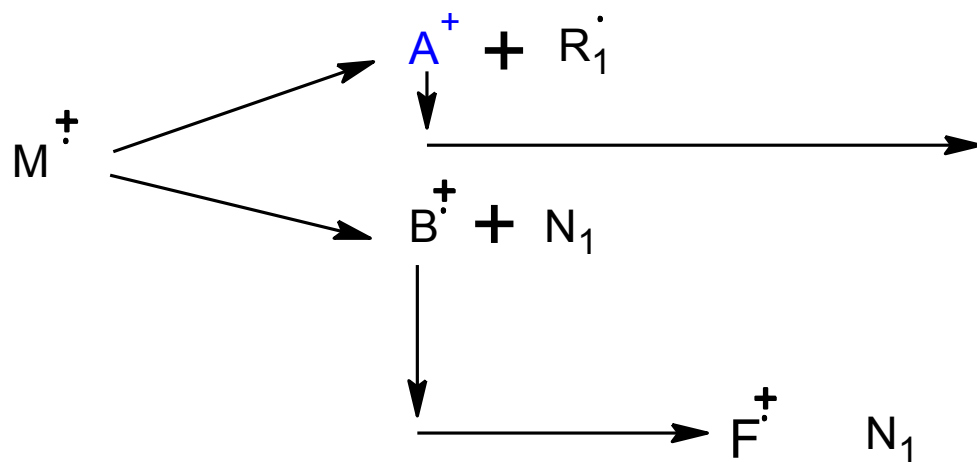
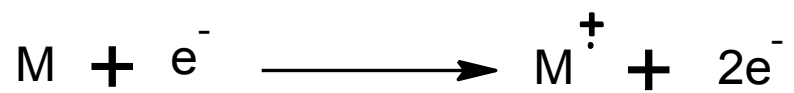
- Vaporizarea substanțelor (funcție de starea lor naturală de agregare și de volatilitate)
- Ionizarea compușilor vaporizați în vederea analizei (uneori odată cu vaporizarea se produce și ionizarea)
- Separarea ionilor în funcție de raportul m/e (de regulă se produc ioni cu o singură sarcină → separarea se va face direct în funcție masa ionilor)

Realizarea ionizării:

- bombardament cu fascicol de electroni în fază gazoasă

-energia: 10 – 70 eV (1 eV = 23,6 Kcal/mol = 96 KJ/mol)

-Energia electronilor >> energia de ionizare a compușilor organici → crește energia totală a ionului format (inclusiv energia vibrațională) → ruperea unor legături → fragmentare



Speciile ionice formate sunt separate pe baza masei lor și înregistrate. Rezultatul se prezintă sub forma unor linii (picuri) reprezentând abundența ionilor în funcție de masa lor.

Prin definiție celui mai abundent ion i se atribuie valoarea 100, restul reprezentând procente din această abundență. Acest pic este denumit

pic de bază = PB.

Picul corespunzător masei moleculare a compusului inițial (de fapt ionului molecular) este denumit

pic molecular = PM.

hen egg lysozyme

Platform II, BMB, The University of Leeds

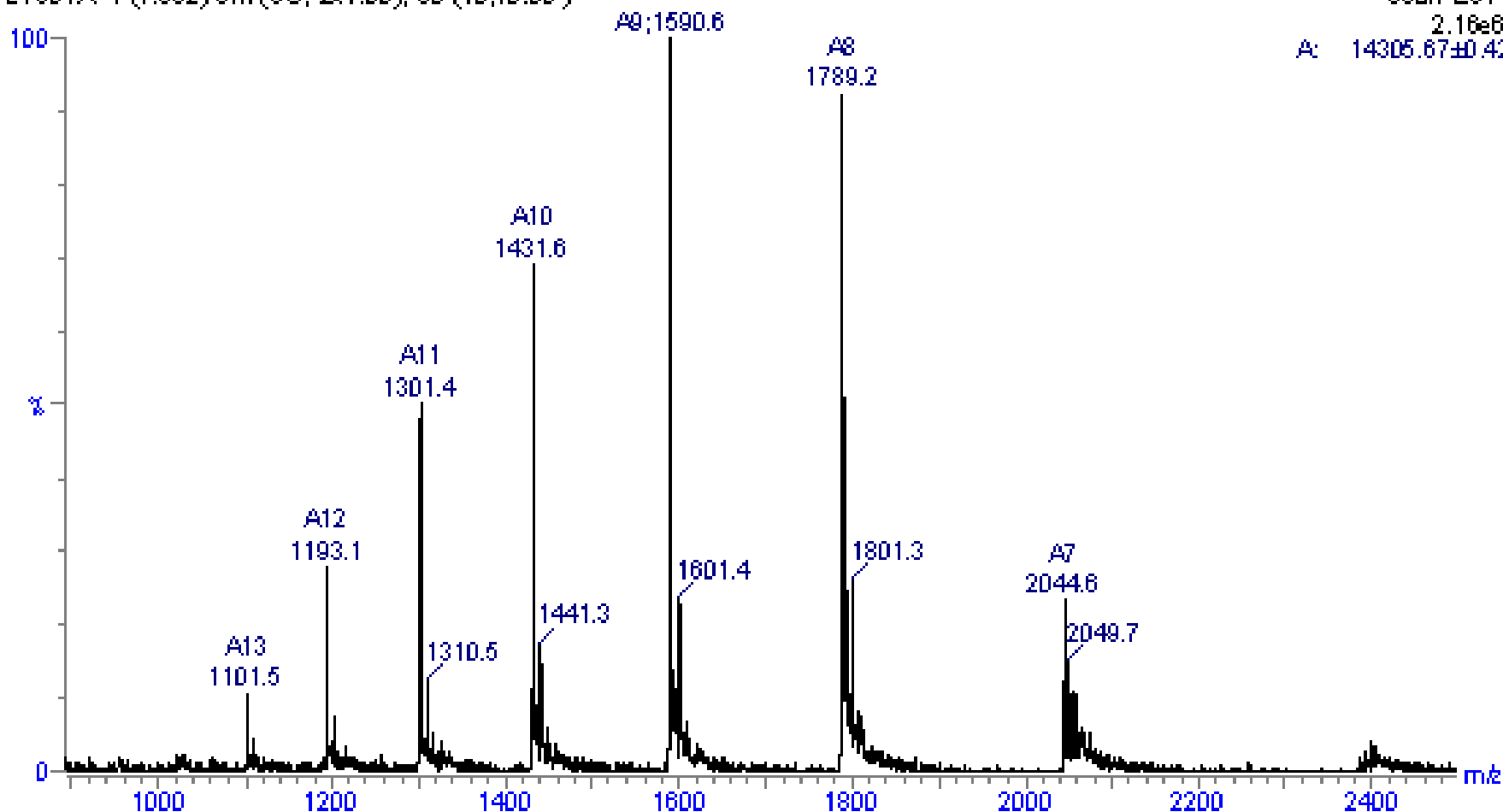
25-Jan-2000 10:00:37

LYS01A_1 (1.392) Sm (SG, 2x1.00); Sb (10,10.00)

