



UNIVERSITÀ  
degli STUDI  
di CATANIA

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOLOGICHE, GEOLOGICHE E  
AMBIENTALI**

**Corso di laurea magistrale in Biologia sanitaria e cellulare-  
molecolare**

Anno accademico 2019/2020 - 1° anno - Curriculum Biologia  
cellulare e molecolare

---

## **METODI DI SPETTROMETRIA DI MASSA E DI SEPARAZIONE DI MOLECOLE ORGANICHE**

CHIM/06 - 6 CFU - 2° semestre

### **Docenti titolari dell'insegnamento**

#### **SALVATORE FOTI**

**Email:** sfoti@unict.it

**Edificio / Indirizzo:** Dipartimento di Scienze Chimiche - Viale A. Doria, 6

**Telefono:** 095 7385027

**Orario ricevimento:** da lunedì a venerdì previo appuntamento

#### **ROSARIA SALETTI**

**Email:** rsaletti@unict.it

**Edificio / Indirizzo:** Edificio 1, viale Andrea Doria, 6 95125 Catania

**Telefono:** 095 7385026

**Orario ricevimento:** Tutti i giorni previo appuntamento

---

### **OBIETTIVI FORMATIVI**

Lo scopo del corso è quello di fornire agli studenti i principi teorici e applicativi di:

- metodi cromatografici al fine di un loro utilizzo per la separazione e purificazione di composti organici;
- spettrometria di massa (MS);
- utilizzo accoppiato di tecniche separative (GC, LC) con la MS;
- uso della MS nella determinazione della struttura di composti organici.

Il laureato in BSCM, con l'insegnamento di METODI DI SPETTROMETRIA DI MASSA E DI SEPARAZIONE DI MOLECOLE ORGANICHE amplia ed approfondisce le conoscenze di base nei settori di ambito affine e integrativo, acquisite con la laurea di primo livello. Matura, inoltre, una comprensione integrata dei fenomeni biologici e una preparazione scientifica avanzata sugli aspetti relativi alle metodologie di studio chimico/biochimico.

In particolare, gli obiettivi formativi specifici di questo corso sono: comprendere i principi sui quali è basato l'isolamento di composti organici da matrici naturali anche di natura biologica, i metodi e le tecniche che si utilizzano a tale scopo, i principi che stanno alla base della caratterizzazione dei composti organici mediante la spettrometria di massa, le tecniche utilizzate per ottenere e interpretare spettri di massa e i principi dell'accoppiamento cromatografia- spettrometria di massa.

Più in dettaglio, con riferimento ai Descrittori di Dublino, questo insegnamento contribuisce ad acquisire le seguenti competenze trasversali:

#### Conoscenza e capacità di comprensione

- capacità di ragionamento induttivo e deduttivo.
- capacità di capire i principi e i metodi sui quali è basata la separazione dei composti organici.
- capacità di capire i principi e i metodi sui quali è basata l'identificazione dei composti organici mediante spettrometria di massa.

#### Capacità di applicare conoscenza

- capacità di individuare la tecnica più opportuna per isolamento di scomposti organici.
- capacità di identificare una composto organico mediante lo studio del suo spettro di massa.

#### Autonomia di giudizio

- capacità di ragionamento critico
- capacità di prevedere il risultato di una separazione cromatografica.
- capacità di prevedere il risultato dell'utilizzo di una particolare tecnica di spettrometria di massa

#### Abilità comunicative

- capacità di descrivere in forma orale, con proprietà di linguaggio e rigore terminologico il risultato di una procedura cromatografica, di spettrometria di massa o di un'analisi cromatografia/spettrometria di massa.

## **MODALITÀ DI SVOLGIMENTO DELL'INSEGNAMENTO**

Il corso prevede 6 CFU dei quali 4 di lezioni frontali e 2 di esercitazioni in aula.

## **PREREQUISITI RICHIESTI**

Conoscenza della chimica organica di base.

