

CHIMICA ANALITICA II

CON LABORATORIO

(AA 2016-17)

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

21

Jürgen H. Gross

Mass Spectrometry

A Textbook

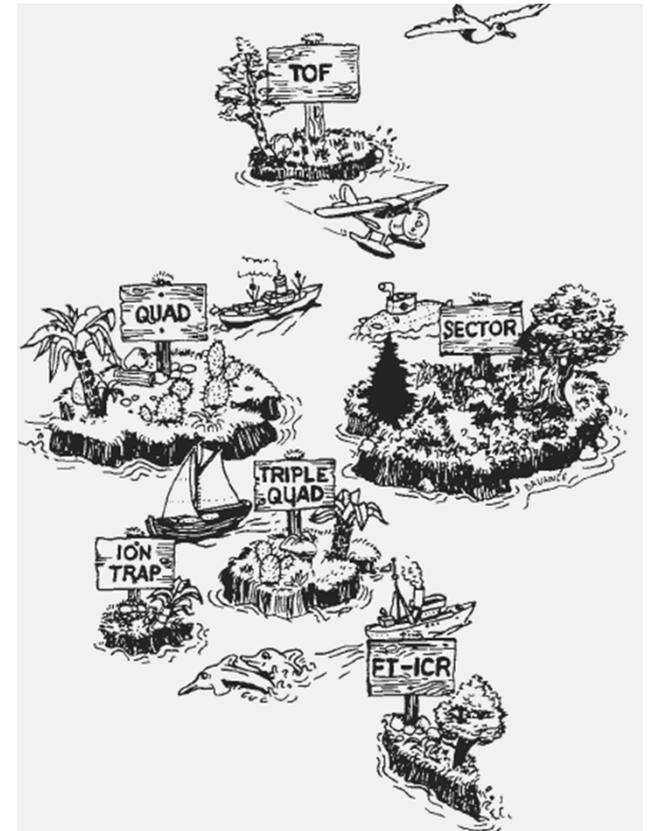
With 357 Illustrations and Tables

[http://www.dmf.unicatt.it/~gavioli/
corsi/MSFM/ref/Vuoto+Camere/
Mass Spectrometry A Textbook.
pdf](http://www.dmf.unicatt.it/~gavioli/corsi/MSFM/ref/Vuoto+Camere/Mass_Spectrometry_A_Textbook.pdf)

Analizzatori di massa

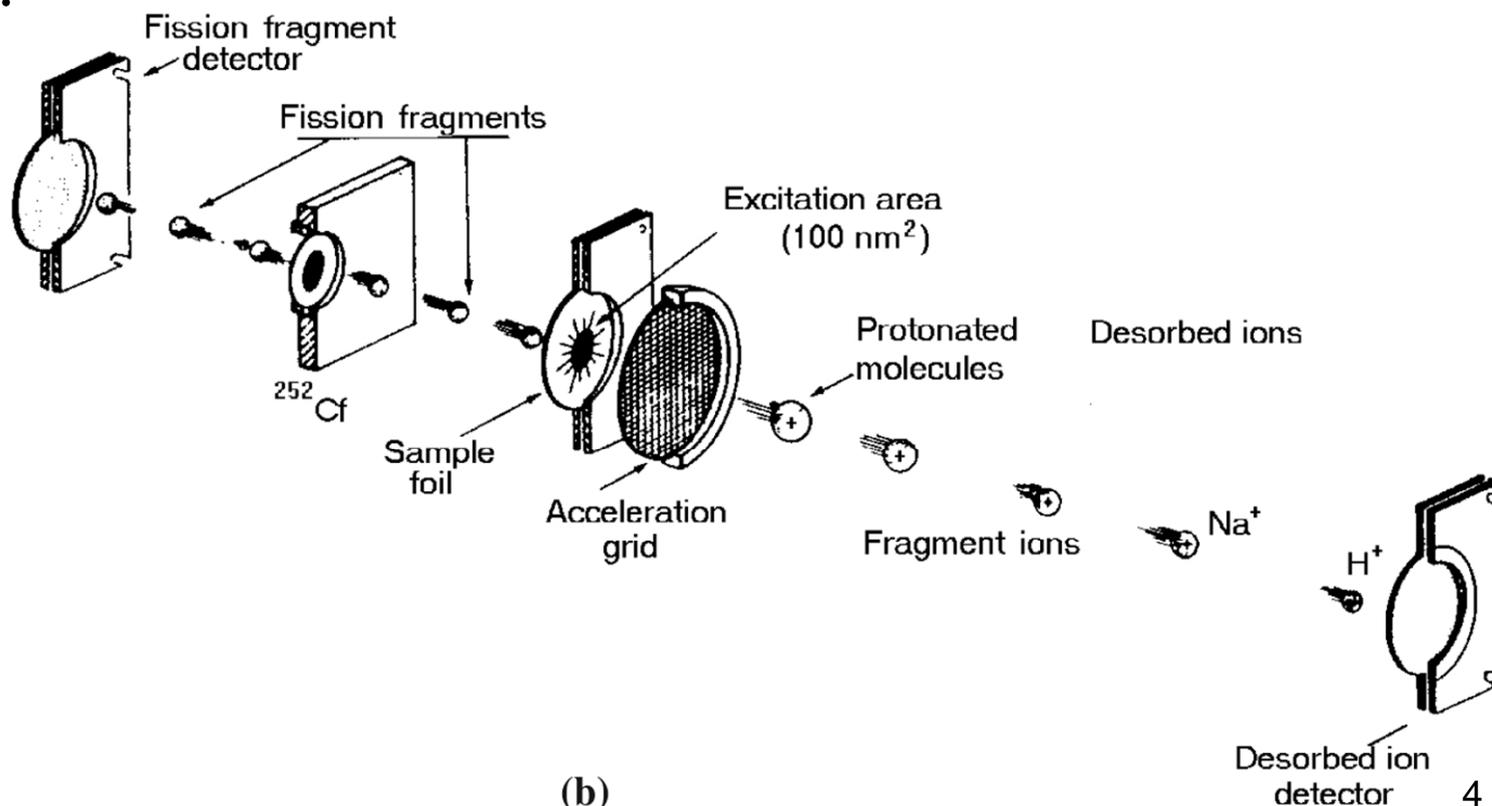
diversi principi di analisi di massa:

- Combinazione di settori magnetici ed elettrici
- Filtri a quadrupolo
- Trappole ioniche quadrupolari
- Misure del tempo di volo (TOF)
- Sistemi a risonanza ione-ciclotrone
- Orbitrap



Time of Flight Mass Spectrometry (TOF)

Il TOF consiste in una sorgente di ioni pulsata, una griglia di accelerazione, un tubo di volo privo di campo in cui è fatto il vuoto e di un rivelatore; si basa sul principio che ioni di differente m/z acquistano, nella fase di accelerazione, differenti velocità.



