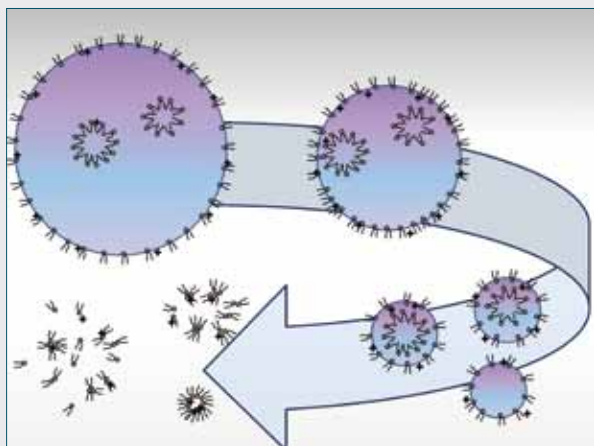


CHIMICA & SPETTROMETRIA DI MASSA



Leopoldo Ceraulo^{a,b}, David Bongiorno^{a,b},
Gianluca Giorgi^c, Serena Indelicato^{a,b},
Sergio Indelicato^d, Vincenzo Turco Liveria^a
^aDipartimento di Scienze e Tecnologie Molecolari
e Biomolecolari (STEMBIO)
Università di Palermo
^bCentro Grandi Apparecchiature-UniNetLab
Università di Palermo
^cDipartimento di Chimica
Università di Siena
^dCQRC Laboratory
A.O.U.P. "P. Giaccone"
leopoldo.ceraulo@unipa.it

MICELLE IN FASE GAS: UNA NUOVA FRONTIERA DELLA SPETTROMETRIA DI MASSA

Il presente lavoro di ricerca è stato finalizzato alla caratterizzazione strutturale e allo studio della stabilità di aggregati cationici e anionici formati dal tensioattivo bis(2-etilesil)solfosuccinato di sodio (AOTNa), il cui comportamento è stato investigato mediante esperimenti ESI-MS, MALDI-MS, ER-MS, IRMPD, IM e calcoli DFT.

L'aggregazione dei tensioattivi è stata investigata virtualmente in tutte le possibili condizioni fisiche allo scopo di acquisire le conoscenze necessarie per sviluppare le numerose applicazioni tecnologiche di questi sistemi e per controllarne il processo di auto-aggregazione in fase condensata [1, 2]. Di contro, le informazioni sui processi di auto-aggregazione e sulla struttura degli aggregati di tensioattivi in fase gas sono molto scarse. La spettrometria di massa, con l'avvento di tecniche di ionizzazioni *soft*, quali MALDI [3, 4] ed ESI [5], costituisce oggi uno dei più potenti mezzi per lo studio di aggregati non covalenti. Tuttavia in letteratura sono riportati solo pochi lavori di spettrometria di massa sul comportamento dei tensioattivi in fase gassosa, la maggior parte dei quali tratta di studi condotti su tensioattivi cationici a singola catena che risultano essere più semplici da investigare rispetto ai tensioattivi costituiti da più catene idrofobiche. In particolare, sono stati indagati tensioattivi come il decil-trimetil-ammonio bromuro o il dodecil-maltoside, che mostrano in soluzione la capacità di formare specie ioniche formalmente corrispondenti ad aggregati micellari [6-8]. Inoltre, studi condotti sul cetil-trimetil-ammonio bromuro (CTAB) hanno mostrato la capacità di questo tensioattivo di includere all'interno delle sue micelle una proteina, proteggendola nella transizione da soluzione a fase gas [9].

Riguardo l'organizzazione interna dei cluster di tensioattivi nel vuoto, è stato generalmente assunto che le strutture micellari presenti in soluzione vengano preservate nel vuoto dello spettrometro di massa senza cambiare l'orientamento delle molecole di tensioattivo. Quindi, gli aggregati carichi dei tensioattivi osservati in fase gas dovrebbero somigliare a quelli presenti in soluzione ("mirror effect"). Tuttavia i nostri studi sul tensioattivo AOTNa, nome commerciale Aerosol-OT (Fig. 1), utilizzando una tecnica di ionizzazione *soft* come l'elettrospray (ESI), hanno condotto a escludere il mirror effect [10-12].

In particolare, conducendo l'analisi di addotti tensioattivo/tensioattivo, ottenuti usando soluzioni di AOTNa in acqua:metanolo (1:1), acqua:acetonitrile (1:1) o in *n*-esano in modalità ESI(+) e ESI(-), è stato possibile osservare la formazione degli stessi aggregati macromolecolari monocarica fino a elevati valori di m/z .

