

CHIMICA ANALITICA II CON LABORATORIO

(AA 2015-16)

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

COMPITO (scadenza 15/12/2016)

Identificazione di procedura analitica

Gli studenti, organizzati nei gruppi identificati per le attività sperimentali, identifichino le procedure analitiche per determinare presenza e concentrazione degli analiti nelle matrici assegnate, indicando pretrattamento, separazione analitica (identificando possibilmente almeno LOD atteso e intervallo di linearità del metodo), eventuali metodi alternativi (da non descrivere in dettaglio), bibliografia consultata e di riferimento, eventuali osservazioni. Si raccomanda nella stesura sintesi ed accuratezza.

| gruppo | analita | matrice | pretrattamento | separazione analitica | alternative | componenti maggiori della matrice | osservazioni | bibliografia |
|--------|-------------------------|-----------------------|----------------|-----------------------|-------------|-----------------------------------|--------------|--------------|
| 1 | aflatossine | cereali | | | | | | |
| 2 | diossine e furani | suoli | | | | | | |
| 3 | IPA | PM10 | | | | | | |
| 4 | PFOA-PFAS | Acque di falda | | | | | | |
| 5 | DSP e PSP | mitili | | | | | | |
| 6 | farmaci | fanghi di depurazione | | | | | | |
| 7 | composti solforati | petroli greggi | | | | | | |
| 7b | pesticidi carbammici | agrumi | | | | | | |
| 8 | edulcoranti artificiali | bibite | | | | | | |
| 9 | E104, E110, E124 | alimenti | | | | | | |

La **spettrometria di massa** è una tecnica analitica che si basa sulla

- generazione di ioni gassosi dalle molecole (o atomi) di analita
- separazione di ioni secondo il rapporto massa/carica (m/z)
- rivelazione di ioni

Le differenze tra i tipi di spettrometro di massa consistono nei diversi modi per svolgere queste tre funzioni

- Lo *spettro di massa* è un diagramma della relativa abbondanza degli ioni in funzione del loro rapporto massa carica

Jürgen H. Gross

Mass Spectrometry

A Textbook

With 357 Illustrations and Tables

http://www.dmf.unicatt.it/~gavioli/corsi/MSFM/ref/Vuoto+Camere/Books/Mass_Spectrometry.pdf

Strumentazione

Tecniche di ionizzazione

EI, CI

FAB

MALDI

ESI

Etc.

Analisi della massa

Strumenti a settore magnetico

Trappole ioniche quadrupolari

Analizzatori a tempo di volo

FT-ICR, orbitrap

| Type | Resolving Power (FWHM) |
|--|------------------------|
| FT-ICR-MS | 1,000,000 |
| FT-Orbitrap | 100,000 |
| High-Res-TOF | 60,000 |
| TOF | 10,000 |
| Quadrupole / IonTrap in UltraZoom mode | 10,000 |
| Quadrupole / Iontrap | 1,000 |

Sistemi di introduzione del campione

attraverso un sistema cromatografico

GC-MS

LC-MS

su sonda direttamente nella sorgente di ionizzazione, etc

Tecniche di ionizzazione

Dure e morbide

Dure: un quantitativo rilevante di energia è trasferito allo ione analita durante il processo di ionizzazione, generando verosimilmente reazioni di dissociazione molecolare (es. EI)

Morbide (soft) generano una frammentazione limitata e fornendo quindi informazione sulla massa molecolare. Si possono classificare in base al modo in cui il campione è inserito nello spettrometro. I diversi metodi di ionizzazione soft generano gli stessi tipi di ioni: molecole “cationizzate”, come risultato dell’attacco di uno ione H^+ o NH_4^+ nella **modalità a ione positivo**, o molecole “anionizzate” nella **modalità a ione negativo**. Gli ioni più importanti generati sono rispettivamente $[M + H]^+$ e $[M - H]^-$