Scan ES+

2.16e6

A: 14305.67±0.42



Producerea ionilor

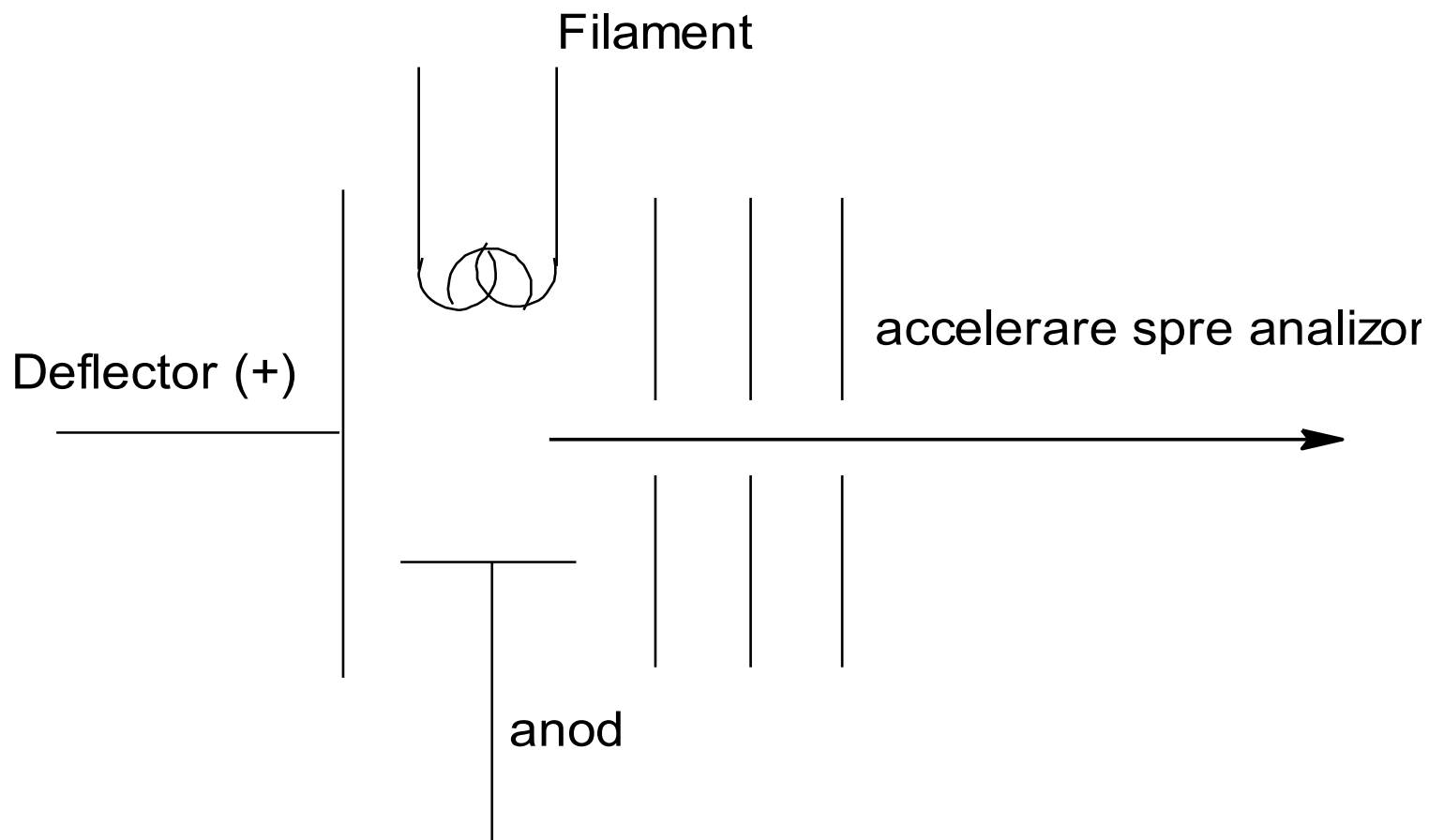
În urma procesului de ionizare rezultă particule foarte reactive care trebuie separate în funcție de masa lor.

Pentru evitarea coliziunilor și a reacțiilor posibile datorate acestora, în sistemul de generare și în analizorul care urmează este necesar vid înaintat ($\sim 10^{-6}$ mmHg)

Practic există două metode de producere a ionilor:

- **Impactul electronic**
- **Ionizarea chimică**

Impactul electronic

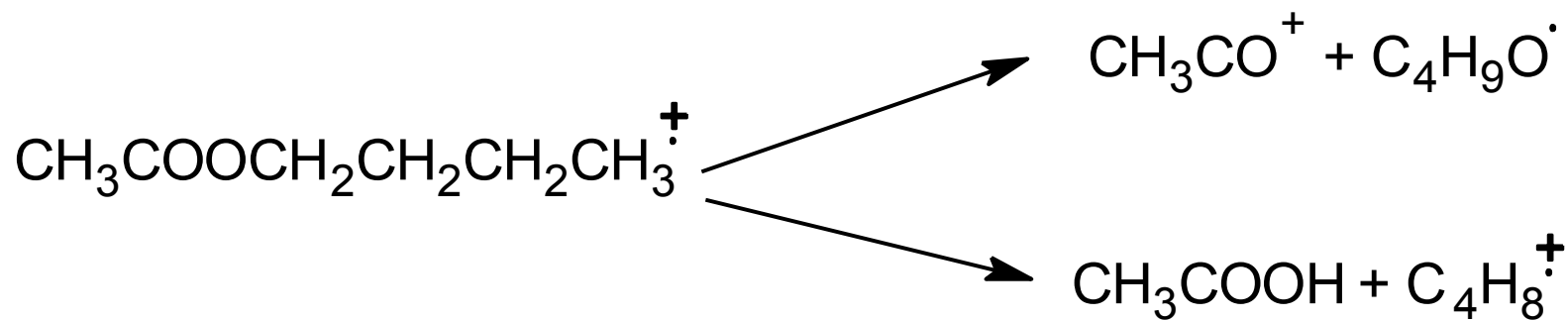


Compușii organici conțin e^- perechi în orbitali de legătură → interacțiunea cu fascicolul de electroni va determina eliminarea unui electron rezultând un radical-cation molecular.

Uneori se poate produce capturarea unui electron din fascicol pe un orbital vacant. În această situație se va obține un radical-anion molecular. Acest proces are loc cu o frecvență de 10^4 ori < practic nu prezintă interes.

Fragmentare și reacții de transpoziție

Acetatul de n-butil



Prezintă importanță doar speciile cu sarcină pozitivă, restul fiind eliminate din sistem

Avantaj:

Fragmentarea produsă determină apariția multor ioni cu mase mai mici astfel încât se poate urmări procesul de fragmentare și de aici reconstrucția structurală a moleculei. Metoda este cu atât mai utilă cu cât există deja biblioteci de fragmente astfel încât spectrul realizat se poate compara cu baza de date.