---

## **FREQUENZA LEZIONI**

Il regolamento del corso prevede la frequenza obbligatoria di almeno il 60 % delle ore curriculari previste per l'insegnamento (28 ore di lezioni frontali e 24 di esercitazioni).

---

## **CONTENUTI DEL CORSO**

### **CROMATOGRAFIA**

Principi teorici delle separazione cromatografica. Tempo di ritenzione e volume di ritenzione. Fattore di capacità. Selettività, risoluzione, simmetria dei picchi. Efficienza di una colonna cromatografica e piatto teorico. migrazione differenziale degli analiti e allargamento della banda cromatografica: percorsi multipli (effetto Eddy), diffusione longitudinale, trasferimento di massa in in fase mobile, fase mobile stagnante e

fase stazionaria. Equazione di Van Deemter. allargamento delle banda non dovuto alla colonna.

Classificazione delle tecniche cromatografiche:

- Cromatografia liquida di adsorbimento (liquido/solido, LS). Cromatografia liquida a pressione atmosferica su colonna (LPC) e cromatografia su strato sottile (TLC). Descrizione del sistema cromatografico a pressione atmosferica.

- cromatografia liquida ad alta prestazione su colonna (HPLC).

Caratteristiche delle fasi stazionarie utilizzate in HPLC in fase normale (liquido/solido) e in HPLC in fase inversa (RP-HPLC, liquido/liquido). descrizione del sistema cromatografico ad alte prestazioni. La valvola di iniezione del campione ("loop").

Le pompe: pompa a siringa, a pistone singolo, pompa reciprocate a doppio pistone. Smorzatori di pressione (dampers).

Fasi mobili per HPLC: proprietà fisiche, potere eluente e selettività. Preparazione della fase mobile: anidificazione, filtrazione e degasaggio. Preparazione del campione. Fase mobile e fase stazionaria. Esempi di separazione di composti organici mediante HPLC in fase normale e inversa. Ottimizzazione delle condizioni cromatografiche.

Rivelatori per cromatografia liquida. Proprietà generali: (limite di rivelazione (LOD), range dinamico lineare (LDM). Rivelatori: UV-VIs, Diode array, indice di rifrazione, fluorescenza. spettrometro di massa.

- Cromatografia ad esclusione molecolare. Principi. Fasi stazionarie e fasi mobili. esempi di separazione di biopolimeri.

- Cromatografia a scambio ionico. Principi. Fasi mobili e fasi stazionarie. esempi di separazione di composti organici. L'analizzatore di amminoacidi.

- Cromatografia di affinità. Principi. Fase mobile e fase stazionaria. Cromatografia di affinità colorante proteina per la purificazione delle proteine.

- Gas cromatografia.

Descrizione di un sistema cromatografico. Gascromatografia di adsorbimento (gas solido, GSC) e gascromatografia di ripartizione (gas liquido, GLC). Colonne capillari e impaccate. Il gas di trasporto. Fasi stazionarie solide e liquide. Scelta delle fase stazionaria.

Rivelatori per gascromatografia: conducibilità termica (TCD), a ionizzazione di fiamma (FID), a ionizzazione di fiamma alcalina, a cattura di elettroni (ECD). Spettrometro di massa

## SPETTROMETRIA DI MASSA.

Cos'è la Spettrometria di Massa. Principi del metodo. Schema a blocchi di uno strumento. Lo spettro di massa.

- Tecniche di ionizzazione e tipi di analizzatori.

La sorgente di ionizzazione per interazione elettronica (EI).

Analizzatori magnetici e potere risolutivo. Analizzatori a doppia focalizzazione (magnetici - elettrostatici). Alta risoluzione. Masse nominali, masse esatte, masse monoisotopiche, masse molecolare relative. Massa esatta e determinazione della formula molecolare.

Ione molecolare e picchi isotopici. Criteri per il riconoscimento dello ione molecolare. Informazioni deducibili dallo ione molecolare e dai picchi isotopici. Regola dell'azoto.