L'**energia potenziale** di una particella carica in un campo elettrico è legata alla sua carica e alla forza del campo elettrico:

$$E_p = q U \quad [1]$$

dove E_p è l'energia potenziale, q è la carica della particella, e U è la differenza del potenziale elettrico (voltaggio o tensione).

Quando la particella carica viene accelerata dentro il tubo a tempo di volo tramite il voltaggio U , la sua energia potenziale viene convertita in **energia cinetica**. L'energia cinetica di ogni **massa** è:

$$E_k = 1/2 m v^2 \quad [2]$$

l'energia potenziale è convertita in energia cinetica

$$q U = 1/2 m v^2$$

$$v = d / t$$

$$t^2 = (2 d^2 / U) m/q$$

$$t = \text{cost } (m/q)^{1/2}$$

**A tempi diversi arrivano intensità differenti al rivelatore,
in relazione con m/q**

Il **Brevetto del TOF** è del 1952 di William E. **Stephens** della University of Pennsylvania. L'idea era stata presentata nel 1946 al Massachusetts Institute of Technology, ad un incontro della American Physical Society.

Il **principio del TOF** è semplice: ioni di diversa m/z sono dispersi nel tempo durante il volo lungo una traiettoria di deriva in campo libero per una lunghezza nota.

Dato che tutti gli ioni iniziano il loro viaggio allo stesso momento o almeno all'interno di un intervallo di tempo sufficientemente breve, quelli più leggeri arriveranno al detector prima di quelli più pesanti.

I principali vantaggi di strumenti TOF sono:

- i. in linea di principio, l'intervallo m/z è illimitato;
- ii. Da ogni evento ionizzanti, ad esempio, un solo colpo laser MALDI, si ottiene uno spettro di massa completa in qualche decina di microsecondi;
- iii. La trasmissione di un analizzatore TOF è molto alta, dando origine ad alta sensibilità;
- iv. La costruzione di uno strumento TOF è relativamente semplice e poco costosa;
- v. strumenti più recenti consentono misurazioni di massa accurate e tandem esperimenti MS

La q carica elettrica di uno ione di massa m_i è uguale ad un numero intero z di cariche dell'elettrone e , quindi $q = ez$.

L'energia E_{el} acquisita muovendo attraverso un voltaggio U è dato da

$$E_{el} = qU = EZU$$

l'energia potenziale di una particella carica in un campo elettrico viene convertita in energia cinetica E_{kin} , cioè in moto traslatorio

$$E_{el} = ezU = \frac{1}{2} m_i v^2 = E_{kin}$$

Supponendo che lo ione fosse a riposo inizialmente, che è corretto in prima approssimazione, la velocità raggiunta è

$$v = \sqrt{\frac{2ezU}{m_i}}$$

cioè, v è inversamente proporzionale alla radice quadrata della massa.

Il tempo t per uno ione di m / z sconosciuta per percorrere una distanza s dopo essere stata accelerata da una tensione U è

$$t = \frac{s}{\sqrt{\frac{2ezU}{m_i}}}$$

il tempo necessario allo ione per percorrere la distanza s a velocità costante, cioè, in un ambiente privo di campo dopo che il processo di accelerazione è stato completato

La relazione tra i parametri strumentali s e U , il valore sperimentale di t ed il rapporto m/z è:

$$\frac{m_i}{z} = \frac{2 e U t^2}{s^2}$$

il tempo di deriva attraverso una lunghezza fissa di spazio libero campo è proporzionale alla radice quadrata di m/z

$$t = \frac{s}{\sqrt{2eU}} \sqrt{\frac{m_i}{z}}$$

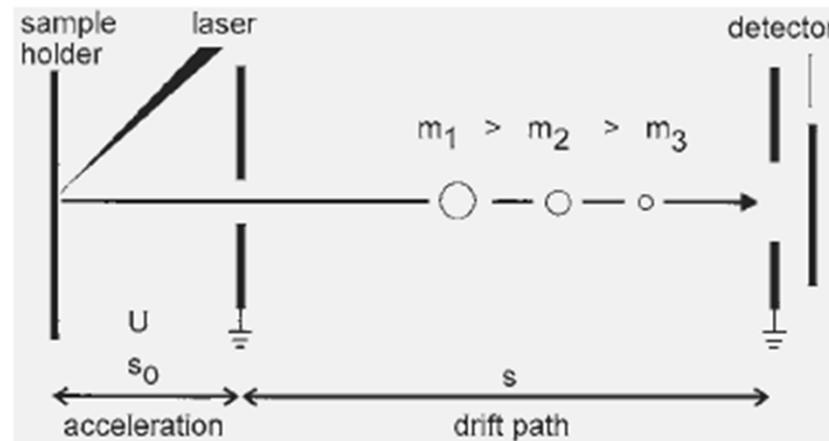
il tempo di deriva attraverso una lunghezza fissa di spazio libero da campo (*field free*) è proporzionale alla radice quadrata di m/z

pertanto, l'intervallo di tempo Δt tra i tempi di arrivo di ioni di diversa m/z è proporzionale a $s \times (m/z_1^{1/2} - m/z_2^{1/2})$.

La proporzionalità tra tempo di volo e la radice quadrata di m/z fa sì che il Δt per una data $\Delta m/z$ diminuisca all'aumentare del m/z : sotto le stesse condizioni di Δt **per 1 u** è calcolato come 114 ns a m/z 20, 36 ns a m/z 200, e solo 11 ns at m/z 2000. Pertanto, la realizzazione di un analizzatore di massa a tempo di volo dipende dalla capacità di misurare brevi intervalli di tempo con sufficiente accuratezza.

TOF lineare

La trasmittanza di un analizzatore TOF lineare avvicina il 90% a causa delle perdite di ioni sono causati esclusivamente dalla dispersione collisionale dovuto al gas residuo o da cattiva focalizzazione spaziale della sorgente di ioni



Di conseguenza, la dispersione dei tempi di partenza per gli ioni con lo stesso valore di m/z è spesso maggiore della differenza di tempo di volo dei valori m/z vicini, limitando così la risoluzione.