Inoltre, studi condotti utilizzando la ionizzazione MALDI-ToF partendo da una dispersione del campione di AOTNa in una matrice di DHB (acido

2,3-diidrossibenzoico) [10] ad una concentrazione inferiore alla c.m.c. (concentrazione micellare critica) hanno mostrato che lo spettro di massa risulta costituito da specie $[AOT_n+Na_{n+1}]^+$ con n da 1 a 8, con un comportamento simile a quello osservato in ESI in solvente polare e apolare. I risultati ottenuti suggeriscono che i cluster formati

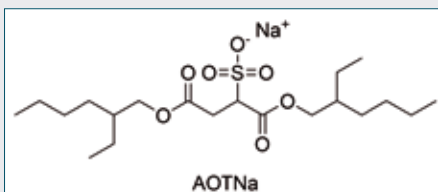


Fig. 1 - struttura AOTNa

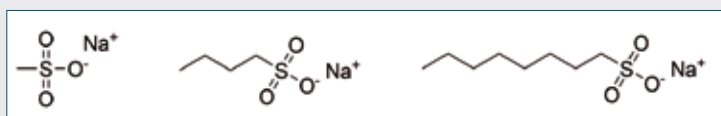


Fig. 2 - Struttura di metan sulfonato di sodio-(MS), butan sulfonato di sodio (BS) ed ottan sulfonato di sodio (OS)

con la sorgente MALDI sono indipendenti dal tipo di solvente utilizzato e dalla concentrazione di partenza del tensioattivo.

Quindi, sulla base delle nostre evidenze sperimentali, sembra ragionevole affermare che la formazione di aggregati di molecole di tensioattivi possa avvenire durante il complesso processo di evaporazione e ionizzazione. Infatti, mentre l'AOTNa in soluzione tende a formare strutture a micella diretta o inversa con l'uso rispettivamente di solventi polari e apolari, nelle nostre condizioni sperimentali, indipendentemente dal tipo di solvente utilizzato (polare o apolare) e dalla concentrazione di partenza, gli spettri ottenuti in ESI/MS e in MALDI-ToF mostrano un'elevata similarità, indicando che gli spettri ESI/MS non riflettono lo stato di aggregazione presente nella soluzione di partenza.

Per avere maggiori informazioni riguardo il processo di aggregazione dei tensioattivi nel vuoto e per comprendere se il comportamento dell'AOTNa fosse "sistema specifico" si è deciso di studiare, mediante spettrometria di massa ESI, una serie di composti anfifilici aventi un gruppo polare identico a quello dell'AOTNa (un gruppo $-SO_3Na$) ma catene idrofobiche differenti. È nota, infatti, l'influenza della lunghezza della catena alchilica e della dimensione della testa polare nella formazione di aggregati micellari in fase condensata, mentre ben poco si sa di ciò che avviene in fase gas dove, in assenza di solvente, la sola forza guida del processo di auto-aggregazione è rappresentata dalle interazioni tra molecole di tensioattivo. Gli esperimenti ESI/MS sono stati condotti sul metan sulfonato di sodio (Met- SO_3Na), butan sulfonato di sodio (But- SO_3Na) ed ottan sulfonato di sodio (Oct- SO_3Na) solubilizzati in acqua:metanolo (1:1) utilizzando uno spettrometro di massa Q-ToF Premier -Waters. (Fig. 2).

Nonostante Met SO_3Na e But SO_3Na non formino micelle in soluzione acquosa e la c.m.c. di Oct- SO_3Na in acqua (c.m.c.=0,15 M) sia più alta della concentrazione del campione utilizzato per gli esperimenti ESI/MS (0,5 mM), negli spettri in modalità ioni positivi si nota la presenza di aggregati monocationici corrispondenti a $[(RSO_3)_nNa_{n+1}]^+$ con n

sino a 22. Ciò ha evidenziato che l'assenza di un mezzo solvente determina interessanti differenze nel processo di auto-aggregazione in fase gas rispetto a quello in soluzione e che la testa polare del tensioattivo ha un ruolo determinante in questo processo mentre la lunghezza della catena alchilica ha solo un effetto secondario.