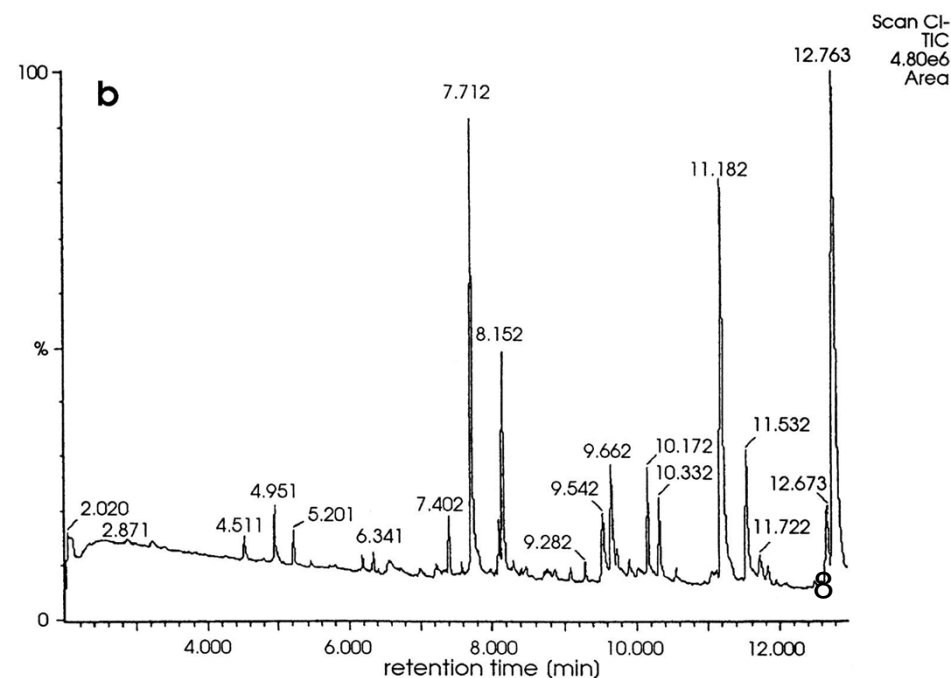
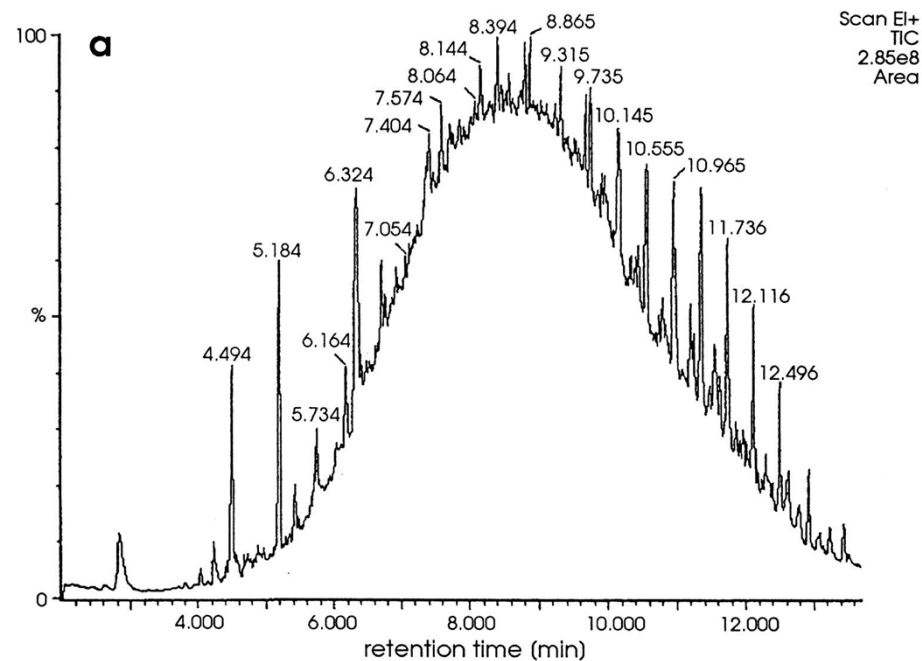
NB: anche *associative ionization* – aka Hornbeck-Molnar process.

Ionizzazione chimica (CI)

Gli analiti sono ionizzati da reazioni ione-molecola in fase gassosa. Per ottenere ciò un **gas reagente (di solito metano, iso-butano, ammoniaca o acqua)** è inserito nella sorgente di ioni a **P relativamente alta (1-250 Pa)** e **gli ioni gassosi reagenti sono prodotti per impatto ionico**. Le molecole di analita sono ionizzate indirettamente attraverso una serie di reazioni con il gas reagente, attraverso il quale solo un piccolo quantitativo di energia è trasferito alle molecole tramite collisioni. Questa ionizzazione soft genera una minore frammentazione e quindi un maggior quantitativo di ione molecolare rispetto all'EI, ma anche una minor informazione strutturale.

La dipendenza degli spettri CI dalle condizioni sperimentali (es. pressione della sorgente ionica) rende difficile comparare spettri tratti da strumenti diversi o con librerie.

- Figure 26.2.** Demonstration of the selectivity that can be achieved by (negative ion) chemical ionization versus (positive ion) electron impact ionization for the analysis of a **soil extract for polychlorinated biphenyls**. (a) Total ion chromatogram (TIC) in EI mode where the huge interferences from the complex matrix are evident: (b) TIC of the same extract in methane-Cl with negative ion detection. Chromatographic conditions: Injector temperature: 250 ° C, Injection volume: 1 ml (splitless), Column: DB 5 ms, 15 m ; 0.25 mm ; 0.25 um, Carrier gas: He (0.3 bar), Oven program: 60 ° C (1 min → 20 ° C/min → 280 ° C (10 min), Scan range: 34-450 amu, Source temperature: EI 250 ° C; CI 140 ° C



Altre tecniche di ionizzazione soft

Spesso impiegati per analiti con elevata polarità e/o massa

Fast atom bombardment (FAB): l'analita è disciolto in una matrice di solvente non volatile (es. glicerolo); la soluzione è depositata come film omogeneo su un supporto metallico. Il supporto è posto nella sorgente ionica a vuoto elevato e bombardato con particelle a 8 keV (atomi di Ar o Xe). Si ha formazione di ioni in fase gassosa in prossimità dell'interfase, ma anche sulla matrice prima dell'evaporazione/desorbimento.