Dezavantaj:

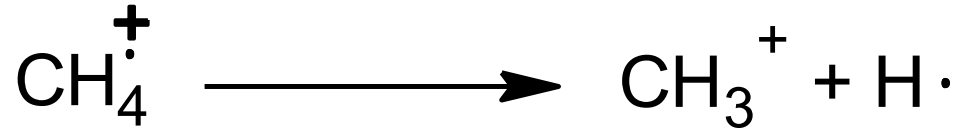
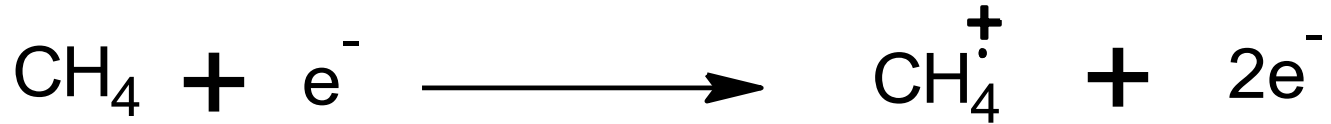
De multe ori lipsește ionul molecular, deci nu se poate determina masa moleculară. Acest lucru este datorat energiei mari implicate în bombardarea cu fascicol de electroni.

Ionizarea chimică

Rezolvă parțial dezavantajul ionizării prin impact electronic.

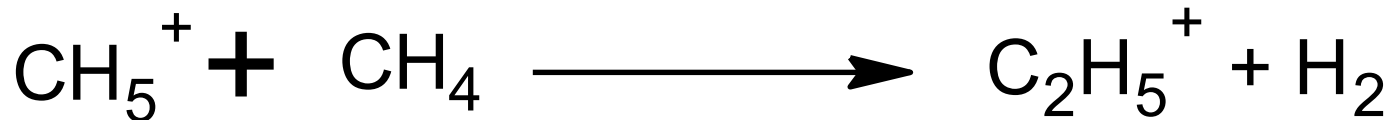
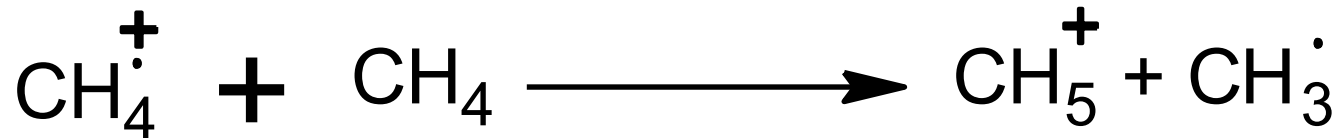
Metoda presupune utilizarea unui compus inițial care se supune impactului electronic, dar cu un fascicol de electroni cu energie mult mai mare (~ 300 eV) și presiune de aprox 1 mmHg.

Moleculele folosite în această etapă sunt dintre cele care nu se fragmentează sau a căror fragmentare este ușor de urmărit: **metan, izopropan, amoniac.**

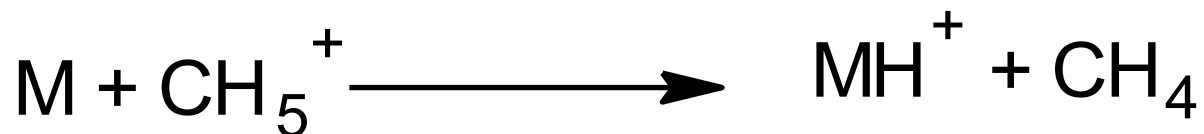


Presiunea în camera de ionizare este mai mare → coliziunile între moleculele neutre și ioni sunt mai frecvente.

În cazul metanului principalele reacții care au loc sunt:



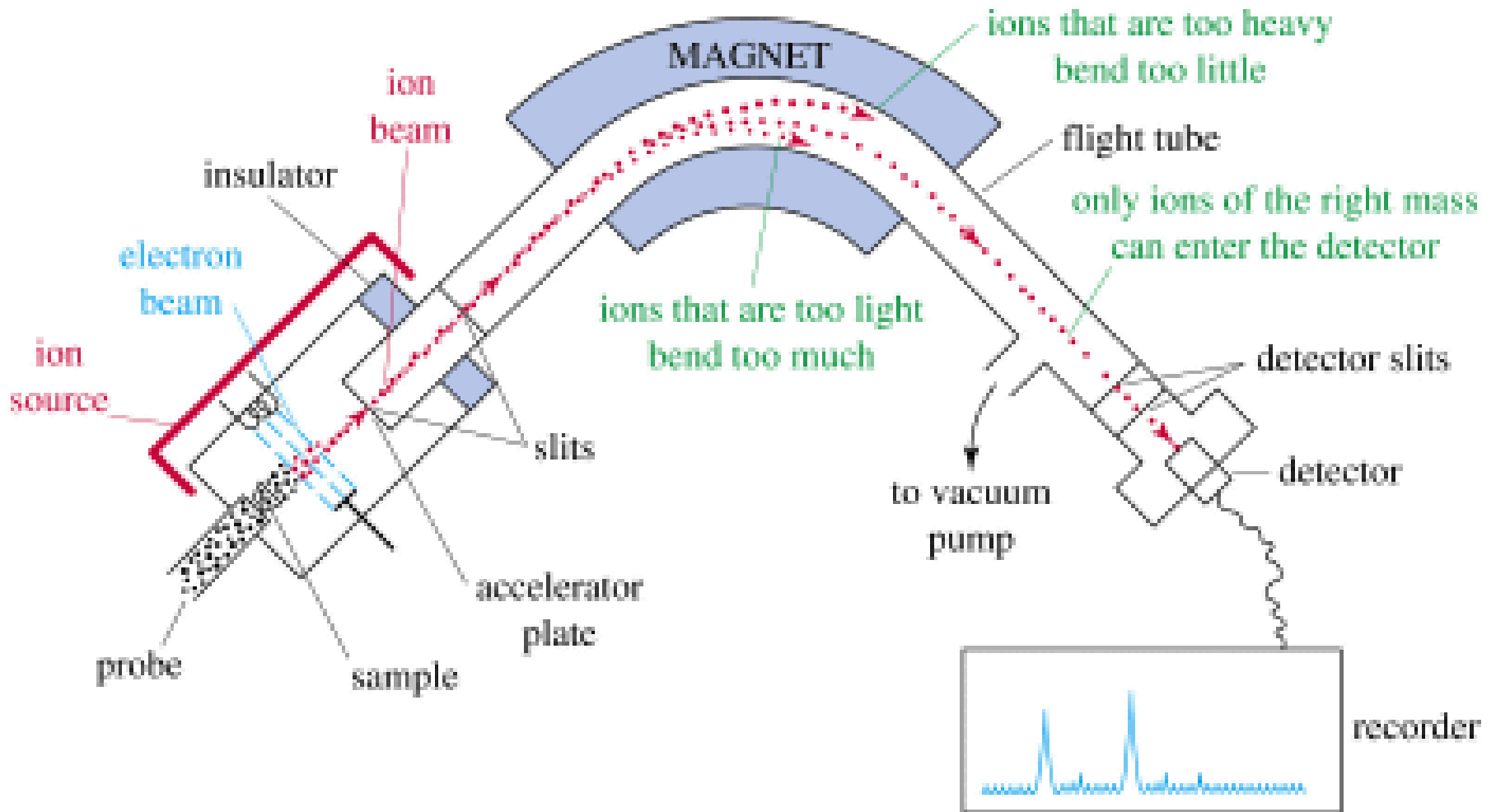
În continuare în amestecul rezultat, care conține cationul CH_5^+ și care acționează ca un **acid foarte tare**, având capacitate de protonare foarte ridicată, se introduce substanța de analizat va avea loc reacția:



Prin urmare în spectrele rezultate va apărea un semnal destul de abundent corespunzător unui raport **m/e** cu o **unitate mai mare decât masa ionului molecular**.

