

CHIMICA ANALITICA II CON LABORATORIO

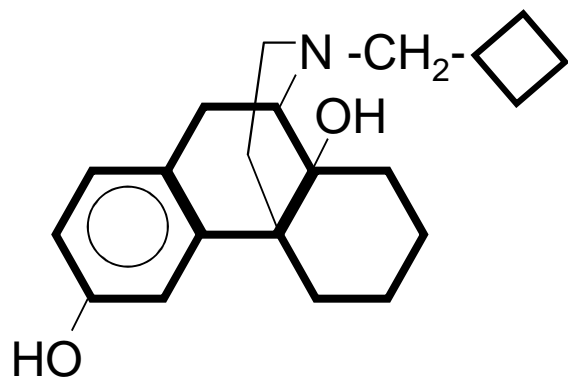
(AA 2016-17)

8 C.F.U. - Laurea triennale in Chimica

MS Principles

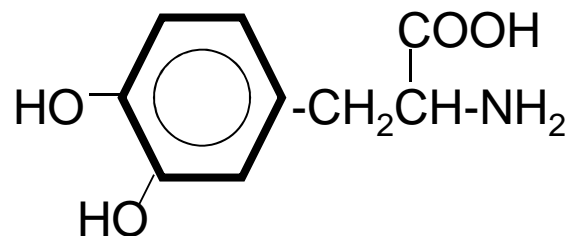
- Different chemical species can be uniquely identified by their mass

Butorphanol



MW = 327.1

L-dopa



MW = 197.2

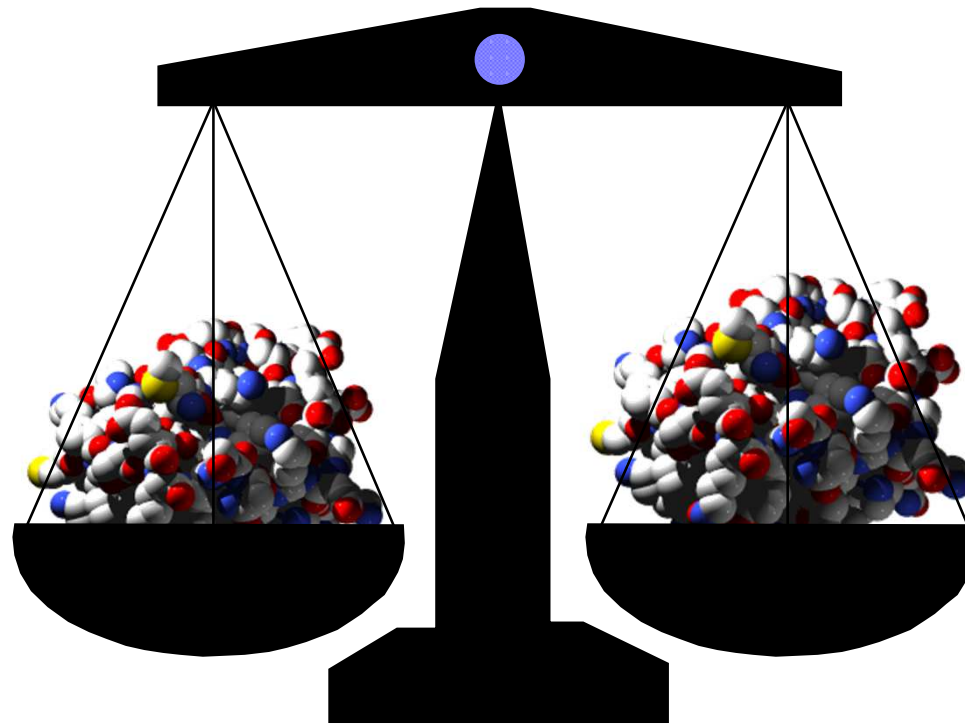
Ethanol



MW = 46.1

Mass Spectrometry

- Analytical method to measure the molecular or atomic weight of samples



MS History

- **JJ Thomson built MS prototype to measure m/z of electron, awarded Nobel Prize in 1906**
- **MS concept first put into practice by Francis Aston, a physicist working in Cambridge England in 1919**
- **Designed to measure mass of elements**
- **Aston Awarded Nobel Prize in 1922**