Importanti informazioni strutturali sugli aggregati ottenuti da soluzioni diluite degli alcansulfonati di sodio sono state acquisite mediante esperimenti MS/MS. I relativi spettri sono stati ottenuti selezionando come ione precursore il picco corrispondente a $[(RSO_3)_nNa_{n+1}]^+$ in modalità ESI(+) e $[(RSO)_nNa_{n-1}]^-$ in modalità ESI(-) (con n = 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12).

Per confronto gli stessi esperimenti sono stati effettuati sugli aggregati $[(AOT)_nNa_{n+1}]^+$ in modalità ioni positivi e su $[(AOT)_nNa_{n-1}]^-$ in modalità ioni negativi. Gli spettri MS/MS ottenuti sono di semplice interpretazione in quanto caratterizzati da una perdita successiva o competitiva di specie neutre $(RSO_3Na)_m$ ($1 < m < n-1$).

Ulteriori informazioni sulla stabilità degli aggregati carichi positivamente e negativamente e sulla dipendenza dal numero di aggregazione e/o dal tipo di tensioattivo sono state acquisite registrando gli spettri MS/MS in funzione dell'energia di collisione di laboratorio (CE_{lab}) ottenendo le curve di frammentazione (BC) di aggregati di Met SO_3Na , But SO_3Na , Oct SO_3Na e AOTNa a diverso numero di aggregazione (Fig. 3).

Dal valore di $CE_{lab,50\%}$ (ricavato dalle BC) corrispondente al valore di energia richiesto per avere la dissociazione del 50% della specie selezionata come precursore, è stato calcolato il valore di energia per la dissociazione riferita al centro di massa dell'aggregato ($KE_{com50\%}$).

Poiché gli aggregati sono strutturalmente simili tra loro e le condizioni sperimentali sono identiche per tutti i sistemi considerati, è possibile utilizzare il valore di $KE_{com50\%}$ come parametro di confronto della stabilità degli aggregati studiati.

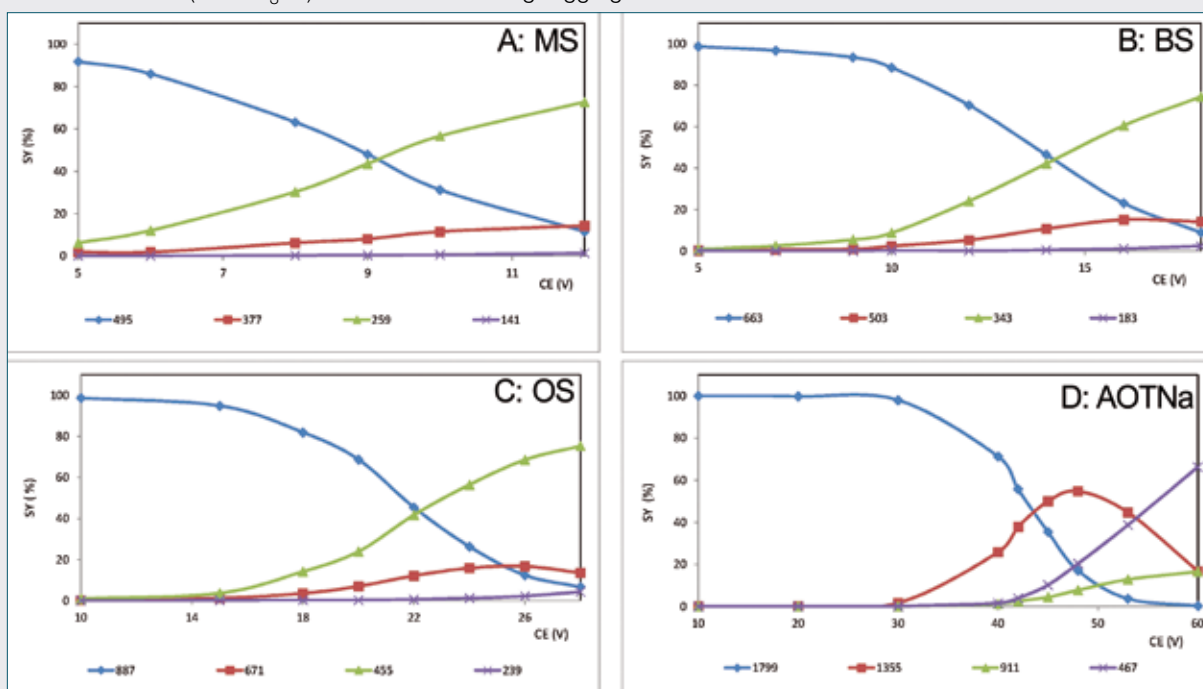


Fig. 3 - A-D: curve di frammentazione del tetramero di: A) Met SO_3Na (MS); B) But SO_3Na (BS); C) Oct SO_3Na (OS); D) AOTNa in ESI positivo

