



UNIVERSITÀ
degli STUDI
di CATANIA

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

**Corso di laurea magistrale in Biologia sperimentale e
applicata**

Anno accademico 2021/2022 - 1° anno - Curriculum Biologia
cellulare e molecolare

METODI DI SPETTROMETRIA DI MASSA E DI SEPARAZIONE DI MOLECOLE ORGANICHE

CHIM/06 - 6 CFU - 2° semestre

Docente titolare 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

OBIETTIVI FORMATIVI

Lo scopo dell'insegnamento 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 Biologia Sperimentale e Applicata - Curriculum Biologia Cellulare e Molecolare, 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 intergativo, acquisite con la laurea di primo livello. Matura, inoltre, una preparazione scientifica avanzata sugli aspetti relativi alle metodologie di studio chimico con particolare riferimento ai composti bioorganici e di interesse biologico.

In particolare, gli obiettivi formativi specifici di questo insegnamento sono: comprendere i principi sui quali è basato l'isolamento di composti organici da matrici sintetiche e 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 l'isolamento e la purificazione di composti organici.
- capacità di identificare un 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 1 di esercitazioni in aula. Qualora l'insegnamento venisse impartito in modalità mista o a distanza potranno essere introdotte le necessarie variazioni rispetto a quanto dichiarato in precedenza, al fine di rispettare il programma previsto e riportato nel Syllabus.

PREREQUISITI RICHIESTI

Conoscenza della chimica organica di base.

FREQUENZA LEZIONI

Il regolamento del corso prevede la frequenza obbligatoria di almeno il 70 % delle ore curriculari previste per l'insegnamento (35 ore di lezioni frontali e 12 di esercitazioni).

CONTENUTI DEL CORSO

CROMATOGRAFIA

Principi teorici della 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 fase mobile, fase mobile stagnante e

fase stazionaria. Equazione di Van Deemter. Allargamento della 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 gascromatografico. 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 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. Cenni alla teoria del quasi equilibrio. Classificazione delle reazioni di frammentazione. Scissione di 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.

Rivelazione e acquisizione.

- Ionizzazione 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 elettrobulbizzazione (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

- Analizzatore Orbitrap. 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, ELEMENTI DI CHIMICA ANALITICA STRUMENTALE, Terza edizione, Tecniche di analisi per Chimica e materiali, Zanichelli, 2020

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

3. J. H. Gross, SPETTROMETRIA DI MASSA, Edises, 2016

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

ALTRO MATERIALE DIDATTICO

Materiale didattico fornito dal docente e 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. Cozzi, Protti, Ruaro Cap. 18.
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. Cozzi, Protti, Ruaro Cap. 18

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.	Diapositive lezioni. Cozzi, Protti, Ruaro cap. 18, cap. 20
12	Cromatografia liquida ad elevate prestazioni in fase normale e inversa (RP-HPLC): principi del metodo; fasi stazionarie ed eluenti utilizzati. Descrizione di un sistema cromatografico ad alta prestazione	Diapositive lezioni. Dispense fornite dal docente.
13	*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. Cozzi, Protti, Ruaro Cap. 18
14	*Gli eluenti per HPLC. Caratteristiche delle fasi stazionarie utilizzate in HPLC. colonna in HPLC. Sistemi di rivelazione per cromatografia liquida; caratteristiche dei rivelatori: limite di rivelabilità (LOD), intervallo dinamico di linearità (LDR).	Diapositive lezioni. Cozzi, Protti, Ruaro Cap. 18
15	*Rivelatori nella cromatografia liquida: UV-Vis, a serie di diodi, a indice di rifrazione e a fluorescenza.	Diapositive lezioni.
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. Cozzi, Protti, Ruaro Cap. 21
20	Fasi stazionarie solide e liquide. Criteri per la scelta della fase stazionaria. Rivelatori in gascromatografia.	Diapositive lezioni. Cozzi, Protti, Ruaro Cap. 21
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.

La verifica dell'apprendimento potrà essere effettuata anche per via telematica, qualora le condizioni lo dovessero richiedere.

ESEMPI DI DOMANDE E/O ESERCIZI FREQUENTI

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

Sorgente ESI; analizzatori a settore magnetico ed elettrostatico; risoluzione in spettrometria di massa; ione molecolare e picchi isotopici; frammentazione di composti organici; sorgente MALDI; analizzatori a tempo di volo; analizzatori quadrupolari e a trappola ionica; spettrometria di massa tandem;

Equazione di Van Deemter; risoluzione e selettività; efficienza delle colonne cromatografiche; cromatografia liquida ad alte prestazioni; rivelatori in HPLC; gas cromatografia; colonne in gas cromatografia; rivelatori in gas cromatografia; cromatografia ad esclusione molecolare; cromatografia a scambio ionico; cromatografia di affinità.

Interfacciamento HPLC/MS e GC/MS.