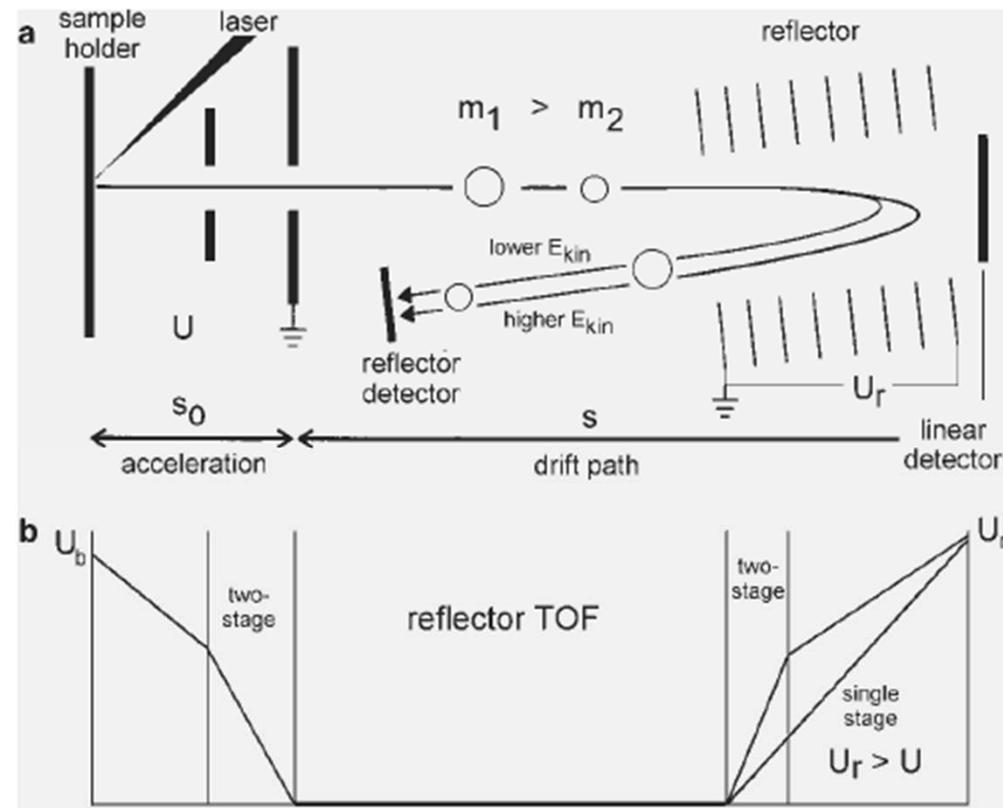
Reflectron

Il riflettore o *reflectron* è stato sviluppato da Mamyrin. Nel analizzatore riflettore TOF - spesso abbreviato *ReTOF* - agisce come uno specchio riflettore di ioni che focalizza ioni di diverse energie cinetiche nel tempo.

Un riflettore semplice consiste di un campo elettrico ritardante posizionato dietro la regione di deriva in campo libero, opposto alla sorgente di ioni. In pratica, un riflettore è composto da una serie di anelli - o meno preferibilmente griglie - a potenziale crescente.

La tensione di riflessione U_r è impostato a circa 1,05-1,10 volte la tensione di accelerazione U per assicurare che tutti gli ioni sono riflessi all'interno della porzione omogenea del campo elettrico del dispositivo (Fig. 4.5). Gli ioni penetrano il reflectron fino a raggiungere lo zero dell'energia cinetica e vengono poi espulsi dal riflettore in direzione opposta. L'energia cinetica degli ioni lasciando rimane inalterato, tuttavia le loro percorsi di volo variano secondo le loro differenze di energia cinetica.

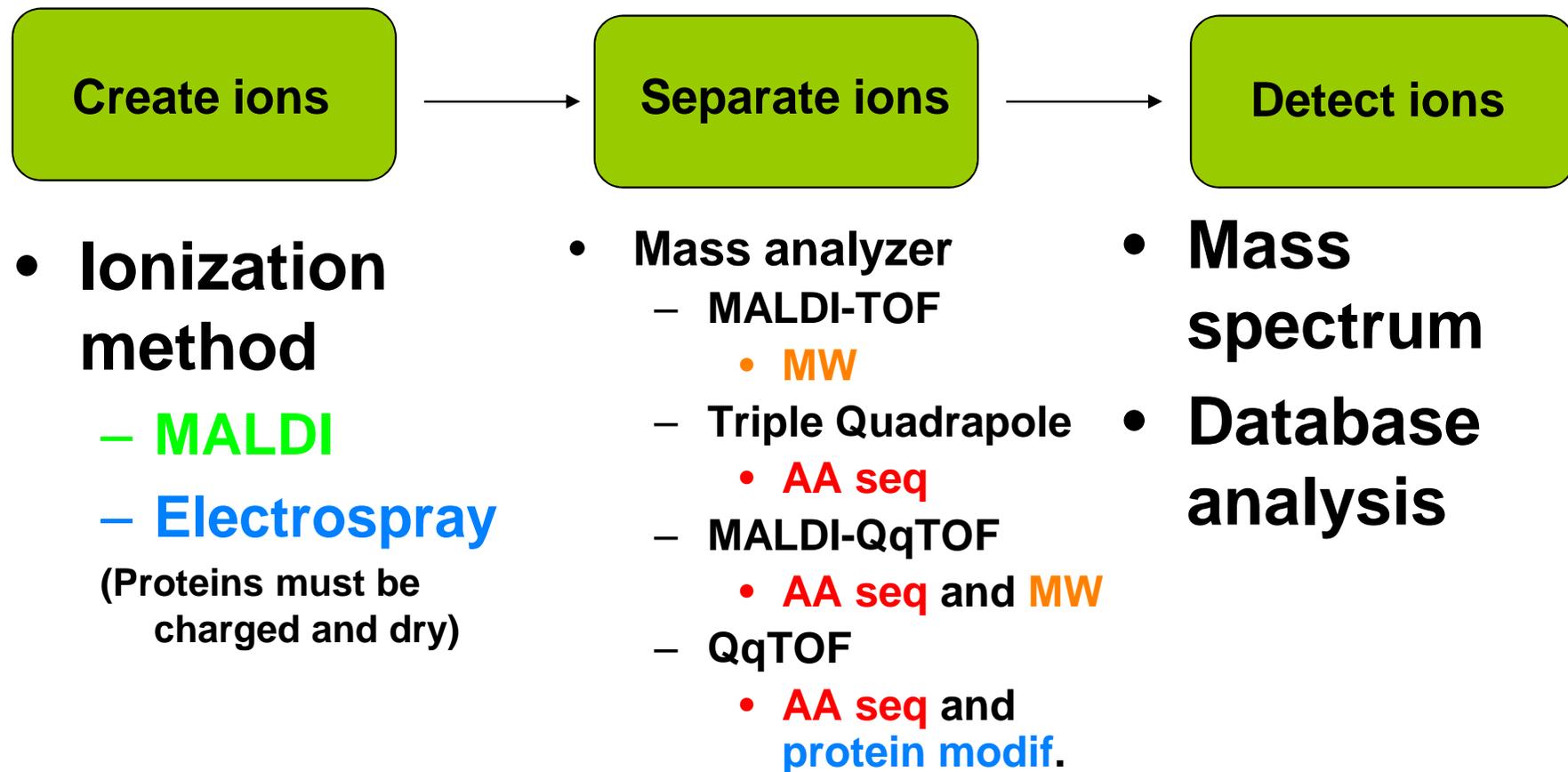
Reflectron



Schematic of a ReTOF (a) and potentials along the instrument (b).