CHIMICA & SPETTROMETRIA DI MASSA

Tab. 1 - Valori di $KE_{com50\%}$ di aggregati monocarica (positivi e negativi)

Modalità di ionizzazione	n	MS	BS	OS	AOTNa	Modalità ionizzazione	n	MS	BS	OS	AotNa
ESI (+)	2	1,04	1,15	1,23	0,93	ESI (-)	2	0,90	0,85	1,02	0,84
ESI (+)	3	0,59	0,78	0,86	1,11	ESI (-)	3	0,45	0,47	0,70	0,61
ESI (+)	4	0,67	0,79	0,94	0,94	ESI (-)	4	0,42	0,41	0,71	0,42
ESI (+)	5	0,70	0,81	0,92	0,94	ESI (-)	5	0,42	0,59	0,73	0,64
ESI (+)	7	0,55	0,63	0,73	0,72	ESI (-)	7	0,46	0,46	0,60	0,46
ESI (+)	8	0,57	0,63	0,73	0,69	ESI (-)	8	-	-	-	-
ESI (+)	10	0,61	0,64	0,63	0,58	ESI (-)	10	0,42	0,41	0,65	0,42
ESI (+)	12	0,63	0,62	0,66	0,48	ESI (-)	12	-	-	-	-

Nella Tab. 1 sono riportati i valori di $KE_{com50\%}$ di aggregati monocarica (positivi e negativi), ottenuti in accordo all'equazione 1, in funzione del diverso numero di aggregazione per i diversi tensioattivi analizzati:

$$KE_{Com50\%} = CE_{Lab50\%} \times [m_n / (m_1 + m_n)] \quad (\text{eq. 1})$$

Dall'analisi dei dati si evince che per valori di $n > 6$ tutti gli aggregati convergono ad un valore costante di $KE_{Com50\%}$ pari a circa 0,6 eV (corrispondente a circa 58 kJmol⁻¹). Ciò chiaramente indica che indipendentemente dalla lunghezza della catena alchilica, la stabilità degli aggregati è comparabile e principalmente dettata dall'attrazione tra le teste polari dei tensioattivi. Sulla base di questi dati sembra ragionevole ipotizzare la formazione di aggregati in fase gas con un'organizzazione analoga a quella delle micelle inverse, la cui formazione è guidata principalmente dalle interazioni elettrostatiche tra gruppi solfonati e contro-ioni sodio.

Questa ipotesi strutturale ha trovato conferma in uno studio computazionale DFT. Tale studio ha mostrato che l'arrangiamento energeticamente favorito per l'aggregato in fase gas risulta caratterizzato da un "core polare", formato da ioni sodio e dalle teste cariche dei tensioattivi, circondato da uno strato esterno costituito dalle code alchiliche. Studi di dinamica molecolare hanno inoltre evidenziato che gli aggregati hanno la forma di ellissoide allungato mentre il core è caratterizzato da una struttura *solid-like* [13].

Indagini strutturali su aggregati di AOTNa mediante spettrometria di massa ESI e IRMPD

Recentemente Fang *et al.* [14] hanno ribadito che l'organizzazione degli aggregati di tensioattivi in fase gas è influenzata dalla polarità del solvente utilizzato nelle soluzioni di partenza, sostenendo quindi che si ottengono micelle dirette a partire da soluzioni di tensioattivi in solventi polari e micelle inverse da quelle in solventi apolari.

Dal momento che i nostri studi [15, 16] suggeriscono per l'AOTNa un comportamento differente da quanto descritto da Fang, si è deciso di investigare ulteriormente struttura e stabilità di aggregati ottenuti a partire da soluzioni di AOTNa a differente polarità, utilizzando come solventi acqua, metanolo, acqua:metanolo (1:1) e *n*-esano. Gli studi sono stati condotti mediante le tecniche ESI/MS, ESI/MS/MS, ER-MS e la spettroscopia IRMPD. Gli esperimenti ESI/MS, ESI/MS/MS, ER-MS sugli

aggregati carichi positivamente sono stati effettuati utilizzando uno spettrometro di massa Q-q-ToF Premier (Waters) con sorgente ESI (*Electrospray Ionization*), mentre gli studi IRMPD sono stati condotti presso il FOM-Institute for Plasma Physics (Rijnhuizen, Netherlands), utilizzando uno spettrometro di massa con un analizzatore ciclotronico a trasformata di Fourier dotato di una sorgente ionica electrospray (Micromass Z-spray) ed accoppiato con un laser ad infrarosso (FELIX) [17].