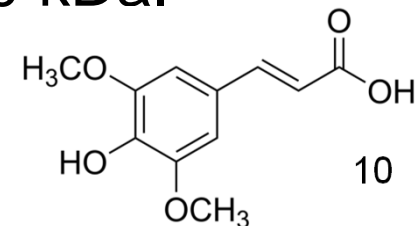
Altre tecniche di ionizzazione soft

Spesso impiegati per analiti con elevata polarità e/o massa

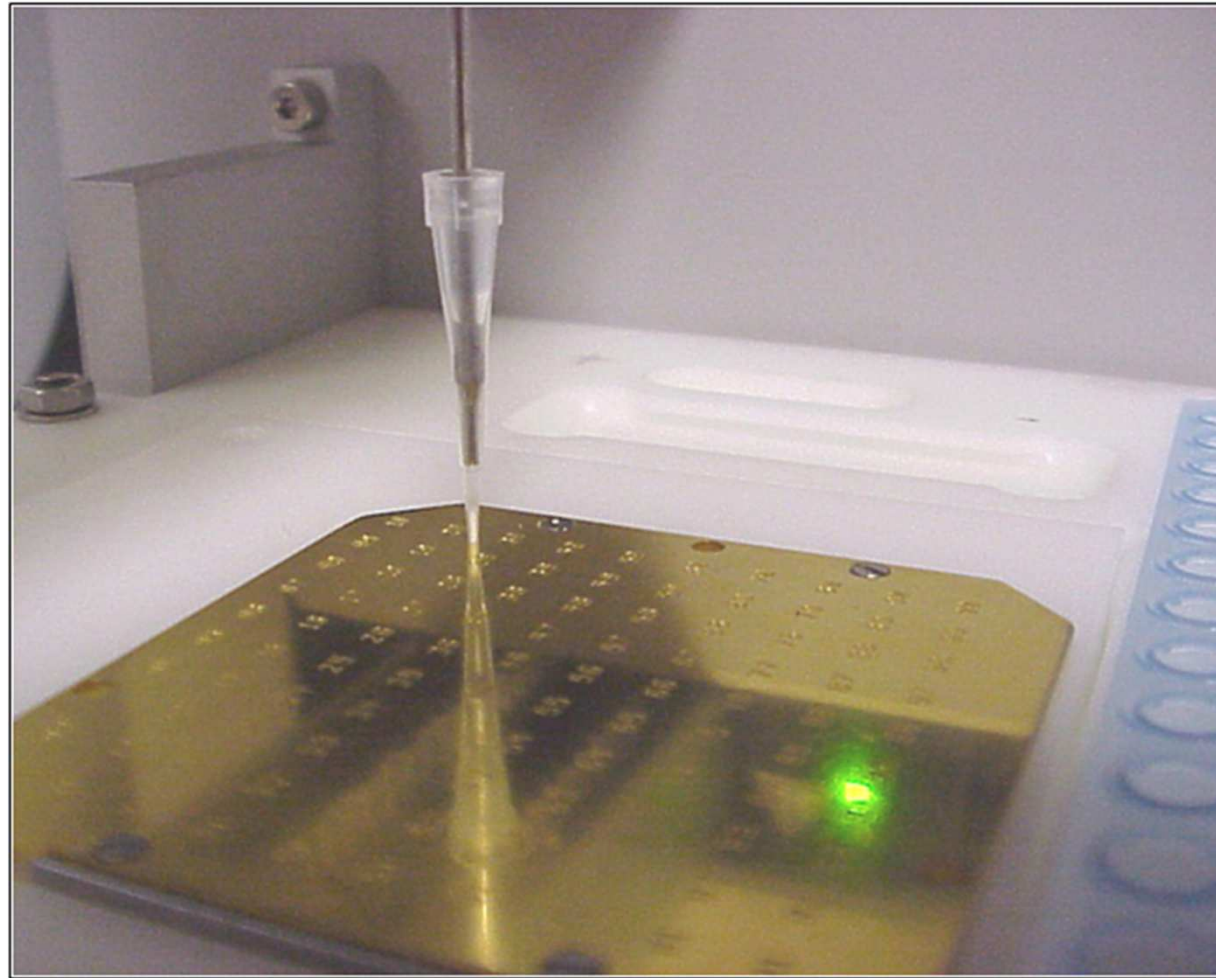
Matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI)

Un campione di proteina è mescolato con una soluzione di matrice (es. ac.sinapinico) e depositata su un supporto in acciaio. A seguito di essiccazione si ha co-cristallizzazione di matrice e proteina. Quando i cristalli sono bombardati con fotoni da un laser, la frequenza del quale corrisponde al massimo di assorbimento delle molecole della matrice, si generano ioni che possono essere analizzati con uno spettrometro di massa (es. a “tempo di volo” TOF).

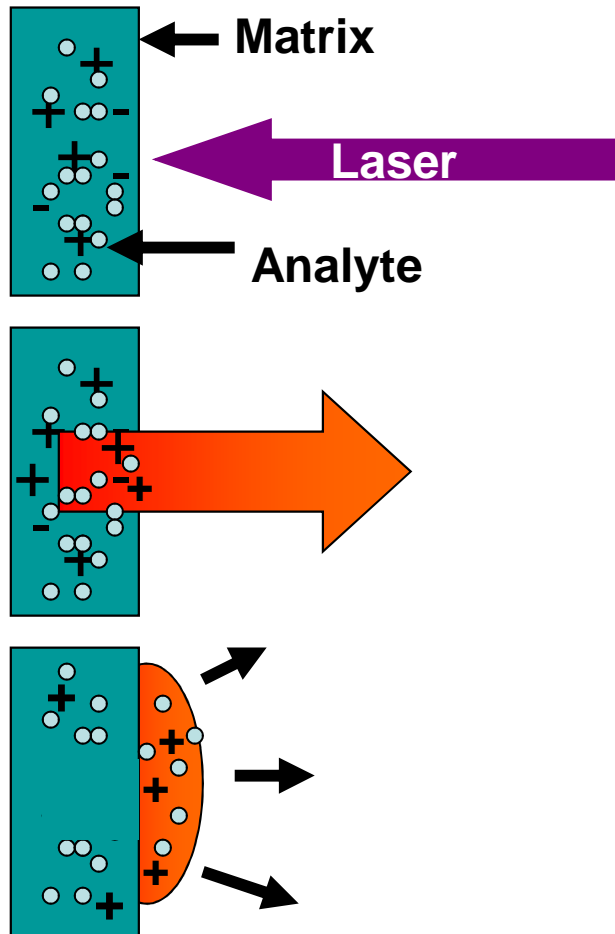
Si usa per bio- macro- molecole, fino a 300 kDa.