Ionizzazione per impatto elettronico (EI). Principi delle reazioni di frammentazione degli ioni organici e interpretazione degli spettri di massa per EI. teoria del quasi equilibrio. Classificazione delle reazioni di frammentazione. Scissione dei legami sigma e riarrangiamenti regola degli elettroni pari. Localizzazione della carica. Criteri per la valutazione dell'intensità degli ioni frammento.

Scissione dei legami sigma in molecole che non contengono gruppi funzionali. Frammentazione di composti contenenti doppi legami o eteroatomi. Scissione alfa (processo promosso dal sito radicalico). Scissione induttiva (processo promosso dal sito carico). Frammentazione dei composti ciclici. Riarrangiamenti. Frammentazioni tipiche delle più comuni classi di sostanze organiche.

- Ionizzazioni per desorbimento: ionizzazione laser assistita da matrice (MALDI). La sorgente MALDI. Principi operativi. Matrici MALDI. Preparazione del campione. Calibrazione in MALDI.

- Analizzatori a tempo di volo (TOF). Principi operativi. Miglioramento del potere risolutivo: delayed extraction e ion reflector.

- Ionizzazione per elettro-nebulizzazione (ESI). Principi operativi. Formazione e trasferimento degli ioni nella sorgente ESI.

- Ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI). Principi operativi.

- Analizzatore quadrupolare. Principi operativi.

- Analizzatore a trappola ionica. Principi operativi

- Spettrometria di massa tandem. Spettrometria di massa tandem nello spazio e nel tempo.

- accoppiamento gascromatografia/spettrometria di massa (GC/MS) e cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa/spettrometria di massa (RP-HPLC/MS).

---

## **TESTI DI RIFERIMENTO**

1. R. Cozzi, P. Protti, T. Ruaro, ANALISI CHIMICA STRUMENTALE, Zanichelli, 2001

2. J. H. Gross, MASS SPECTROMETRY- A Textbook, Springer 2011

3. F.W. McLafferty, INTERPRETATION OF MASS SPECTRA University Science Books 1980

4. K.A. Rubinson, J.F. Rubinson, Chimica analitica strumentale, 1a ed., Bologna, Zanichelli, luglio 2002. ISBN 88-08-08959-2

## **ALTRO MATERIALE DIDATTICO**

Materiale didattico fornito dai docenti reperibile su Studium

---

## PROGRAMMAZIONE DEL CORSO

Argomenti	Riferimenti testi
1 *Principi generali di spettrometria di massa. Sorgente a ionizzazione elettronica (EI). Efficienza di ionizzazione. Analizzatori a settore magnetico.	Diapositive lezioni. Gross cap 1.
2 *Risoluzione. Calibrazione dell'asse delle masse. Analizzatori a doppio fuoco. Alta risoluzione.	Diapositive lezioni. Gross cap. 2. Gross cap. 3
3 *Ione molecolare e picchi isotopici. Massa nominale, massa isotopica e massa media ponderale. Composizione isotopica dei principali elementi.	Diapositive lezioni. Gross cap. 3. McLafferty cap 2.
4 * Principi generali di frammentazione. Teoria del quasi-equilibrio. Classificazione delle reazioni di frammentazione. Frammentazione di composti che non contengono insaturazioni o eteroatomi.	Diapositive lezioni. Gross cap. 6. McLafferty cap. 4
5 * Scissione alfa. Scissione induttiva. Scissione di composti ciclici. Riarrangiamenti.	Diapositive lezioni. Gross cap. 6. McLafferty cap. 4. McLafferty cap. 8
6 * Frammentazioni tipiche delle più comuni classi di composti organici.	Diapositive lezioni. McLafferty cap. 9.
7 * Analizzatori a tempo di volo. La sorgente ESI. La sorgente di ionizzazione MALDI.	Diapositive lezioni. Gross cap. 12. Gross cap. 11.
8 *Analizzatori a quadrupolo e a trappola ionica. Spettrometria di massa tandem.	Diapositive lezioni. Gross cap 4.4 - 4.6. Gross Cap. 9.
9 *Teoria della separazione cromatografica: migrazione differenziale degli analiti. Allargamento della banda cromatografica: percorsi multipli, diffusione longitudinale, trasferimenti di massa in fase mobile, in fase mobile stagnante e in fase stazionaria.	Diapositive lezioni. Dispense fornite dal docente.
10 * Concetti di ritenzione e fattore di capacità, efficienza e piatto teorico, selettività, risoluzione, simmetria dei picchi. Equazione di Van Deemter. Allargamenti del picco cromatografico non dovuti alla colonna.	Diapositive lezioni. Dispense fornite dal docente.
11 *Classificazione delle tecniche cromatografiche: la cromatografia liquida. Cromatografia liquida su colonna a bassa (LPC) e alta pressione (HPLC). Descrizione di un sistema cromatografico a pressione atmosferica e di un cromatografo ad alta pressione.	Diapositive lezioni. Cozzi, Protti, Ruaro Cap. 14