MS History

- 1948-52 - Time of Flight (TOF) mass analyzers introduced
- 1955 - Quadrupole ion filters introduced by W. Paul, also invents the ion trap in 1983 (wins 1989 Nobel Prize)
- 1968 - Tandem mass spectrometer appears
- Mass spectrometers are now one of the **MOST POWERFUL ANALYTIC TOOLS IN CHEMISTRY**

- La spettrometria di massa è una metodica che consente l'identificazione e l'analisi quantitativa di una molecola dalla sua massa.
- Si sfruttano due fenomeni correlati alla massa ed alla carica.
 - 1) la traiettoria di uno ione o di una particella carica in movimento può essere modificata per azione di un campo magnetico od elettrico, e l'entità della deviazione è funzione del rapporto massa/carica della particella: a parità di carica, particelle di massa minore subiranno deviazione maggiore.
 - 2) ioni o particelle cariche, accelerati da un campo elettrico, assumono velocità diverse in dipendenza della loro massa: a parità di carica, particelle di massa maggiore assumono velocità minore.

- Gli spettrometri di massa di prima generazione sfruttavano unicamente il primo fenomeno; attualmente sono disponibili strumenti che si basano sul primo o sul secondo fenomeno.
 - Spettrometria di massa atomica (analisi qualitativa e quantitativa di *sostanze inorganiche*).
 - Spettrometria di massa molecolare per l'analisi di *sostanze organiche*.
 - Attualmente la spettrometria di massa costituisce una metodica largamente diffusa per lo studio di *molecole e macromolecole di interesse biologico*, quali amminoacidi, glicidi, lipidi, proteine ed acidi nucleici.

- Gli spettrometri di massa di prima generazione sfruttavano unicamente il primo fenomeno; attualmente sono disponibili strumenti che si basano sul primo o sul secondo fenomeno.
 - Spettrometria di massa atomica (analisi qualitativa e quantitativa di *sostanze inorganiche*).
 - Spettrometria di massa molecolare per l'analisi di *sostanze organiche*.
 - Attualmente la spettrometria di massa costituisce una metodica largamente diffusa per lo studio di *molecole e macromolecole di interesse biologico*, quali amminoacidi, glicidi, lipidi, proteine ed acidi nucleici.

Uno spettrometro di massa separa gli atomi o le molecole secondo uno dei principi indicati, ma per poter essere separati atomi e molecole devono avere una carica, devono cioè essere ionizzate. Inoltre, devono essere allo stato gassoso.

Tappe fondamentali del processo d'analisi:

- 1. ionizzazione delle molecole in esame, cioè la trasformazione in uno o più ioni, in genere con carica positiva;
- 2. accelerazione degli ioni per immissione in un campo elettrico;
- 3. separazione degli ioni con massa diversa;
- 4. rivelazione dei diversi ioni formati e la conseguente determinazione della loro massa.

SPETTROMETRO DI MASSA

Componenti fondamentali:

1. camera di ionizzazione per produrre ioni;
2. un campo elettrico per accelerare gli ioni prodotti;
3. un analizzatore di massa, che utilizzando un campo magnetico e/o un campo elettrico, separa gli ioni di massa diversa;
4. un rivelatore, che raccoglie gli ioni generando un impulso quantificabile e registrabile.



La **formazione di ioni di campione in fase gassosa** è un pre-requisito essenziale per i processi di separazione e di rivelazione tipici in uno spettrometro di massa.

Originariamente gli spettrometri di massa richiedevano **il campione in fase gassosa**, ma grazie agli sviluppi più recenti, l'applicabilità della spettrometria di massa è stata estesa fino a includere anche campioni **in fase liquida** o inglobati **in una matrice solida**.

Il campione, che può essere solido, liquido o gassoso, viene introdotto in una **camera da vuoto** mediante un opportuno sistema di introduzione. In dipendenza del tipo di sistema di introduzione e della tecnica di ionizzazione utilizzata, il campione può già esistere in forma ionica in soluzione, oppure esso può essere ionizzato di concerto con la sua volatilizzazione o mediante altri metodi nella sorgente ionica. Gli ioni prodotti, che si trovano in fase gassosa, vengono separati nell'analizzatore sulla base del loro rapporto massa/carica (m/z), e vengono raccolti da un rivelatore. Nel rivelatore essi generano un segnale elettrico proporzionale al numero di ioni presenti. Il sistema di elaborazione dati registra questi segnali elettrici in funzione del rapporto m/z e li converte in uno spettro di massa.