HT Spotting on a MALDI Plate



MALDI Ionization



- Absorption of UV radiation by chromophoric matrix and ionization of matrix
- Dissociation of matrix, phase change to super-compressed gas, charge transfer to analyte molecule
- Expansion of matrix at supersonic velocity, analyte trapped in expanding matrix plume (explosion/"popping")

Altre tecniche di ionizzazione soft

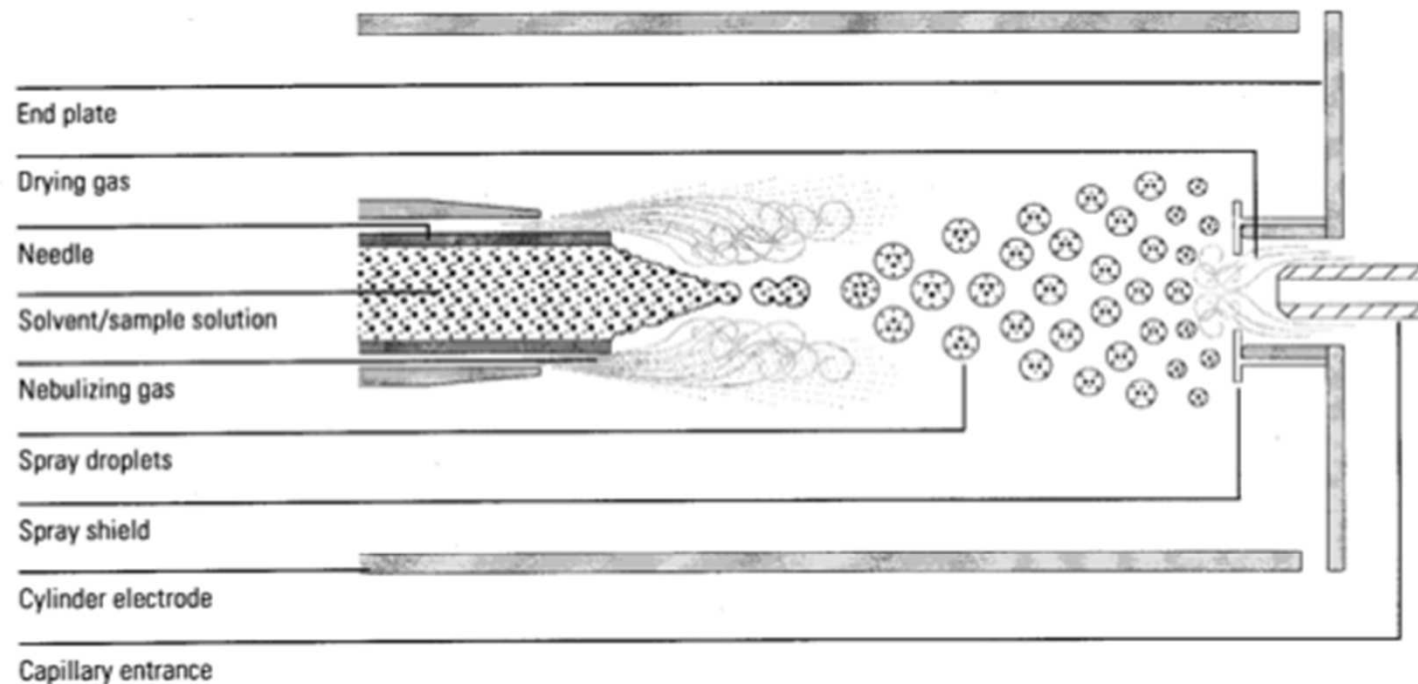
Spesso impiegati per analiti con elevata polarità e/o massa

Metodi di nebulizzazione e ionizzazione

Per l'analisi in LC si sono sviluppati metodi soft come il ThermoSpray (TSI) o l'ElectroSpray Ionization (ESI). Si basano sulla nebulizzazione di un liquido e la successiva generazione di ioni dalle goccioline.

Nel TSI il campione è nebulizzato in una camera per CI modificata, mentre nell'elettrospray nebulizzazione avviene a pressione atmosferica.

Electrospray Ionization Chamber

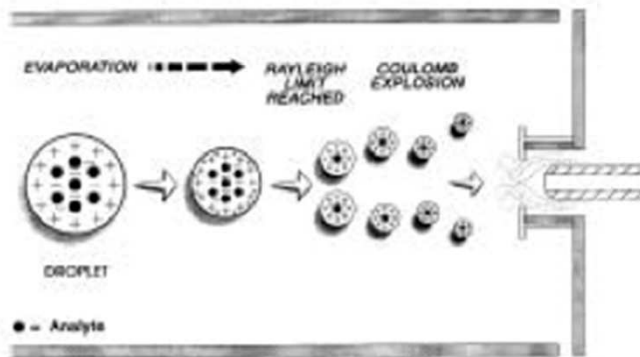


- API-Electrospray occurs at 760 torr
- Products = neutrals, ions, and clusters of ions

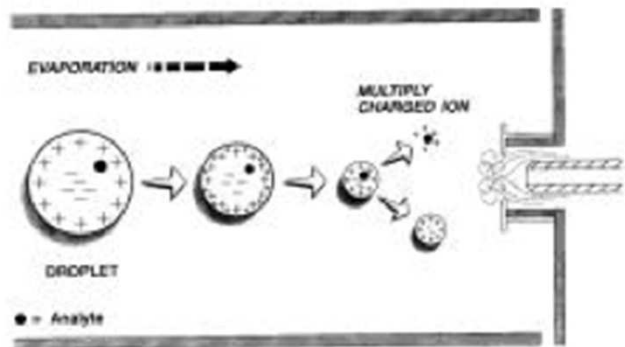
Meccanismi di formazione degli ioni non perfettamente compresi: ioni preformati in soluzione evaporano da goccioline a carica elevata. Sono importanti a volte anche reazioni in fase gassosa