Deoarece energia cationilor formați inițial este foarte mare, stabilitatea lor este scăzută, iar în prezența unor molecule neutre acestea din urmă vor avea tendința de a accepta relativ ușor protonul (!!! NH_4^+).

Analizorul de ioni



Ionii pozitivi generați în camera de ionizare sunt trimiși spre analizor fiind accelerați sub o diferență de potențial U . Această diferență de potențial imprimă o mișcare caracterizată de energia cinetică E_c :

$$\frac{mv^2}{2} = eU \Rightarrow v = \sqrt{\frac{2eU}{m}}$$

Din camera de ionizare fascicolul de ioni este disipat într-un tub analizor aflat între polii unui câmp magnetic perpendicular pe direcția de deplasare. Acest fapt va determina curbarea traiectoriei cu o rază de curbură r

Forța centripetă a câmpului de intensitate H exercitată asupra unei particule este:

$$F_{cp} = evH$$

Ea este echilibrată de forța centrifugă:

$$F_c = \frac{mv^2}{r} \quad evH = \frac{mv^2}{r} \Rightarrow v = \frac{reH}{m}$$

Modificarea r pt. un raport m/e dat se poate face prin creșterea U sau scăderea H .
 r este fixă prin construcție → modificând U sau H se vor determina m/e distincte.

$$\sqrt{\frac{2eU}{m}} = \frac{reH}{m} \Rightarrow$$

$$\frac{e}{m} = \frac{r^2 H^2 e}{m^2} \Rightarrow \frac{e}{m} = \frac{2U}{r^2 H^2}$$

$$\frac{m}{e} = \frac{r^2 H^2}{2U} \Rightarrow r = \sqrt{\frac{2Um}{H^2 e}}$$

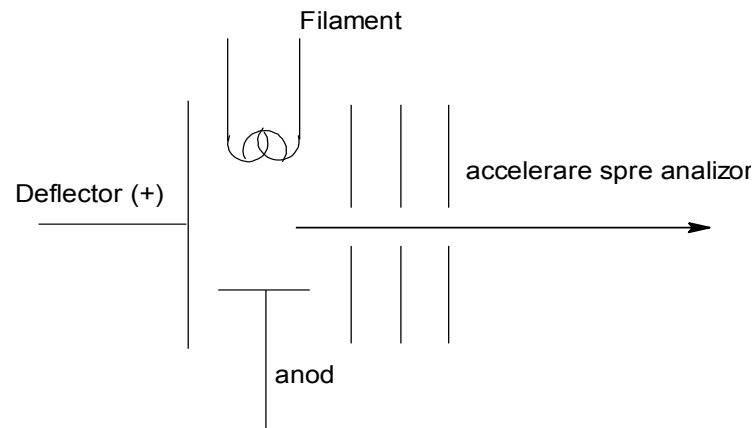
Spectrometrie de masa – ionizare, analizoare, sisteme de legătură

Met. de ionizare	Compuși tipici de analizat	Introducerea probelor	Domeniul de masă	Obs
Impact electronic (EI)	Compuși organici relativ mici și volatili	GS sau probe lichide/solide	1000 Dalton	Metodă dură, ușor aplicabilă, oferă inf. structurale
Ionizare chimică (CI)	Compuși organici relativ mici și volatili	GS sau probe lichide/solide	1000 Dalton	Metodă soft, ușor aplicabilă, oferă inf. structurale – $[M+H]^+$
Fast atomic bombardment (FAB) Liq. (Dynamic) Secondary Ion Mass Spectrom. L(D)SIMS	Carbohidrați, organometalici, peptide, comp. nevolatili	Proba captată într-o matrice vâscoasă	6000 - 10000 Dalton	Metodă soft, dar mai dură ca ESI sau MALDI
Electrospray (ESI)	Peptide, proteine, comp. nevolatili	LC sau injecție directă	200000 Dalton	Metodă soft, cu ionizare multiplă (ioni cu sarcini $>+1$)
MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption)	Peptide, proteine, nucleotide	Proba captată într-o matrice vâscoasă	500000 Dalton	Metodă soft, mase moleculare foarte mari

Impactul electronic (EI)

-Metoda tradițională - energie ridicată (~70eV) – necesită transformarea substanței în gaz (ridică probleme la nevolatile)

-Se poate pierde ionul molecular datorită fragmentărilor

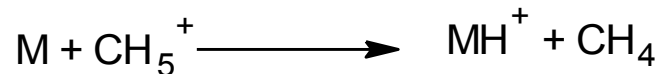
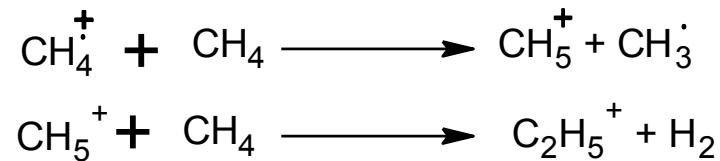


Ionizarea chimică (CI)

-Metoda presupune utilizarea unui compus inițial care se supune impactului electronic, dar cu un fascicol de electroni cu energie mult mai mare (~300 eV) și presiune de aprox 1 mmHg

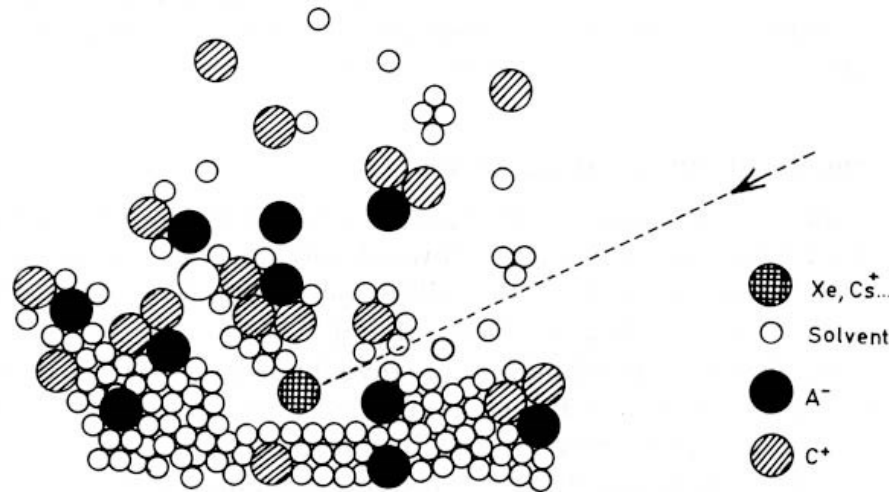
-În ciuda energiei inițiale mari, metoda este mai „soft” decât EI producând mai puține fragmente.

-Permite captarea ionului Molecular + supliment (H, NH₃, etc.)