Es: per analisi di proteine

How does a mass spectrometer work?



Soft Ionization

- **Soft ionization techniques keep the molecule of interest fully intact**
- **Electro-spray ionization first conceived in 1960's by Malcolm Dole but put into practice in 1980's by John Fenn (Yale)**
- **MALDI first introduced in 1985 by Franz Hillenkamp and Michael Karas (Frankfurt)**
- **Made it possible to analyze large molecules via inexpensive mass analyzers such as quadrupole, ion trap and TOF**



The Nobel Prize in Chemistry 2002

"for the development of methods for identification and structure analyses of biological macromolecules"

"for their development of soft desorption ionisation methods for mass spectrometric analyses of biological macromolecules"

"for his development of nuclear magnetic resonance spectroscopy for determining the three-dimensional structure of biological macromolecules in solution"



John B. Fenn

🕒 1/4 of the prize

USA

Virginia
Commonwealth



Koichi Tanaka

🕒 1/4 of the prize

Japan

Shimadzu Corp.
Kyoto, Japan



Kurt Wüthrich

🕒 1/2 of the prize

Switzerland

Eidgenössische
Technische

The Nobel Prize in Chemistry 2002

Press Release
Advanced Information
Information for the Public
Presentation Speech
Illustrated Presentation

John B. Fenn

Nobel Lecture
Banquet Speech
Nobel Diploma
Prize Award Photo
Other Resources

Koichi Tanaka

Nobel Lecture
Interview
Nobel Diploma
Prize Award Photo
Other Resources

Kurt Wüthrich

Nobel Lecture
Interview
Nobel Diploma
Prize Award Photo
Educational
Other Resources

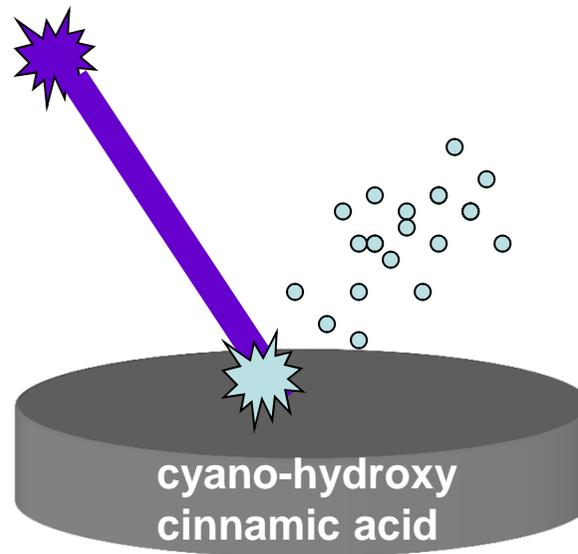
© 2001

The 2002 Prize in:
Physics
Chemistry
Physiology or Medicine
Literature

Es.

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization

337 nm UV laser



MALDI

MALDI

- La spettrometria di massa MALDI (Matrix assisted laser desorption ionization)- TOF (Time of fly) viene principalmente impiegata per l'analisi di composti organici non volatili che presentano un peso molecolare elevato. Il campo di utilizzo principale riguarda l'analisi di proteine, peptidi, lipoproteine, oligosaccaridi e oligonucleotidi.
- Rappresenta un metodo d'analisi abbastanza semplice e compatibile con i tamponi utilizzati in laboratorio.
- L'accuratezza della massa ottenuta dipende dall'analizzatore dello spettrometro di massa, e sulla maggior parte degli strumenti moderni si è in grado di misurare masse con un errore dello 0,01% per masse molecolari fino a 40.000 Da.

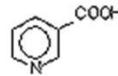
Un raggio emesso da un laser nell'UV fornisce l'energia per il desorbimento. Si evita l'irradiazione continua che potrebbe decomporre il campione e con impulsi di pochi nanosecondi si ottengono in fase gassosa ioni molecolari, che subiscono scarsissima frammentazione ed il cui rapporto m/z può essere misurato in un analizzatore a tempo di volo, TOF.

1 μl della soluzione del campione da analizzare viene aggiunto ad una soluzione satura di un composto organico, la *matrice*, che sia capace di assorbire luce alla λ emessa dal laser. La soluzione risultante viene deposta su un'appropriata superficie metallica inerte, definita *MALDI spot*, ed il solvente fatto evaporare. Si ottiene una matrice solida tra le molecole della quale sono disperse le molecole del campione, cioè *matrice e campione sono cocristallizzati* in una *MALDI spot*. La matrice va scelta in funzione del tipo di campione, e deve essere in grado di solubilizzare molecole polari ed apolari.

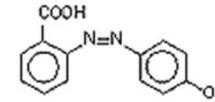
Un raggio emesso ad es a 266 nm da un laser Nd-YAG od uno a 337 nm da un laser ad azoto, viene inviato al campione e la sua energia verrà prima assorbita dalla matrice e da questa trasferita poi, in parte, alle molecole di campione.

□ Le molecole di campione vengono desorbite, intatte, in forma gassosa, e ionizzate per trasferimento di protoni da parte di ioni derivati dal desorbimento della matrice. Da ciascuna molecola si origina, pertanto, un'unica specie ionica che non subisce ulteriori frammentazioni. I vantaggi dell'utilizzo della matrice sono molteplici: i campioni possono essere analizzati anche in presenza di tamponi, detergenti, chelanti in quanto questi non interferiscono con il processo di desorbimento.

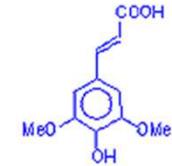
Formula di struttura di matrici reperibili in commercio.