Ionization Mechanisms

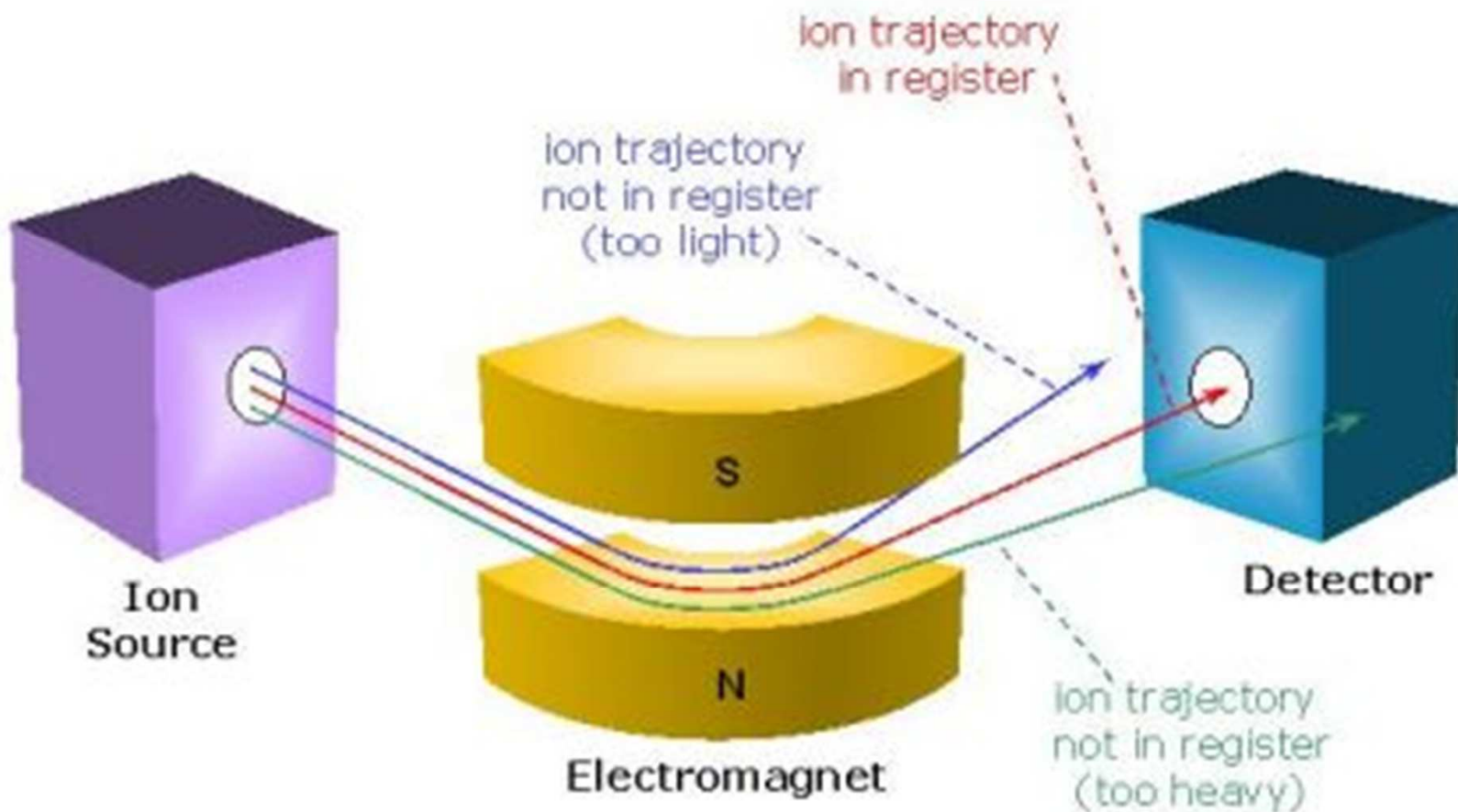


- **Coulomb Fission :**
 - Assumes that the increased charge density, due to solvent evaporation, causes large droplets to divide into smaller droplets eventually leading to single ions.



- **Ion Evaporation:**
 - Assumes the increased charge density that results from solvent evaporation causes Coulombic repulsion to overcome the liquid's surface tension, resulting in a release of ions from droplet surfaces

Magnetic Sector Analyzer



Elevatissima risoluzione

Capitolo 4.3

Magnetic Sector Instruments

da pag. 130

In *Mass Spectrometry: a Textbook*

The Lorentz Force Law can be used to describe the effects exerted onto a charged particle entering a constant magnetic field. The Lorentz Force F_L depends on the velocity v , the magnetic field B , and the charge q of an ion. In the simplest form the force is given by the scalar equation

$$F_L = qvB$$

This is valid if v and B (both are vectors) are perpendicular to each other.

*An ion of mass m and charge q travelling at a velocity v in a direction perpendicular to a homogeneous magnetic field will follow a circular path of radius r_m that fulfills the condition of equilibrium of F_L and **centripetal force** F_c*

$$F_L = qvB = \frac{m_i v^2}{r_m} = F_c$$

Upon rearrangement we obtain the radius r_m of this circular motion

$$r_m = \frac{m_i v}{qB}$$

This shows the working principle of a magnetic sector the radius r_m depends on the momentum mv of an ion, and therefore the momentum depends on m/z .