Fast atomic bombardment (FAB) = Liq. (Dynamic) Secondary Ion Mass Spectrom. L(D)SIMS

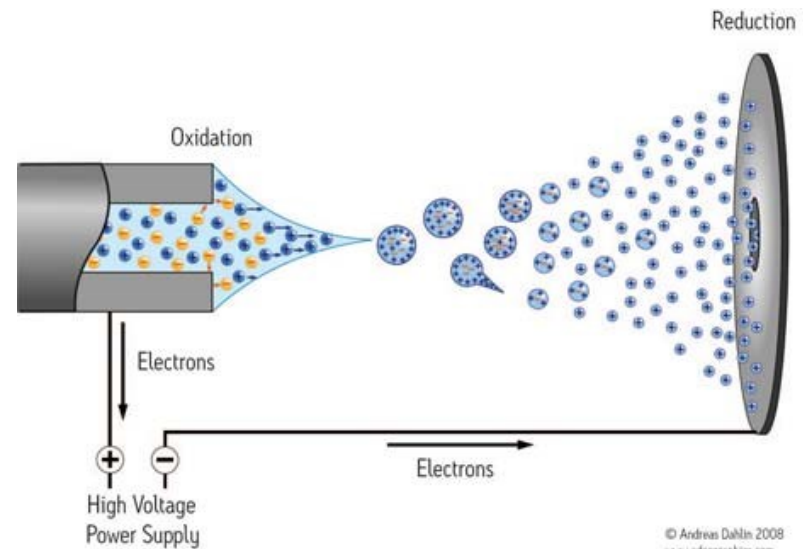
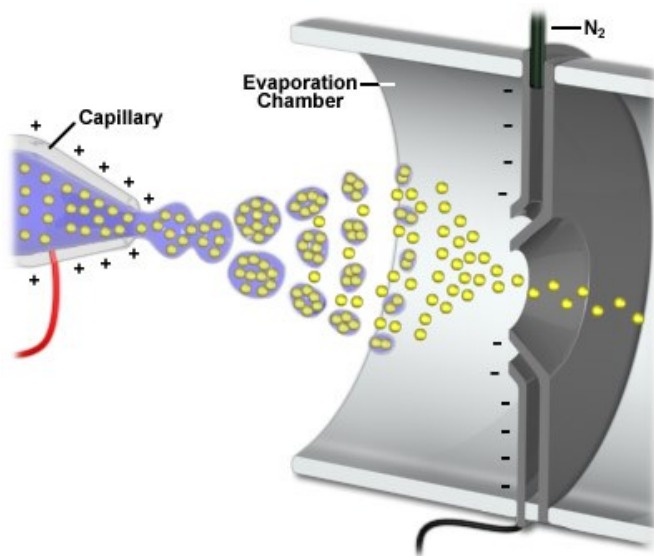
- Metodă aplicabilă substanțelor greu volatile, care nu se pot ioniza normal prin EI sau CI
- **Varianta L(D)SIMS:**
 - Proba este amestecată cu o „matrice lichidă” (de exemplu alcool 3-nitrobenzilic sau chiar glicerină) într-un mic vas din oțel inoxidabil. Se introduce vasul în camera de ionizare și se supune unui prim bombardament cu ioni de cesiu. Moleculele sunt împrăștiate de pe suprafața amestecului și trec în fază gazoasă unde sunt ionizate. (de fapt matricea lichidă asigură dispersia mai fină a particulelor probei).
- **Varianta FAB:** Variantă similară, dar primul fascicul energetic este format din xenon sau argon.



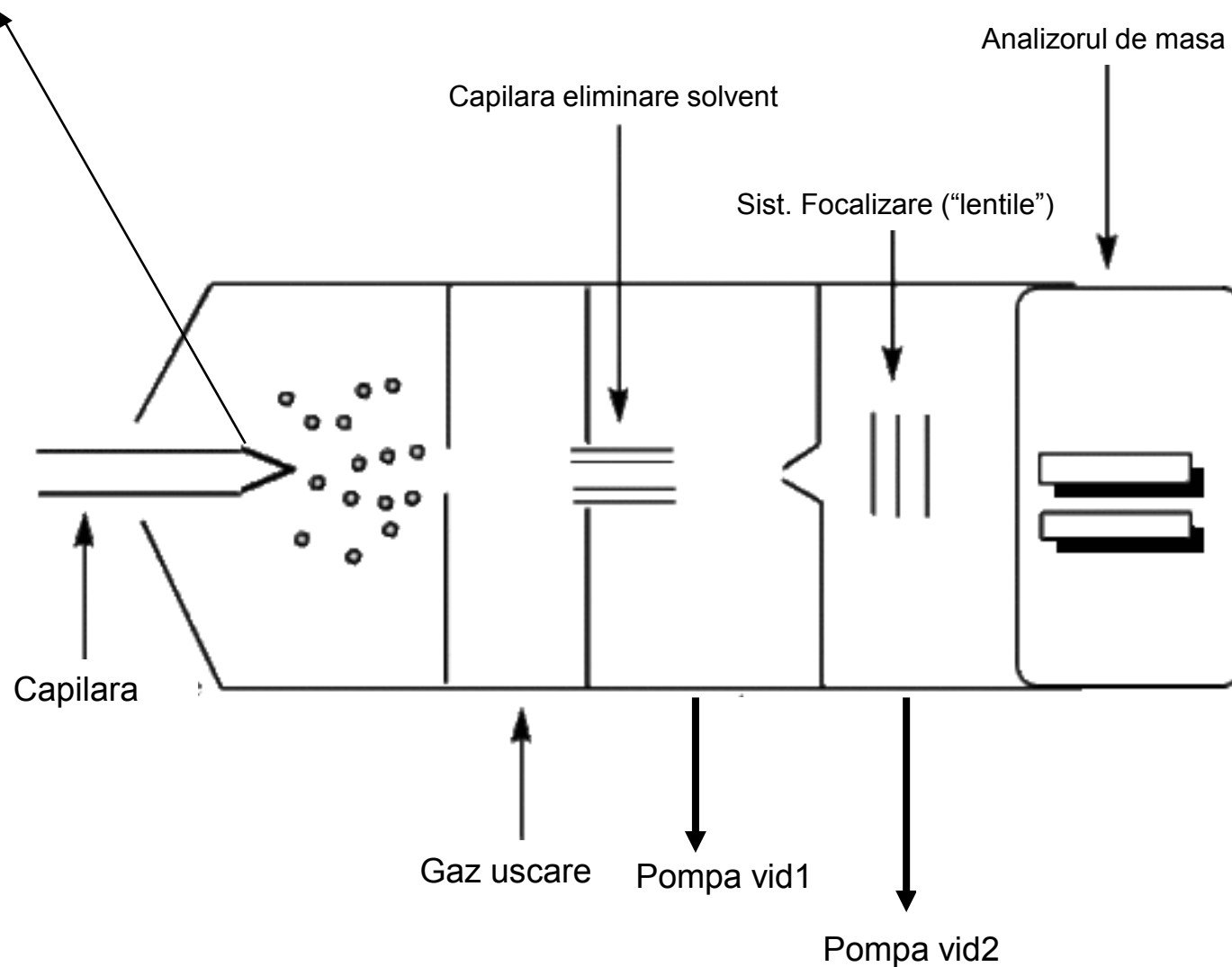
Electrospray Ionization (ESI)