Modalità di ionizzazione

Sono state sviluppate nel tempo **diverse modalità di ionizzazione**, che rappresentano il principale elemento di differenziazione tra le varie metodiche e tra le diverse strumentazioni attualmente impiegate.

La sorgente di ionizzazione al plasma trova applicazione essenzialmente nella **spettrometria di massa atomica**, le altre metodiche nella **spettrometria molecolare**, e si possono suddividere in tecniche hard e soft.

Principali modalità di ionizzazione

Ionizzazione al plasma	ICP	Inductively Coupled Plasma
Impatto elettronico	EI	Electronic Impact
Ionizzazione chimica	CI	Chemical Ionization
Desorbimento di ioni	FAB - FIB	Fast Atom/Ion Bombardament
	PD	Plasma Desorption
	MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
Evaporazione ionica	TSI	Thermo Spray Ionization
	ESI	Electro Spray Ionization
	APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization

ANALIZZATORI DI MASSA

- Gli *analizzatori di massa* hanno la funzione di separare ioni di massa diversa utilizzando un campo magnetico e/o campo elettrico.
- A seconda della modalità con la quale esplicano la funzione si distinguono in analizzatori:
 - - a **Settore magnetico**;
 - - a **Tempo di volo (TOF)**;
 - - a **Quadruplo**;
 - - a **Trappola ionica**;
 - - a **Risonanza ciclotronica ionica in trasformata di Fourier FT-ICR**.
 - - **Orbitrap**

□ Non esiste un analizzatore di massa adatto per tutte le applicazioni possibili, e la scelta dipende dal tipo di analisi che si effettua, tenendo conto che i vari analizzatori differiscono tra loro principalmente per:

- **il massimo rapporto m/z misurabile;**
- **il potere risolutivo;**
- **la sensibilità (nmoli e pmoli);**
- **la velocità di analisi;**
- **la facile utilizzazione se lo spettrometro è interfacciato ad un altro apparecchio (HPLC, GC, EC).**

Per quanto riguarda il *potere risolutivo* è da premettere, che in uno spettro di massa, due picchi adiacenti di intensità simile si considerano separati se l'altezza **h** della valle tra di loro è minore del 10% dell'altezza **H** del picco maggiore.

□ Il potere risolutivo (**R**) è quindi la capacità di separare due picchi di massa diversa:

$$R = m_2 / (m_2 - m_1)$$

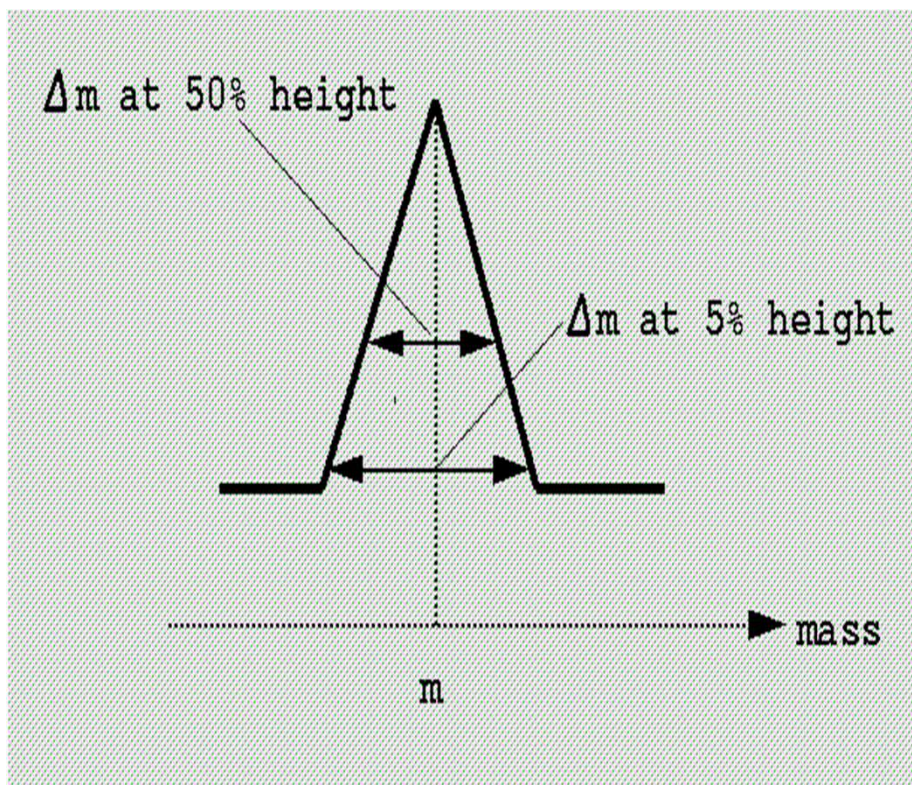
dove m_2 è il valore m/z maggiore, m_1 quello minore.