Finally, dispersion in momentum causes a dependence of r_m on the square root of mass becoming obvious by substitution of v

$$r_m = \frac{m_i}{ezB} \sqrt{\frac{2eU}{m_i}} = \frac{1}{zB} \sqrt{\frac{2m_i U}{e}}$$

Alternatively, the ratio m_i/q can be expressed as

$$\frac{m_i}{q} = \frac{r_m B}{v}$$

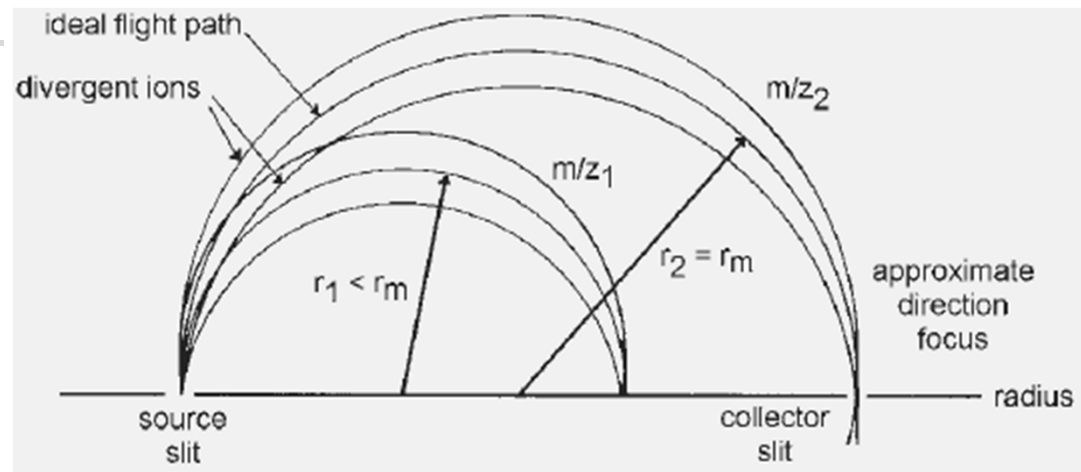
which upon substitution of v as performed above becomes

$$\boxed{\frac{m_i}{q} = \frac{r_m B}{\sqrt{\frac{2qU}{m_i}}} \Rightarrow \frac{m_i}{q} = \frac{r_m^2 B^2}{2U}}$$

This has been formerly known as the *basic equation of mass spectrometry*.

There is *no more justification for a single basic equation* of mass spectrometry because of the various mass analyzers employed.

The focusing action of a homogeneous magnetic field on a beam of ions having the same m/z and the same kinetic energy can best be illustrated by a 180° sector (Fig. 4.18). If the beam is divergent by a half-angle α , the collector slit must be $\alpha^2 r_m$ wide to pass all ions after suffering 180° deflection. This is because the ions come to a first order, i.e., imperfect, focus as they all traverse the magnetic field at the same radius but not all of them entered the field at right angles.



Ions of different m/z fly at a different radius, e.g., the lighter ions of m/z_1 hit the wall while ions of m/z_2 reach the collector slit. To allow for detection of various masses, such an analyzer could either be equipped with a **photographic plate** in the focal plane to become a so-called *mass spectrograph*, **or** it could be designed with **variable magnetic field** to detect different masses at the same point by bringing them subsequently at the collector slit.

the 180° design demands for large and heavy magnetic sectors. An optimized magnetic sector alone can provide resolutions of $R = 2000\text{--}7000$ depending on its radius. The limitation arises from the fact that ions emerging from the ion source are not monoenergetic. Ions of different m/z can obtain the same momentum and thus cause overlap of adjacent ion beams at the detector.

- **Example:** *Equation 4.13a describes the radius r_m in the magnetic field. Obviously, the value r_m remains constant as long as $m_i U = \text{const}$. If the instrument is set to pass an ion of say m/z 500 and 3000 eV kinetic energy, it will simultaneously allow the passage for ions of m/z 501 having 2994 eV or of m/z 499 having 3006 eV of kinetic energy.*

This is why **obtaining higher resolution requires small kinetic energy distributions.**

The *electrostatic sector* or *electrostatic analyzer* (ESA) produces a **radial electric field** between two oppositely charged plates extending over the ESA angle Φ . An ion passes the ESA midway on a circular path if

$$F_e = qE = \frac{m_i v^2}{r_e} = F_c$$

F_e = electric force, E = electric field strength, r_e the radius of the ESA.