John Bennet Fenn, Koichi Tanaka Premiul Nobel pt. Chimie în 2002

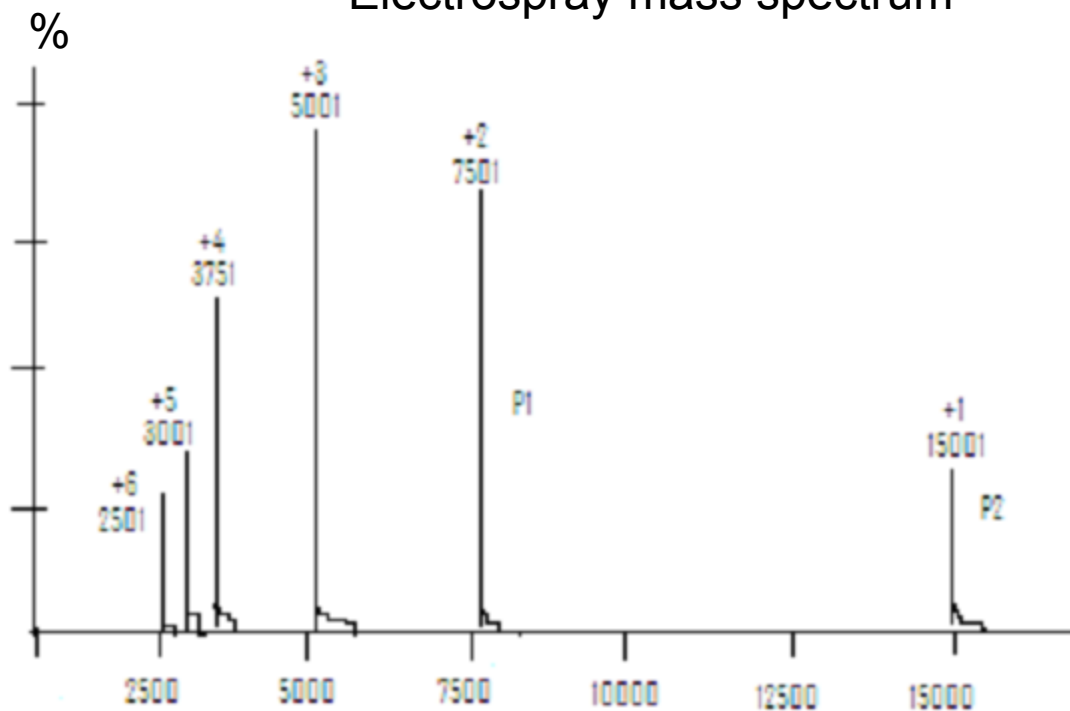
-ESI – este o metodă de ionizare soft (moale) care permite formarea ionilor molecularari (aproape exclusiv). În plus permite determinarea maselor moleculare pe baza unor probe foarte mici. De asemenea permite detecția cationilor și anionilor. Se aplică în special compușilor organici cu masă moleculară medie și mai ales moleculelor „biologice” (peptide, proteine, zaharide, ologonucleotide, etc.).



1000-4000 V (produce incarcarea particulelor)



Electrospray mass spectrum



$$p = \frac{m}{z}$$

$$p_1 = \frac{M_n + z_1}{z_1}$$

$$p_2 = \frac{M_n + (z_1 - 1)}{z_1 - 1}$$

p_1 si p_2 sunt doua picuri adiacente a caror abundenta relative se citeste pe spectru → un sistem de doua ecuatii cu doua necunoscute → M_n si z_1

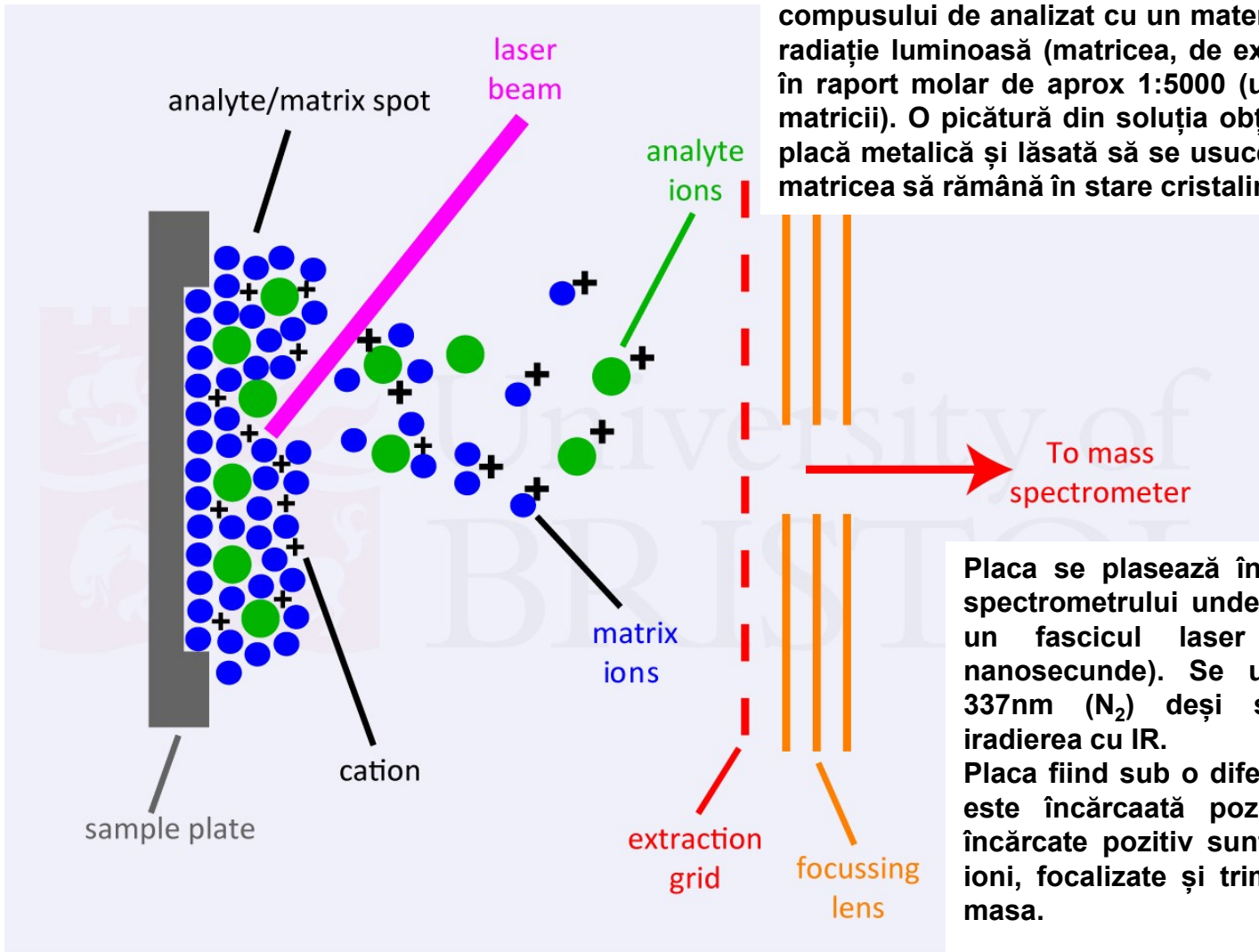
M_n = masa moleculara

- Cunoscand secventele de aminoacizi din proteinele din bazele de date se pot identifica secvente printr-o fragmentare multipla

MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption)

Este o metodă nedistructivă de vaporizare și ionizare, care poate fi folosită atât la moleculele mici cât și la biomolecule.