Gli spettri ESI/MS in modalità ioni positivi ottenuti dalle 4 soluzioni di AOTNa in diversi solventi (figura non riportata) sono qualitativamente molto simili e mostrano la presenza di aggregati monocarica di $[AOT_n, Na_{n+1}]^+$ con numero di aggregazione (n) fino a 8. L'unica differenza significativa è l'abbondanza assoluta delle specie ioniche (CIT: corrente ionica totale). Ovvero l'efficienza di ionizzazione è strettamente collegata alla natura del solvente ed in particolare si osserva una correlazione lineare tra la CIT e la costante dielettrica (ϵ) dei solventi. Per verificare se gli aggregati di AOTNa ottenuti da varie soluzioni di partenza avessero la stessa struttura sono stati registrati degli spettri ER-MS per specie selezionate aventi un numero di aggregazione compreso fra 3 e 6. Gli spettri MS/MS registrati mostrano, per tutte le specie indagate, la perdita di monomeri neutri a partire dal precursore selezionato in maniera indipendente dalla natura del solvente utilizzato. Inoltre dai dati ottenuti sono stati costruiti gli andamenti delle *Survival Yield* (SY) e delle *Yield* (Y) per gli ioni precursori selezionati e per i loro frammenti ionici in funzione dell'energia CE.

Le SY in funzione del valore di CE, per aggregati con numero di aggregazione fino a 6, risultano essere perfettamente sovrapponibili tra loro così come gli andamenti di Y ottenuti dai loro frammenti. Nella Fig. 4 si riportano le curve SY ottenute per l'esamero di AOTNa in acqua, acqua/metanolo e in *n*-esano. Strutture a micella diretta e strutture a micella inversa in fase gas, organizzate in maniera del tutto differente, sono certamente caratterizzate da stabilità molto diverse tra loro. Quindi, il fatto che gli andamenti di SY e Y sono perfettamente sovrapponibili, nell'ampio intervallo di energie di collisione applicate, indica in maniera inequivocabile che la specie indagata è la stessa indipendentemente dal tipo di aggregato presente nella soluzione di partenza e dall'effetto della polarità del solvente sulla ionizzazione ESI. Incidentalmente, questa è la prima volta che gli andamenti delle *Survival Yield*, generalmente utilizzate per ottenere informazioni sulla stabilità della specie indagata, sono stati uti-

lizzati come strumento per ottenere informazioni strutturali su aggregati supramolecolari. Analoghe conclusioni sono state ottenute da uno studio IRMPD [16] sulle specie $[AOT_3Na_4]^+$ ottenute dall'infusione di soluzioni di AOTNa in esano e in acqua/metanolo. Tutte le bande presenti negli spettri IRMPD-MS sono attribuibili ai gruppi funzionali dell'AOTNa (*stretching* del CO: 1.720 cm^{-1} , *stretching* del gruppo SO_3^- : 1.050 cm^{-1} , bande tra $1.130\text{-}1.330\text{ cm}^{-1}$ per la vibrazione di *stretching* asimmetrico del gruppo SO_3^- , lo *stretching* di C-O e C-C degli esteri e il *twisting* del CH_2). Dal momento che il gruppo carbonilico e il gruppo SO_3^- risultano essere coinvolti nelle interazioni polari che determinano la formazione dell'aggregato a micella inversa, risulta fondamentale il confronto della posizione delle bande relative a questi gruppi funzionali. Dall'analisi della posizione delle bande di *stretching* CO e del SO_3^- si ottiene una chiara conferma che questi gruppi funzionali sono disposti in modo tale da essere in stretto contatto tra loro e con i controioni sodio, in accordo con un'organizzazione a micella inversa. Inoltre non sono state osservate significative differenze spettrali tra il trimero ottenuto utilizzando acqua come solvente ESI e quello ottenuto utilizzando esano, il che indica ancora una volta, in maniera inequivocabile, che non sussiste alcun effetto memoria dell'aggregazione del tensioattivo nella soluzione di partenza.

Conclusioni

Sulla base degli studi condotti sino ad oggi, si può affermare che i tensioattivi sono in grado di formare in fase gas popolazioni stabili di aggregati non covalenti che differiscono nel numero di monomeri costituenti.