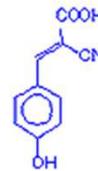
Nicotinsäure NA



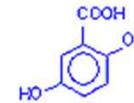
2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoesäure HABA



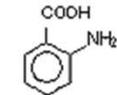
Sinapinsäure SA



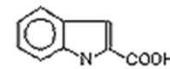
α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure CCA
 α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure CHCA



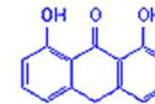
2,5-Dihydroxybenzoesäure DHBA
2,5-Dihydroxybenzoesäure DHB



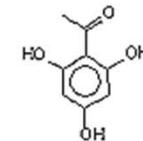
Anthranilsäure



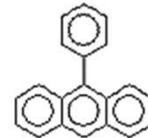
Indol-2-carbonsäure



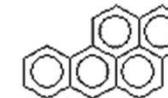
Dithranol



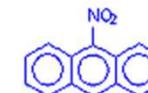
2,4,6-Trihydroxyacetophenon



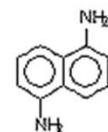
9-Phenylanthracen 9-PA



Benzopyren



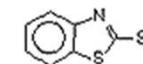
9-Nitroanthracen 9-NA



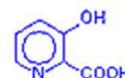
1,5-Diaminonaphthalin



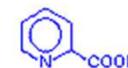
3-Aminochinolin



Mercapto benzothiazol



3-Hydroxy-picolinsäure 3-HPA



Picolinsäure

<http://www.rzuser.uni-heidelberg.de/~bl5/ency/maldi1.html>

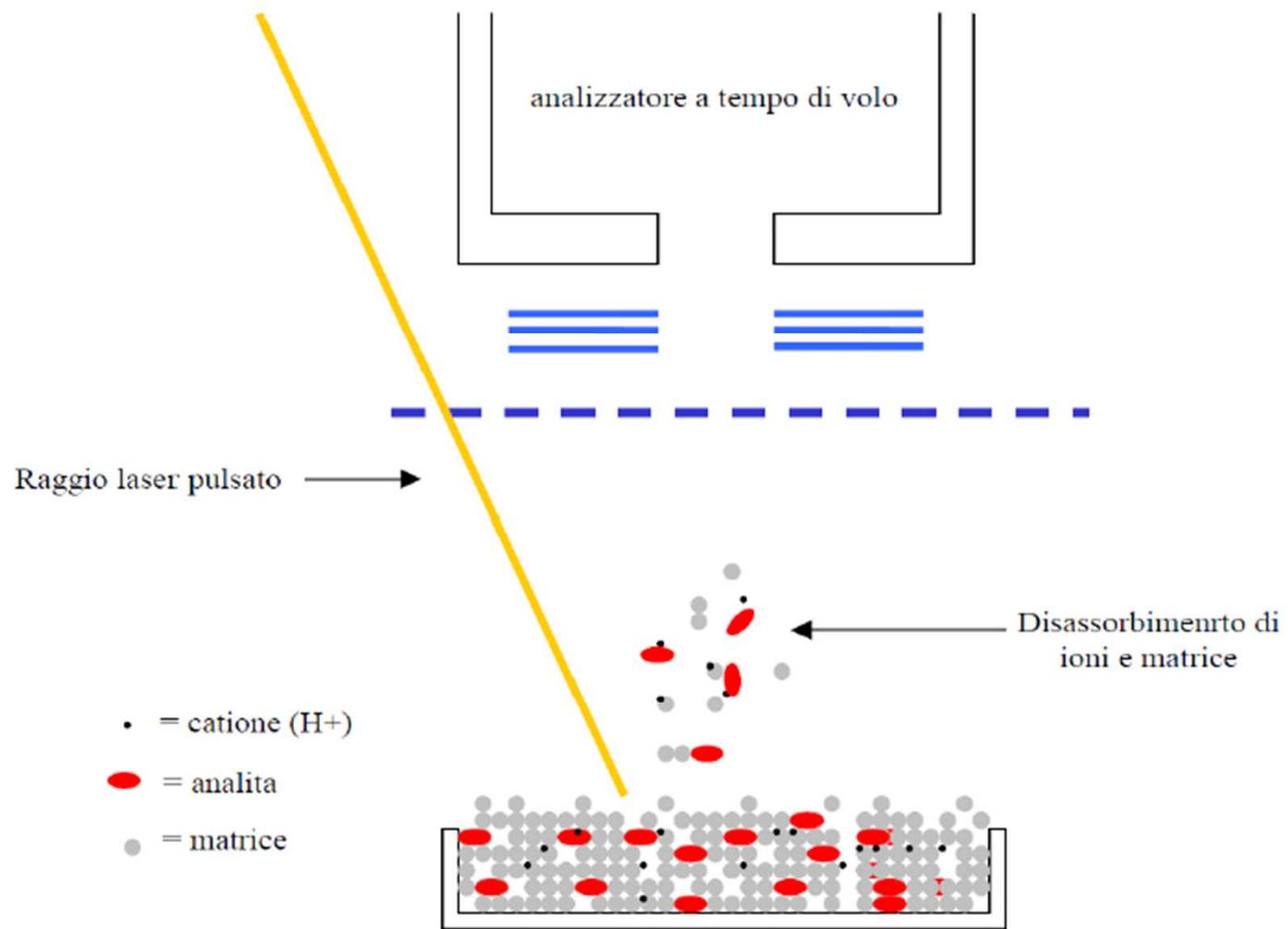


Figura 2: Schema della ionizzazione MALDI