În această tehnică, proba este obținută prin amestecarea compusului de analizat cu un material capabil să absoarbă radiație luminoasă (matricea, de ex. Un acid organic slab) în raport molar de aprox 1:5000 (un exces foarte mare al matricii). O picătură din soluția obținută este depusă pe o placă metalică și lăsată să se usuce permițând ca proba și matricea să rămână în stare cristalină (co-cristalizare).



Placa se plasează în zona de vaporizare a spectrometrului unde este iradiată în vid cu un fascicul laser (pulsuri de câteva nanosecunde). Se utilizează un laser de 337nm (N₂) deși sunt cercetări pentru iradierea cu IR.

Placa fiind sub o diferență de potențial mare este încărcată pozitiv astfel că speciile încărcate pozitiv sunt ejectate din sursa de ioni, focalizate și trimise spre analizorul de masă.

Rolul matricii este esențial:

- 1. Asigură absorbția radiației inițiale. Aceasta este transferată probei prin interacții vibraționale astfel încât aceasta este dezagregată (fulgi) și transmisă mai departe spre focalizare. Acești fulgi conțin matrice intactă, compusul de analizat neutru și ionizat precum și specii protonate.**
- 2. Matricea previne agregarea compusului de analizat (se presupune ca astfel are rol inclusive în procesul de ionizare: transmite sarcinile probei prin procese acido-bazice sau redox)**

Mecanismul de ionizare încă este controversat existând mulți parametri care trebuie luați în considerare pentru a construi un model complet.

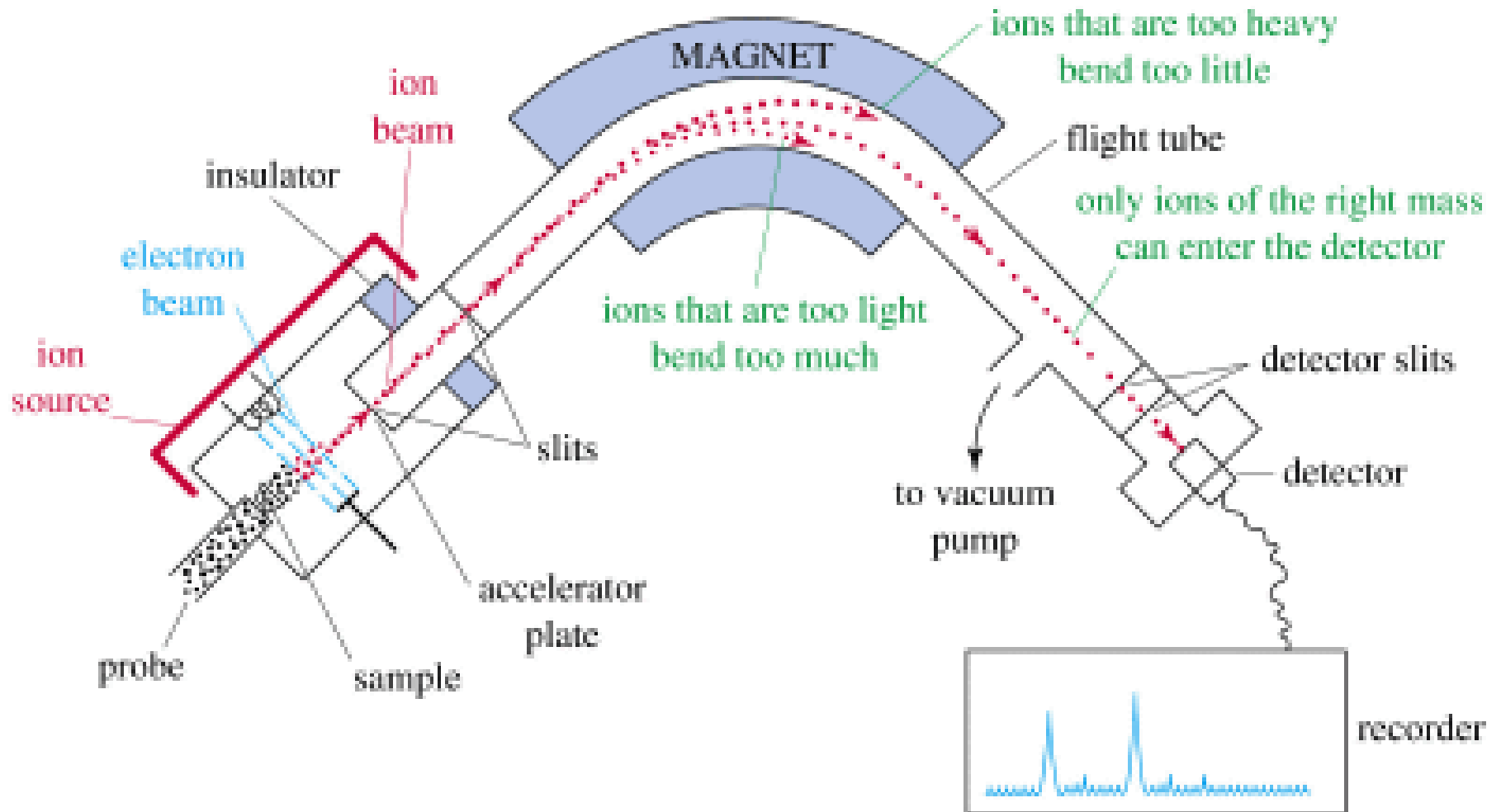
Compuși utilizați la 337 nm:

- Acid 3,5-dihidroxibenzoic; acid 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinamic; acid α -ciano-4-hidroxicinamic.**