□ Gli analizzatori si considerano a *bassa risoluzione* se R è inferiore a 5.000 e ad *alta risoluzione* se R è superiore a 5.000.

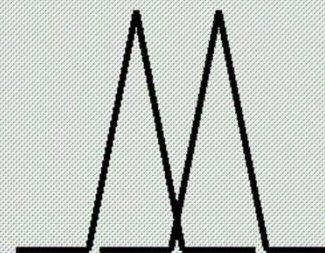
What is Resolution?

- **Resolution is the ability to separate ions of nearly equal mass/charge**
 - e.g. $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$ and $\text{C}_6\text{H}_5\text{OF}$ @ 112 m/z
 - $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl} = 112.00798$ amu (all ^{12}C , ^{35}Cl , ^1H)
 - $\text{C}_6\text{H}_5\text{OF} = 112.03244$ amu (all ^{12}C , ^{16}O , ^1H , ^{19}F)
 - Resolving power >4700 required to resolve these two
- **Two definitions**
 - Resolution = $\Delta m/m$ ($0.024/112.03 = 0.00022$ or 2.2×10^{-4})
 - **Resolving power = $m/\Delta m$ ($112.03/0.024 = 4668$)**

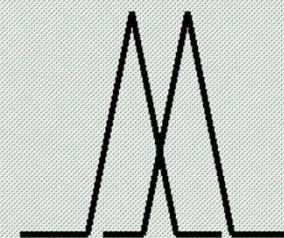
Resolution in MS



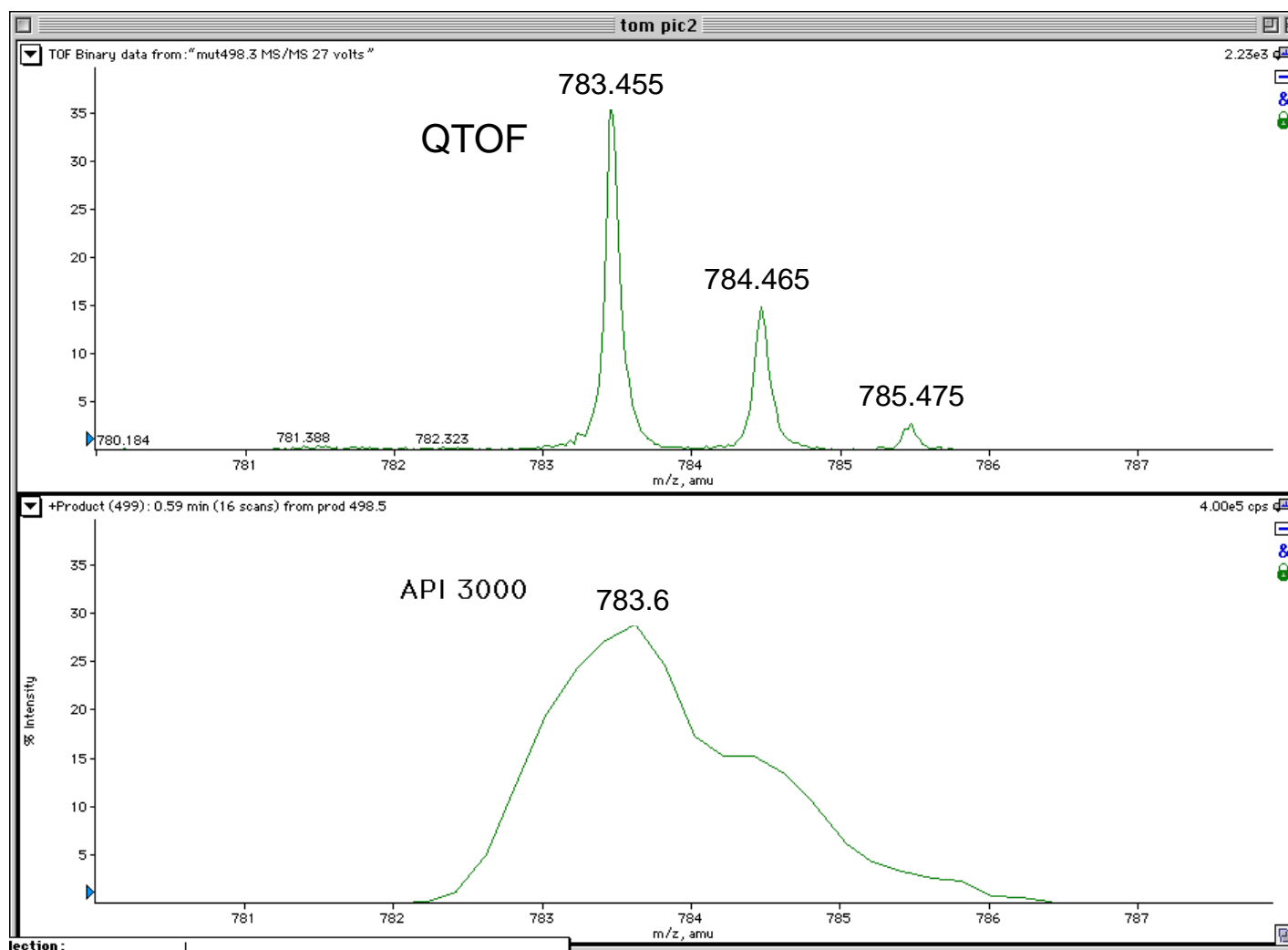
Two peaks resolved to 10% valley



Two peaks resolved to 50% valley

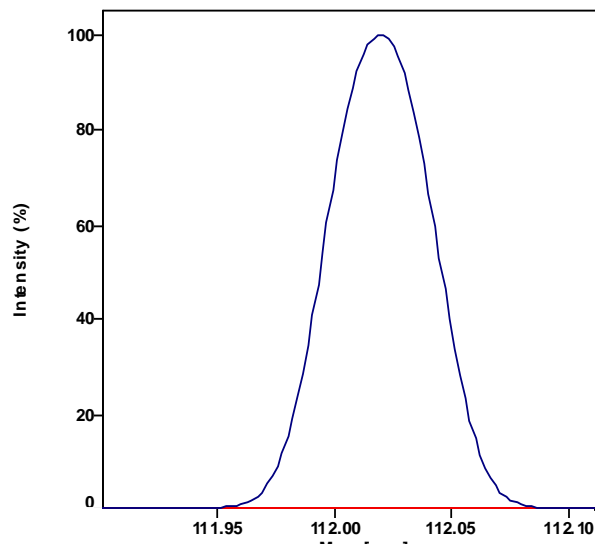


Resolution in MS

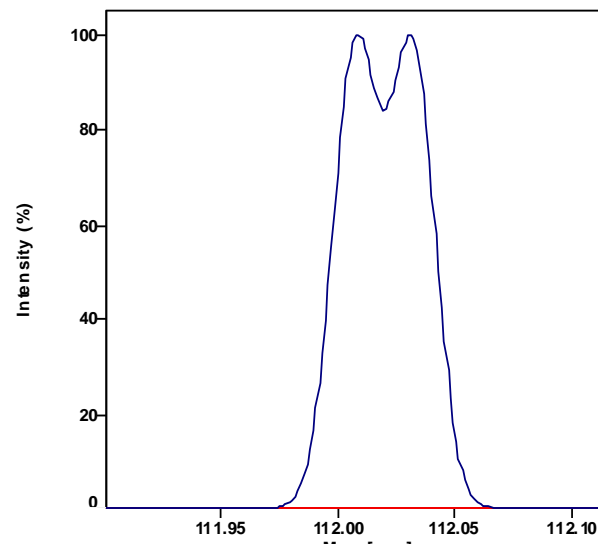


Resolving Power Example

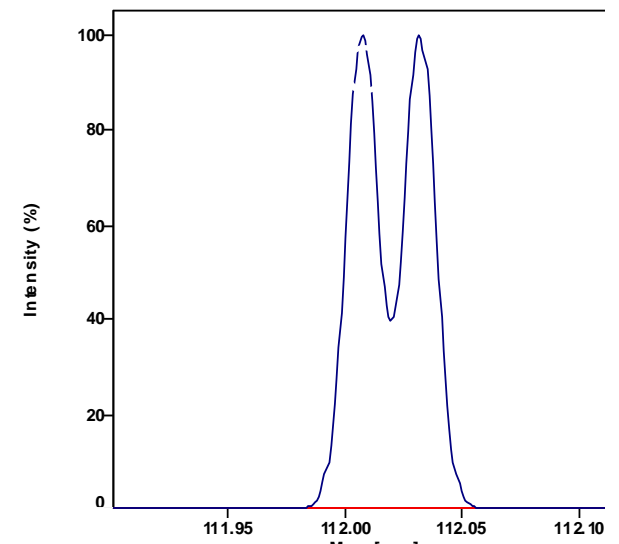
RP= 3,000



RP= 5,000



RP= 7,000



All resolving powers are FWHM

Mass Accuracy

- **MSF reports mass accuracy as a relative value**