---

12	*Il sistema di iniezione ("loop"). Le pompe: a siringa, reciprocante a singolo pistone e a doppio pistone. Smorzatori delle pulsazioni (dampers). Sistemi di mescolamento a bassa e ad alta pressione. Tipi di gradiente.	Diapositive lezioni.
13	*Gli eluenti per HPLC. Caratteristiche delle fasi stazionarie utilizzate in HPLC. Sistemi di rivelazione per cromatografia liquida; caratteristiche dei rivelatori: limite di rivelabilità (LOD), intervallo dinamico di linearità (LDR).	Diapositive lezioni.
14	*Rivelatori nella cromatografia liquida: UV-Vis, a serie di diodi, a indice di rifrazione e a fluorescenza.	Diapositive lezioni.
15	Cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase normale e inversa (RP-HPLC): principi del metodo; fasi stazionarie ed eluenti utilizzati.	Diapositive lezioni. Dispense fornite dal docente.
16	*Cromatografia ad esclusione molecolare: principi del metodo; fasi stazionarie ed eluenti utilizzati.	Cozzi, Protti, Ruaro Cap. 14
17	*Cromatografia a scambio ionico: principi del metodo; fasi stazionarie ed eluenti utilizzati.	Cozzi, Protti, Ruaro Cap. 14
18	Cromatografia di affinità: principi del metodo; fasi stazionarie ed eluenti utilizzati.	Cozzi, Protti, Ruaro Cap. 14. Dispense fornite dal docente.
19	*Gascromatografia. Il gascromatografo. Gascromatografia di adsorbimento (GSC) e di ripartizione (GLC). Colonne capillari e impaccate. Gas di trasporto.	Diapositive lezioni.
20	Fasi stazionarie solide e liquide. Criteri per la scelta della fase stazionaria. Rivelatori in gascromatografia.	Diapositive lezioni.
21	*Interfacciamento GC/MS e HPLC/MS.	Diapositive lezioni.

## VERIFICA DELL'APPRENDIMENTO

### MODALITÀ DI VERIFICA DELL'APPRENDIMENTO

L'esame di profitto consiste in una prova orale svolta mediante un colloquio fra lo studente e la commissione esaminatrice teso ad accertare il grado di apprendimento e comprensione degli argomenti contenuti nel programma del corso. In particolare, sarà valutata la pertinenza delle risposte rispetto alle domande formulate, la qualità dei contenuti, la capacità di collegamento con altri temi oggetto del programma, la capacità di riportare esempi, la proprietà di linguaggio tecnico e la capacità espressiva complessiva dello studente.

### ESEMPI DI DOMANDE E/O ESERCIZI FREQUENTI

Le domande di esame vertono su tutti gli argomenti trattati nelle lezioni.

---