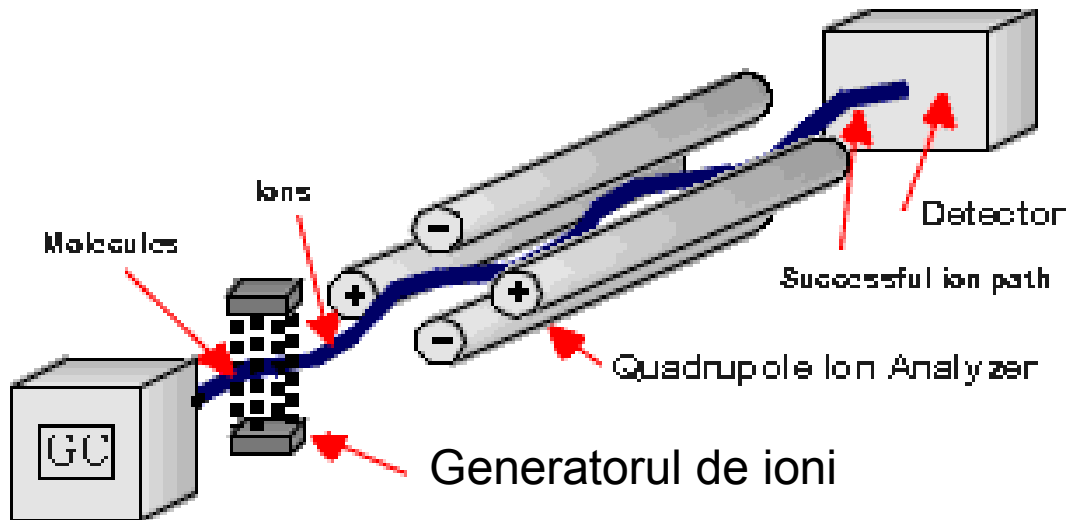
Analizoarele de masă

Analizor	Observatii
Sector (Magnetic si/sau Electrostatic)	Rezolutie inalta; masa exacta
Quadrupol (W. Paul 1989 Nobel: Ion trap)	Rezolutie la unitatea de masa, scanare rapida, cost scazut
Time-of Fly (TOF) [Timp-de-zbor]	Teoretic fara limita de m/z
Ion Cyclotron Resonance	Rezolutie foarte inalta; permite studiul chimiei ionilor

Sector (Magnetic si/sau Electrostatic): simplu sau dublu



Quadrupol

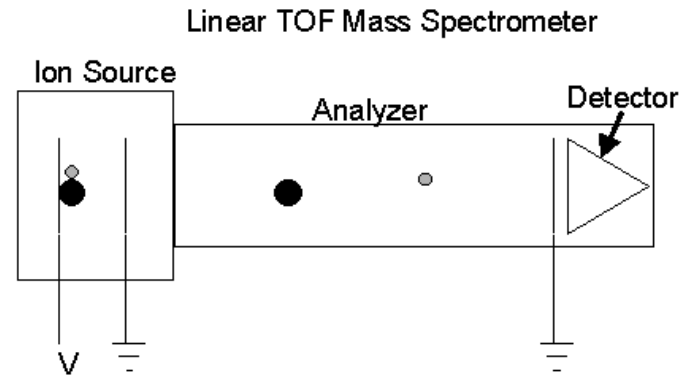


Moleculele și fragmentele neîncărcate se elimină din sistem (pompele de vid).

Analizorul quadrupolar folosește bare încărcate pozitiv și negativ pentru a controla mișcarea ionilor. Ionii traversează zona în funcție de raportul m/z (cum în multe cazuri $z=1$ rezultă dependența de masa). Separarea ionilor se face pe baza stabilității în câmpul oscilant aplicat barelor quadrupolului.

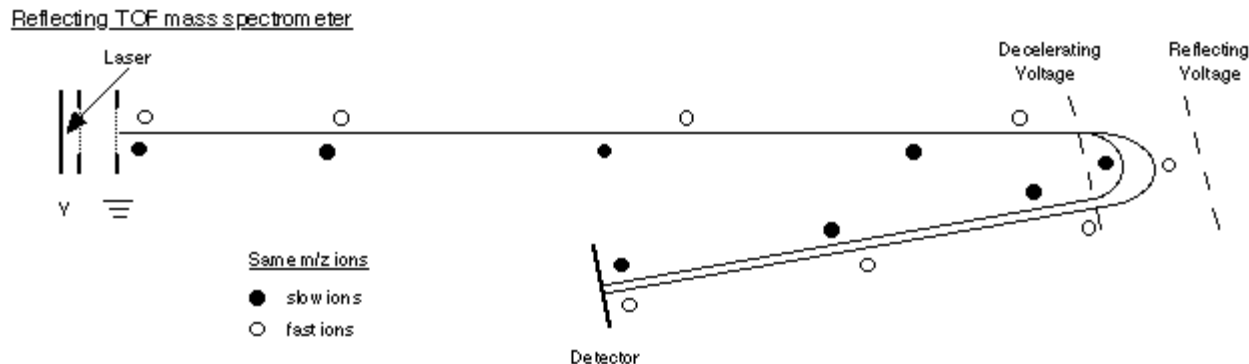
Barele quadrupolului (perechi opuse) sunt supuse alternativ unor curenți oscilanți (radiofrecvențe). Totodată se supraimpune un curent continuu. Printre bare vor trece doar acei ioni a căror m/z corespunde cu sistemul RF/dc, ceilalți vor “cădea” pe barele de current (mathematic descrierea e dată de ecuația diferențială Mathieu).

Time-of Fly (TOF) [Timp-de-zbor]

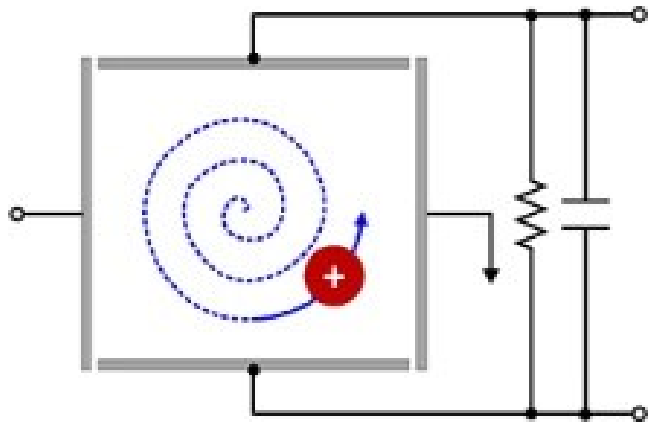


Analizorul linear TOF este varianta cea mai simplă. Se bazează pe accelerarea ionilor spre detector, toți ionii având aceeași energie (primită). Deoarece au aceeași energie, dar mase diferite, ionii ajung la detector după timpi diferiți: cu cât masa e mai mică cu atât ionul ajunge mai repede la detector. Prin urmare denumirea de TOF are la bază determinarea masei după timpul real de zbor, distanța de zbor fiind aceeași pentru toți ionii.

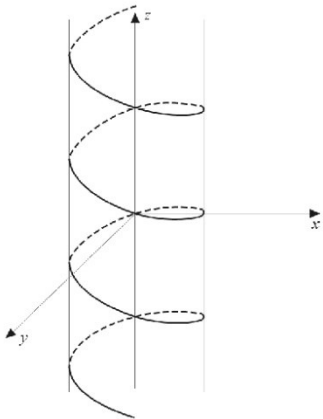
Varianta: TOF cu Reflectron → mărirea timpului de zbor cu posibilitatea separării fine a ionilor și a acumulării unei cantități mai mari de ioni



Ion Cyclotron Resonance



Suprapunerea unei miscari rectilinii perpendicularar duce la o miscare de tip elicoidal spre detector.



Un ion într-un câmp magnetic static uniform se mișcă circular datorită forței Lorenz. Viteza unghiulară

$$\omega = 2\pi\nu$$

Pentru un câmp magnetic B este dată de :

$$\omega = \frac{zeB}{m}$$

Unde z este numărul de sarcini pozitive, e este sarcina elementară iar m este masa.

$$\frac{m}{z} = \frac{eB}{2\pi\nu}$$

Un câmp electric cu frecvența ν va fi în rezonanță cu ionul caracterizat de m/z