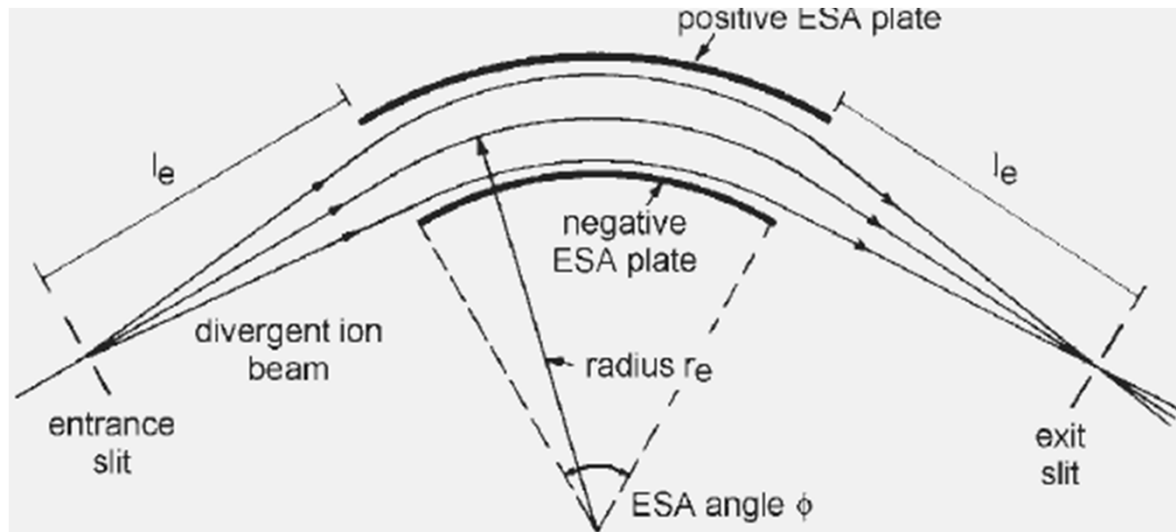
ESA acts as an energy dispersive device

$$r_e = \frac{m_i v^2}{qE} = \frac{m_i v^2}{ezE}$$

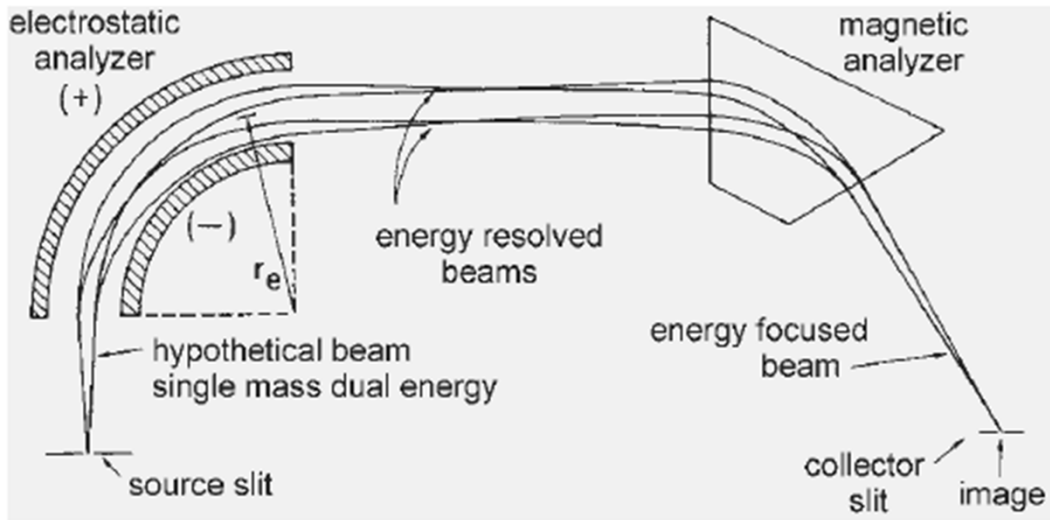
Thus, the **kinetic energy distribution of an ion beam can be reduced.**

The following simple relationship describes the radius of the ESA.

$$r_e = \frac{2U}{E}$$

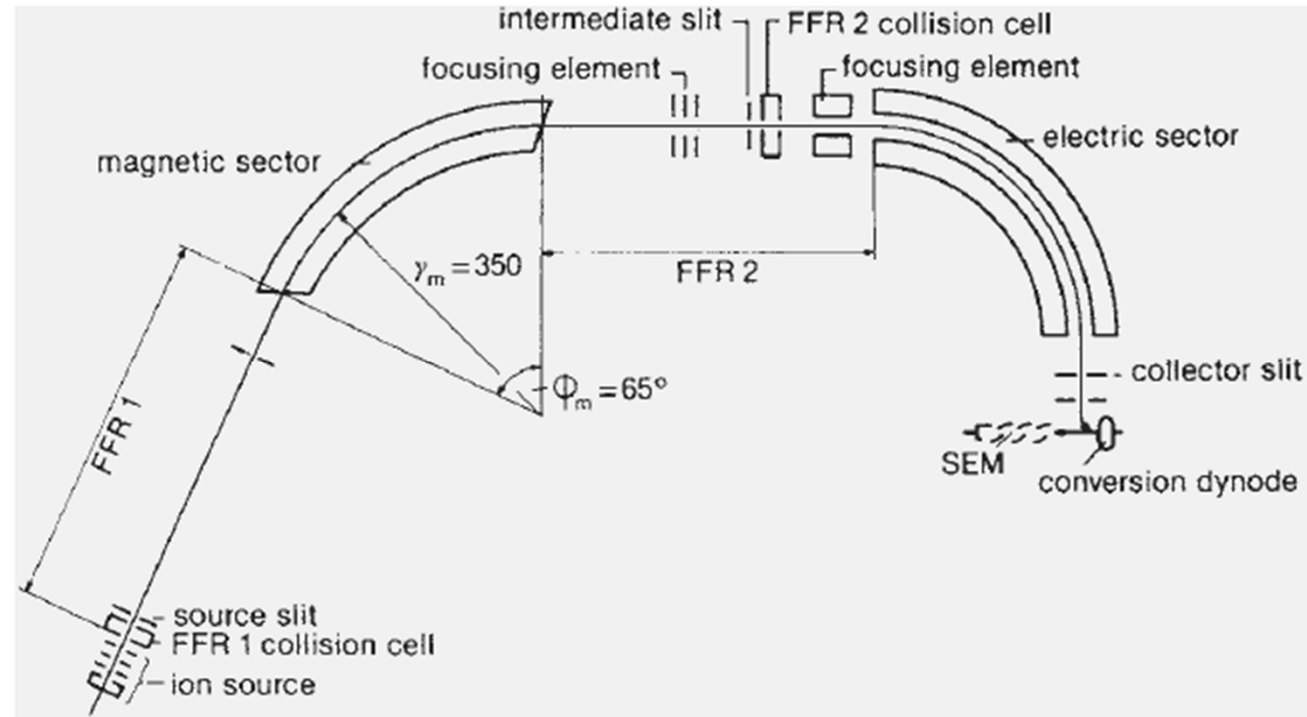


Imagine an *ion drifting towards the outer plate having the same charge sign as the ion*. As it approaches the plate *it is decelerated by the opposed electric field and finally reflected towards the center of the beam*. With its radial component of v inverted it crosses the ideal path at l_e . In an analogous fashion an *ion approaching the inner plate becomes accelerated by the attractive force*. The resulting higher velocity causes an *increase in centripetal force, and thereby effects a correction of the flight path* in the appropriate sense.