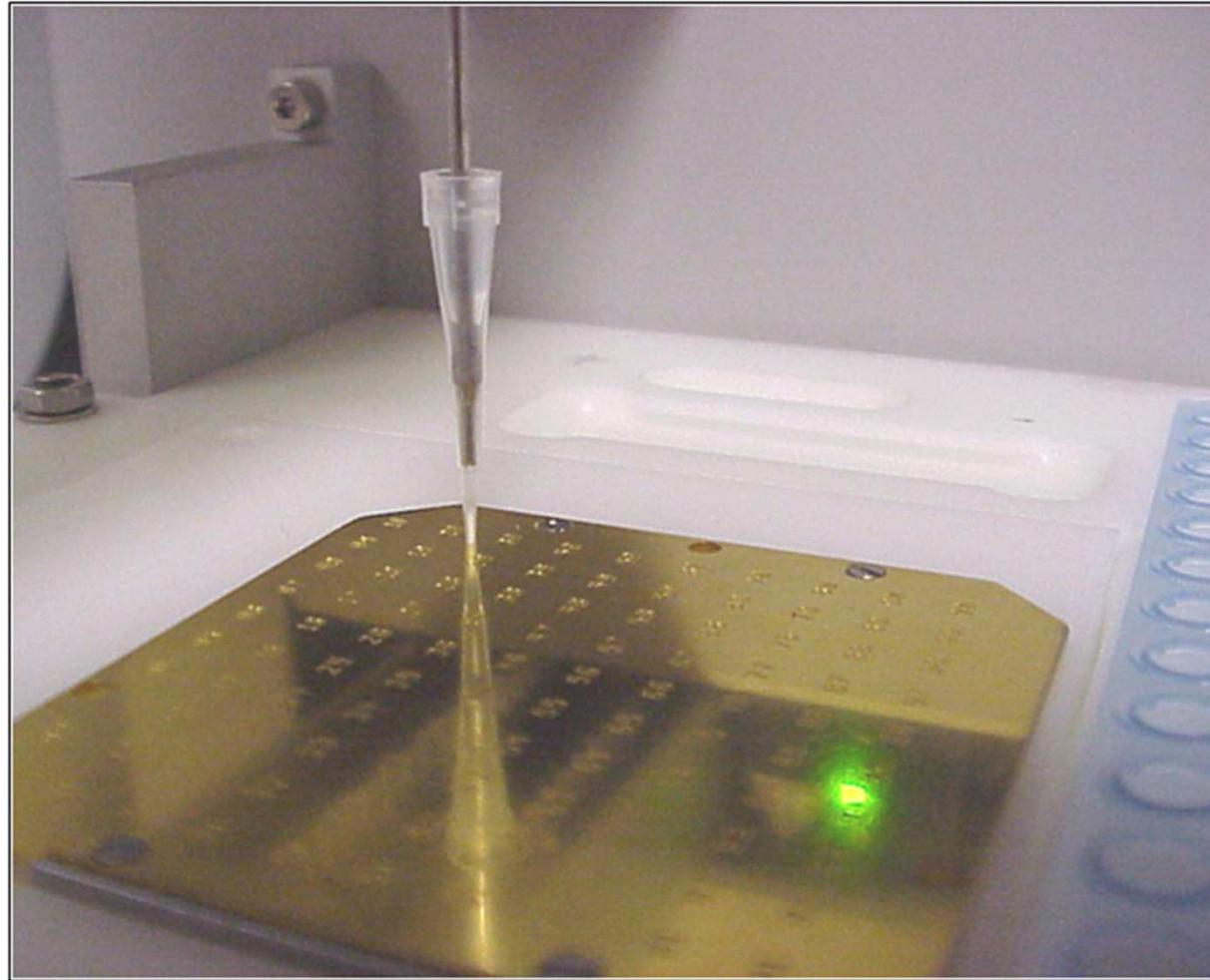
Accoppiando la ionizzazione MALDI ad un analizzatore TOF si possono rapidamente separare ed analizzare i componenti di miscele complesse di macromolecole con masse anche maggiori di 300 kDa, utilizzando solo qualche pmole di campione.

□ **Svantaggi:** la difficoltà di analizzare composti con P.M. < 600 Da e la difficoltà di usare un collegamento con HPLC od elettroforesi capillare.

MALDI

- **Sample is ionized by bombarding sample with laser light**
- **Sample is mixed with a UV absorbant matrix (sinapinic acid for proteins, 4-hydroxycinnaminic acid for peptides)**
- **Light wavelength matches that of absorbance maximum of matrix so that the matrix transfers some of its energy to the analyte (leads to ion sputtering)**

HT Spotting on a MALDI Plate

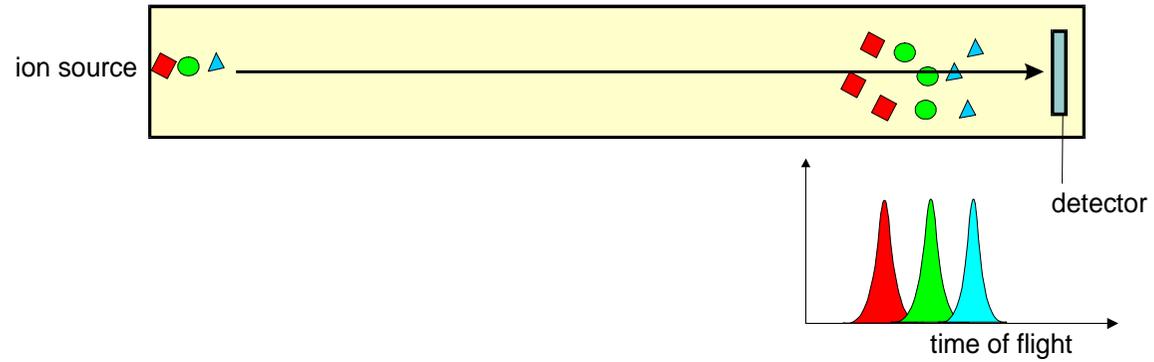


MALDI

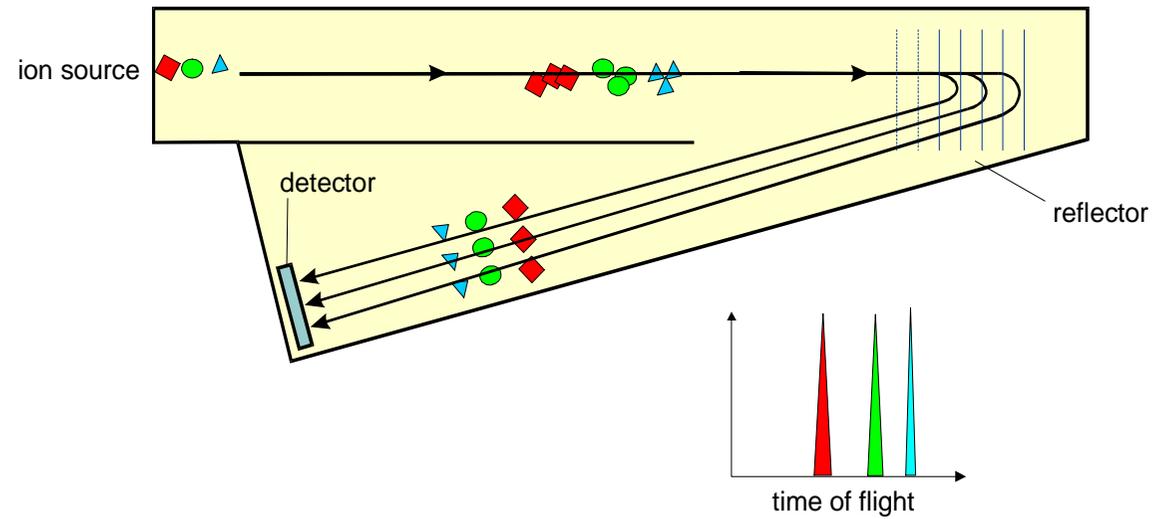
- **Unlike ESI, MALDI generates spectra that have just a singly charged ion**
- **Positive mode generates ions of $M + H$**
- **Negative mode generates ions of $M - H$**
- **Generally more robust than ESI (tolerates salts and nonvolatile components)**
- **Easier to use and maintain, capable of higher throughput**
- **Requires 10 μL of 1 pmol/ μL sample**