Bibliografia

- [1] J.N. Israelachvili *et al.*, *Journal Chemical Society, Faraday Trans. II*, 1976, **72**, 1525.
- [2] V. Turco Liveri, in *Nanosurface Chemistry*, M. Rosoff, M. Dekker (Ed.), NY, 2002, 473.
- [3] M. Karas, F. Hillenkamp, *Analytical Chemistry*, 1988, **60**, 2299, doi: 10.1021/ac00171a027.
- [4] K. Tanaka *et al.*, *Rapid Communication on Mass Spectrometry*, 1988, **2**, 151, doi: 10.1002/rcm.1290020802.
- [5] C.M. Whitehouse *et al.*, *Analytical Chemistry*, 1985, **57**, 675, doi: 10.1021/ac00280a023.
- [6] D. Nohara *et al.*, *Rapid Communication on Mass Spectrometry*, 1998, **12**, 1933.
- [7] D. Nohara, M. Bitoh, *Journal of Mass Spectrometry*, 2000, **35**, 1434.
- [8] L.L. Ilag *et al.*, *Journal American Chemical Society*, 2004, **126**, 14362.
- [9] M. Sharon *et al.*, *Journal American Chemical Society*, 2007, **129**, 8740.
- [10] D. Bongiorno *et al.*, *Journal of Mass Spectrometry*, 2005, **40**, 1618.
- [11] G. Giorgi *et al.*, *Journal Physical Chemistry B*, 2008, **112**, 1376.
- [12] G. Giorgi *et al.*, *Rapid Communication on Mass Spectrometry*, 2009, **23**, 1.
- [13] G. Longhi *et al.*, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2010, **12**, 4694.
- [14] Y. Fang *et al.*, *International Journal of Mass Spectrometry* 2010, **293**, 12.
- [15] D. Bongiorno *et al.*, *European Journal Mass Spectrometry*, 2010, **16**, 151.
- [16] D. Bongiorno *et al.*, *Journal Mass Spectrometry*, 2011, **46**, 1262.
- [17] G. Giorgi *et al.*, *Journal Physical Chemistry B*, 2011, **115**, 2282.

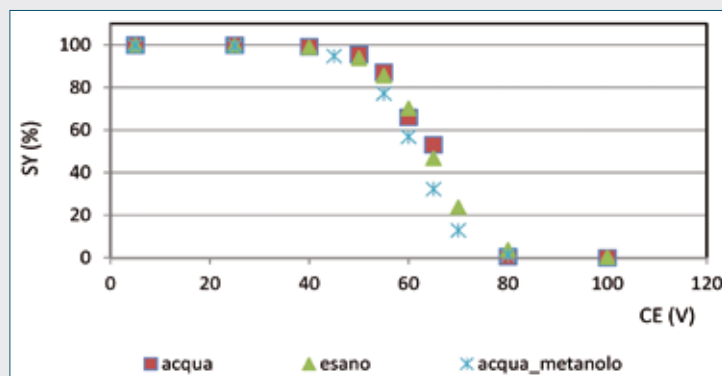


Fig. 4 - SY curves per l'esamero di AOTNa in acqua, acqua/metanolo e in n-esano

Negli spettri di massa dell'AOT registrati in full scan non sono stati mai riscontrati picchi attribuibili a specie solvate né in modalità ESI(+) né in ESI(-), questo perché le interazioni tensioattivo/tensioattivo sono molto più forti di quelle tensioattivo/solvente. Gli esperimenti ER/MS e IRMPD accompagnati da calcoli DFT hanno permesso di ipotizzare che le strutture formate siano costituite da aggregati con un *core* costituito dalle teste polari mentre le catene alchiliche si estendono verso l'esterno e, in funzione del loro ingombro sterico, controllano la crescita dimensionale dell'aggregato stesso. Studi preliminari hanno evidenziato la capacità di questi aggregati micellari carichi di intrappolare molecole polari e anfifiliche ospiti aprendo la strada alla possibilità di realizzare nuovi nanoreattori per sintesi chimiche specializzate e carrier supramolecolari in fase gas.

ABSTRACT

Micelles in the Gas-phase: a New Frontier for Mass Spectrometry

The main goal of our researches is to characterize the structure and the stability of surfactant aggregates (positively and negatively charged) formed by bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate sodium (AOTNa), using different mass spectrometry techniques (ESI, MALDI, Infrared Multiple Photon Dissociation-MS, Ion Mobility) and DFT calculations.