 - ppm = parts per million (1 ppm = 0.0001%)
 - 5 ppm @ mass 300 = $300 * (5/10^6) = \pm 0.0015$ Da
- **High resolving power facilitates precise mass measurements**
 - Accurate mass spectrometry is used to confirm a molecular formula
- **Walk-up instruments in the MSF should be treated as “nominal mass” accuracy**
 - +/- 0.15 Da mass accuracy

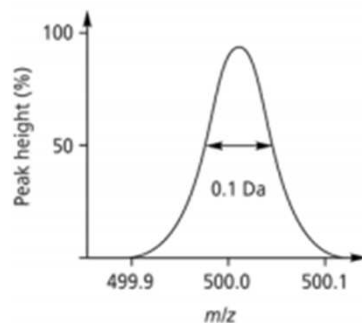
All'aumentare del potere risolutivo dell'analizzatore aumenta l'**accuratezza** della misura che indica di quanto il valore di massa ottenuto o **massa misurata** si discosta dal valore reale o **massa reale**, indica cioè l'ampiezza dell'errore insito nella misurazione.

□ L'accuratezza si indica per convenzione come l'*inverso* del potere risolutivo, e si ricava dall'espressione $(m_2 - m_1)/m_2$, considerando m_2 il valore di massa esatta e m_1 il valore di massa misurata. Il risultato di questo rapporto viene moltiplicato per 10⁶ per esprimere l'ampiezza dell'errore in ppm (parti per milione = mg per litro).

L'accuratezza dipende da molteplici fattori connessi alle metodiche seguite nell'analisi per la ionizzazione, la rilevazione, l'acquisizione dei dati, che possono influire singolarmente o congiuntamente sul risultato finale.