Principal for MALDI-TOF MASS

Linear Time Of Flight tube



Reflector Time Of Flight tube

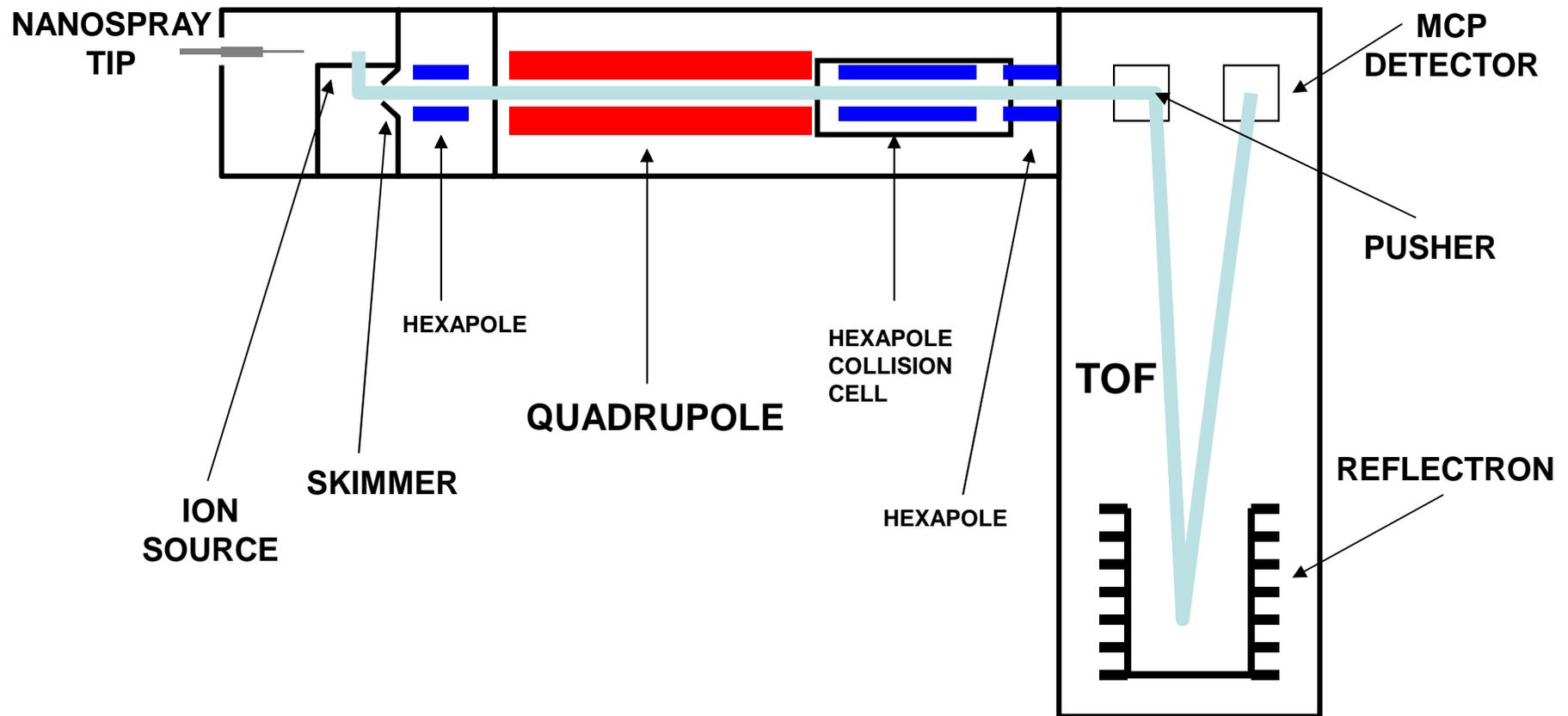


Different Types of MS

- **ESI-QTOF**
 - **Electrospray ionization source + quadrupole mass filter + time-of-flight mass analyzer**
- **MALDI-QTOF**
 - **Matrix-assisted laser desorption ionization + quadrupole + time-of-flight mass analyzer**

Both separate by MW and AA seq

Q-TOF Mass Analyzer



FT-ICR

Fourier-transform ion cyclotron resonance

- **Uses powerful magnet (5-10 Tesla) to create a miniature cyclotron**
- **Originally developed in Canada (UBC) by A.G. Marshall in 1974**
- **FT approach allows many ion masses to be determined simultaneously (efficient)**
- **Has higher mass resolution than any other MS analyzer available**

Un **ciclotrone** è una macchina usata per accelerare fasci di particelle elettricamente cariche (normalmente ioni leggeri) utilizzando una corrente alternata ad alta frequenza ed alta tensione, in associazione con un campo magnetico perpendicolare. La traiettoria percorsa dalle particelle è a spirale a partire dal centro.

FT ICR MS : Analizzatore a risonanza ionica ciclotronica a trasformata di Fourier *(Mass spectrometry: a textbook p.164)*

As we know from the discussion of magnetic sectors, an ion of velocity v entering a uniform magnetic field B perpendicular to its direction will move on a circular path by action of the Lorentz force, the radius r_m of which is determined by

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

Upon substitution with $v = r_m \omega_c$, the angular frequency ω_c becomes:

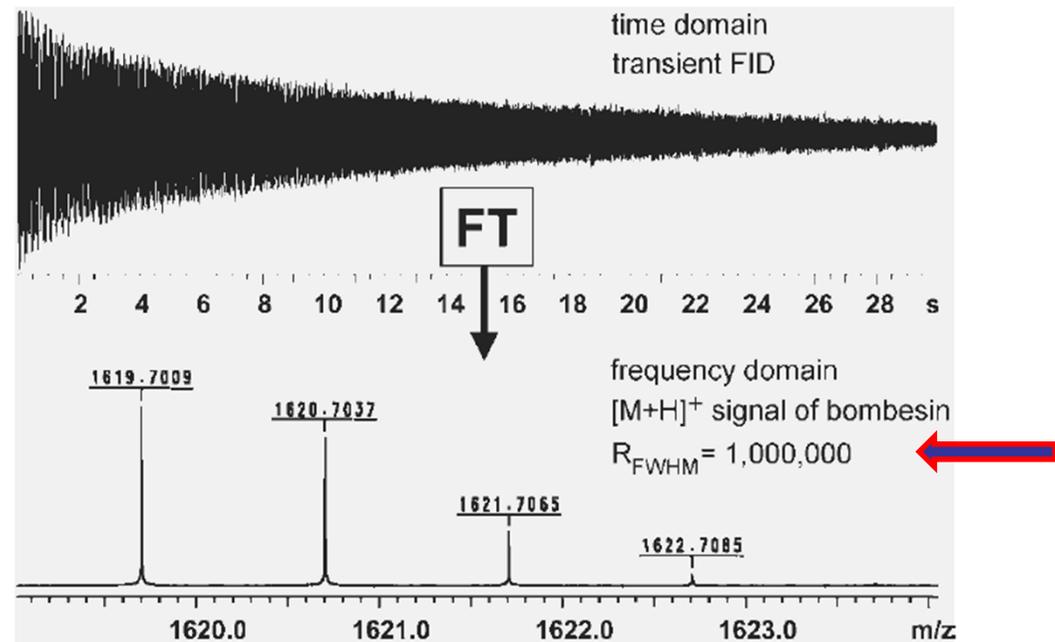
$$\omega_c = \frac{qB}{m_j}$$

Hence, the cyclotron **angular frequency** ω_c is independent of the ion's initial velocity, **but a function of its mass, charge, and the magnetic field**. By applying a electric field alternating at the cyclotron frequency f_c ($\omega_c = 2\pi f_c$) the ions are accelerated. The FT-ICR experiment requires full temporal separation of excitation and subsequent detection of the trapped ions. **Detection is based on the measurement of image currents** in the detector plates. An image current is induced by each ion package when repeatedly passing the detector plates at its individual cyclotron frequency, i.e., detection in FT-ICR means “listening to the circulating ions”. The transient *free induction decay* (FID) is recorded, and afterwards, the FID is converted from the *time domain* to the *frequency domain* by means of Fourier transformation.

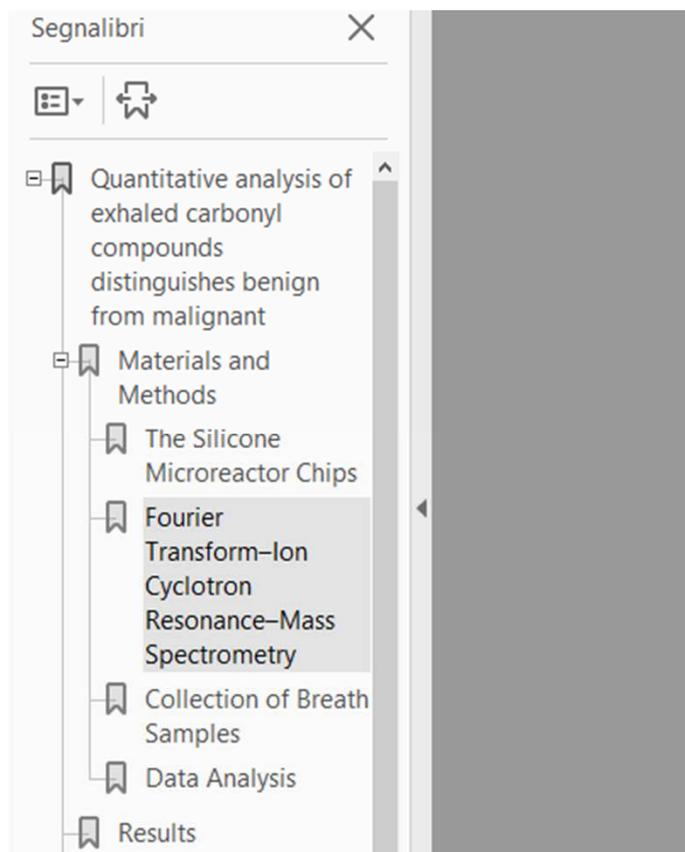
<https://www.youtube.com/watch?v=7EHngA4S3Ws>

Advantages of FT-ICR-MS are :

- sensitivity improves because the ions give rise to a detectable image charge during each passage of a detector plate;
- ion detection is nondestructive, i.e., ions are not lost upon detection giving the opportunity to perform MS/MS experiments.
- In addition, elongated recording of the FID allows for an extremely precise determination of all cyclotron frequencies, thereby yielding the **highest values of resolution and mass accuracy available**



Svantaggi: grandi magneti a basse temperature



Quantitative analysis of exhaled carbonyl compounds distinguishes benign from malignant pulmonary disease

Michael Bousamra II, MD,^a Erin Schumer, MS, MD,^a Mingxiao Li, PhD,^b Ralph J. Knipp, MS,^c Michael H. Nantz, PhD,^c Victor van Berkel, MD, PhD,^a and Xiao-An Fu, PhD^b

Objectives: The analysis of exhaled breath is a promising noninvasive tool for the diagnosis of lung cancer, but its clinical relevance has yet to be established. We report the analysis of exhaled volatile carbonyl compounds for the identification of specific carbonyl cancer markers to differentiate benign pulmonary disease from early-stage lung cancer and to compare its diagnostic accuracy with positron emission tomography (PET) scans.

Methods: Aminoxy-coated silicon microchips were used for the selective capture of exhaled carbonyls by an oximation reaction. Breath samples were collected then directed through the silicon chips by applying a vacuum. Carbonyl adducts were analyzed by Fourier transform mass spectrometry. Eighty-eight control subjects, 107 patients with lung cancer (64 stage 0, I, or II), 40 patients with benign pulmonary disease, and 7 patients with a solitary pulmonary metastasis participated. Analysis of cancer markers was performed blinded to the pathologic results.

Results: Four carbonyls were defined as cancer markers with significantly higher concentrations in patients with lung cancer. The number of increased cancer markers distinguished benign disease from both early and stage III and IV lung cancer. For early-stage disease, defining greater than 2 increased markers as diagnostic of lung cancer resulted in 83% sensitivity and 74% specificity. PET scans for this same cohort resulted in 90% sensitivity but only 39% specificity. Markers normalized for 3 of the 4 markers after resection of the lung cancer.

Conclusions: Analysis of specific exhaled carbonyls can differentiate early lung cancer from benign pulmonary disease. Breath analysis was more specific than PET for a lung cancer diagnosis. Judicious use of these data may expedite the care of patients with lung cancer. (*J Thorac Cardiovasc Surg* 2014;148:1074-81)

“Nuovi” strumenti «Gli» Orbitrap

Un rapido aumento di voltaggio dell'elettrodo centrale attrae lo ione verso lo stesso. Se lo ione entra con un certo angolo, viene spinto dalle radiofrequenze a ruotare avanti e indietro lungo l'elettrodo centrale.

Può essere utilizzato come un analizzatore distruttivo o non distruttivo.

Nel primo caso il rivelatore è collegato all'elettrodo esterno e registra il segnale periodico dovuto all'oscillazione assiale degli ioni come corrente immagine. Questa viene poi convertita in uno spettro di frequenze con la [trasformata di Fourier](#).

Nel secondo caso il rivelatore è all'uscita dell'analizzatore, si applica un potenziale tale per cui lo ione con un determinato rapporto di m/z si muove con una traiettoria instabile e esce dall'analizzatore. Quello ione va al rivelatore, si può fare una scansione in questo modo facendo uscire uno alla volta tutti gli ioni.

Alexander Makarov

Past, Present and Future of Orbitrap Mass Spectrometry

<https://www.youtube.com/watch?v=pvgnOvhZU2A>

28-29 April 2014 Bremen, Germany