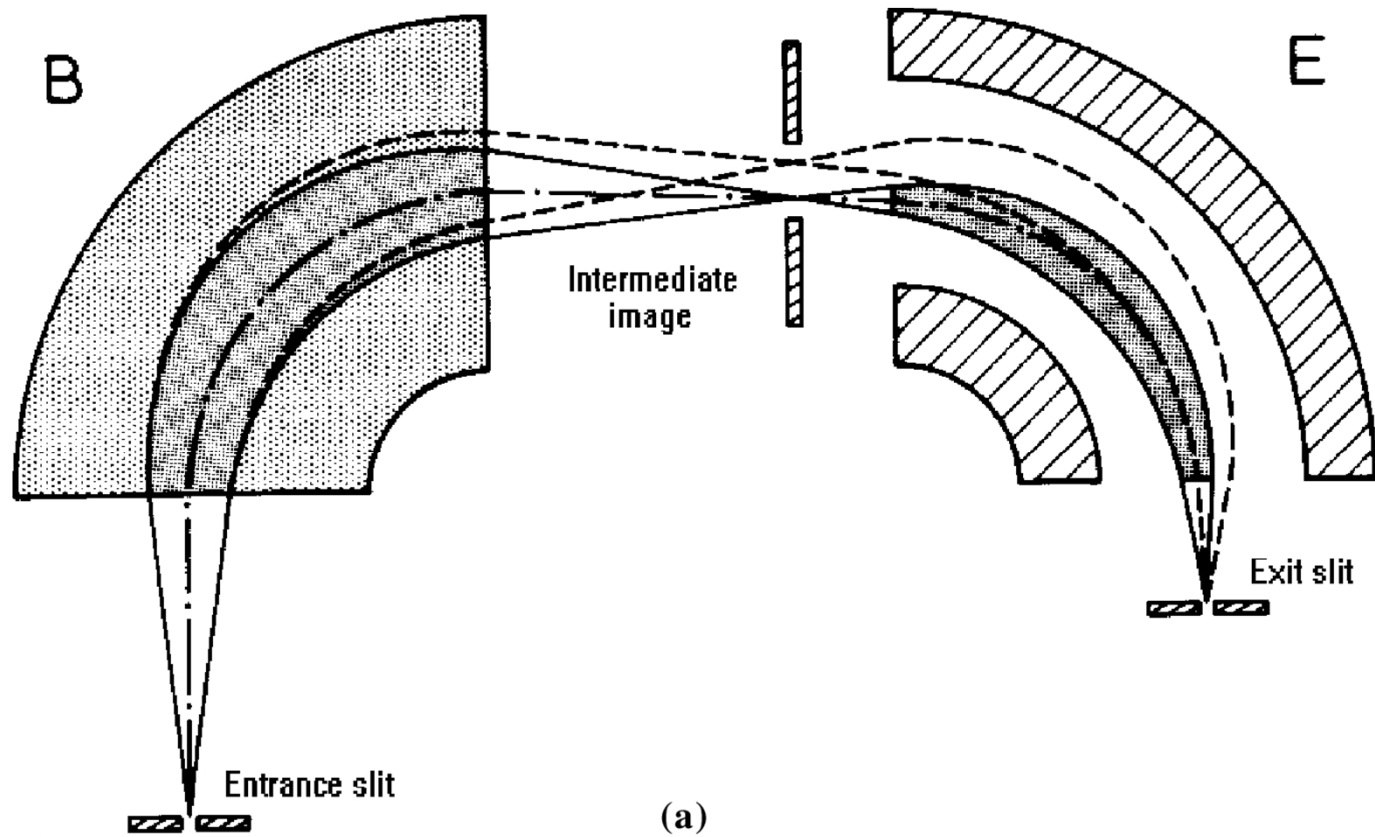


Configurazione diretta EB
 $R > 10000$

Configurazione
 Inversa BE
 $R > 70000$



- La separazione di ioni con diverso rapporto m/z si può conseguire con :
la variazione del raggio di curvatura che porterà gli ioni ad esser separati nello spazio, mentre
la variazione di B o V porterà gli ioni con diverso m/z ad esser separati nel tempo (i.e. possono esser rilevati uno dopo l'altro da un detector a posizione fissa dietro una fenditura. La risoluzione dipende dalle fenditure in ingresso a B ed in uscita al detector (compromesso selettività/sensibilità).
- Prestazioni in termini di risoluzione di massa sono migliorabili con **analizzatore elettrostatico (ESA)**, che focalizza gli ioni con ugual m/z ma diversa energia cinetica (si migliora la risoluzione senza perder segnale) → **strumenti a doppia focalizzazione (HR, masse accurate)**.
- Elevato range di masse, alta risoluzione, buona capacità di quantificazione... ma costi alti.



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
 Kellner / Analytical Chemistry
 ISBN: 3-527-30590-4 Fig-25-04-07a

Energia cinetica

Lavoro di estrazione

$$e\Delta V = \frac{1}{2}mv^2$$

Forza centriguga

Forza di Lorentz

$$ma = \frac{mv^2}{R} = qvB$$

$$\frac{m}{e} = \frac{B^2 R^2}{2\Delta V}$$

Per un certo valore della coppia B e V , esisterà un solo valore di massa m per cui il raggio di deflessione r coincide con il raggio di curvatura del tubo R . Di conseguenza gli ioni che hanno questo valore di massa escono dal tubo, gli altri no.

Operando a potenziale V costante e facendo una scansione di campo B è possibile fare uscire dal tubo gli ioni a diversa massa in tempi diversi.