□ Per determinare l'accuratezza di un'analisi si effettua per ogni serie di analisi eseguite nello stesso contesto sperimentale, va effettuata una calibrazione con una molecola di cui si conosce la massa esatta.

True mass = 400.0000
 Measured mass = 400.0020
 Difference = 0.0020 or 2 mmu
 Error = $\frac{0.002}{400} \times 10^6 = 5 \text{ ppm}$



Mass = 500
 Peak width (at 50%) = 0.1
 Resolution (FWHM) = $\frac{500}{0.1} = 5000$

Figure 1. (Top) Mass accuracy determination and (bottom) the FWHM method for determining resolution for a mass spectrometer measured at a given ion.

Table I. A comparison of leading higher resolution mass spectrometers (adapted from reference 1)

	Resolution (FWHM)	Mass Range (m/z)	Mass Accuracy (ppm)	Price (\$ typical range comparison)
TOF			2-5 typical	200K – 250K
Waters LCT Premier	10,000	18,000		
Agilent LC/MSD TOF	10,000	7000		
Bruker MicroTOF	10,000	3000		
QTOF			Same as TOF	300K – 700K (450K typical)
Waters QTOF Ultima	17,500	32,000		
Waters QTOF Micro	5000	20,000		
MDS Sciex Qstar XL	10,000	40,000 (TOF) 20,000 (Q)		
FT-MS				
Bruker BioTOF	20,000	10,000		
ICR (FT-MS)				500K – 1.4M
Bruker Apex IV	100,000	66,000	<1 ppm	
Ion Spec	1,300,000	18,000	1 ppm	
Thermo LTQ FT	500,000	2000	2 ppm	