

CHIMICA ANALITICA II

CON LABORATORIO

(AA 2018-19)

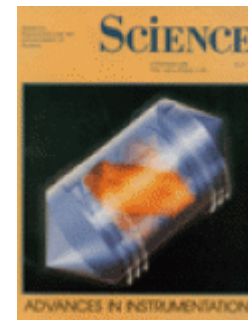
8 C.F.U. - Laurea triennale in Chimica

LA SPETTROMETRIA DI MASSA

INTRODUZIONE

La Spettrometria di Massa consiste nel “pesare” singole molecole tramite la loro trasformazione in ioni nel vuoto, e la misura della risposta delle loro traiettorie a campi elettrici, magnetici o entrambi

Fenn et al (1989): Science 246(4926):64-71

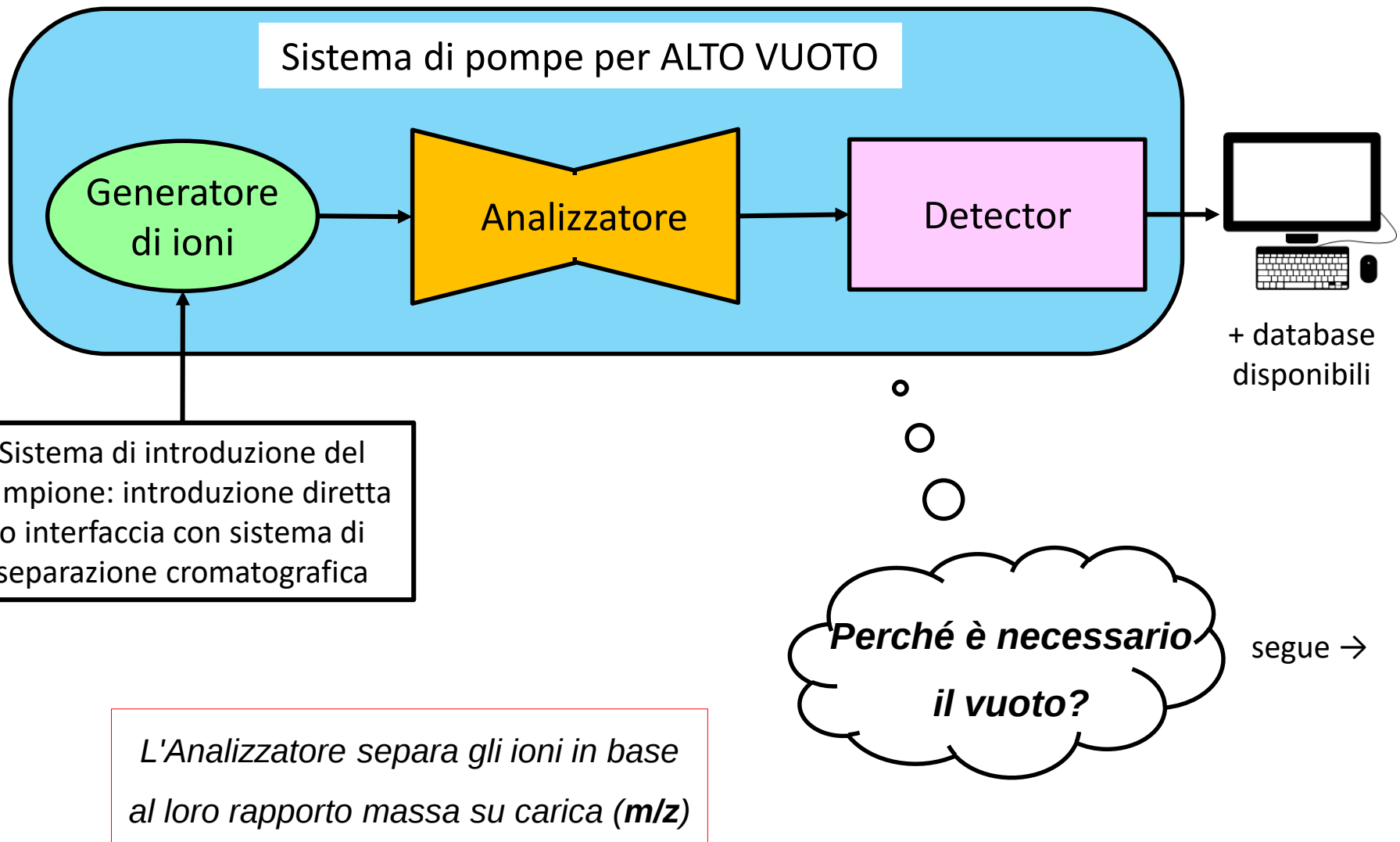


Uno spettrometro di massa è uno strumento che viene utilizzato per:

- 1) Generare ioni da elementi/composti con un metodo adatto;*
- 2) Separare questi ioni (nello spazio o nel tempo) in base al loro rapporto massa su carica (**m/z**)*
- 3) Rivelare gli ioni qualitativamente e quantitativamente in funzione del loro m/z*

La spettrometria di massa NON è una spettroscopia, perché NON coinvolge assorbimento o emissione di fotoni

Rappresentazione schematica di uno spettrometro di massa



Il cammino libero degli ioni

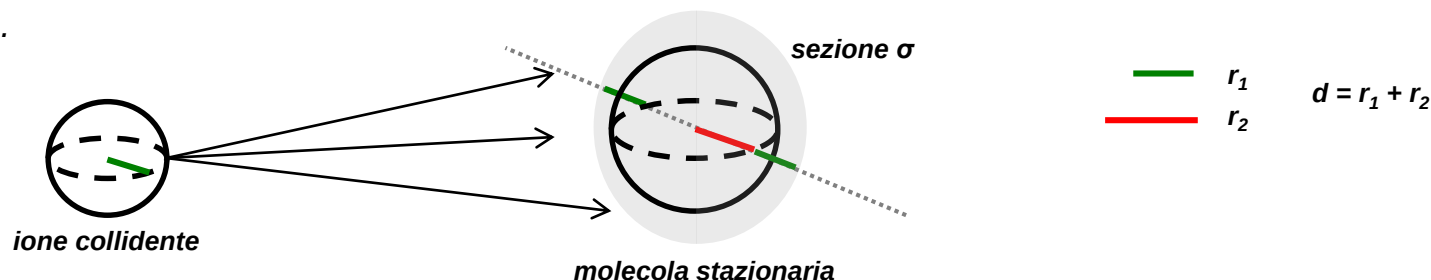
La condizione di **alto vuoto** è necessaria per consentire agli ioni di raggiungere il detector senza incorrere in collisioni con altre molecole gassose, poiché:

- a) le collisioni produrrebbero una deviazione della traiettoria e lo ione potrebbe perdere la sua carica andando a sbattere contro le pareti dello strumento;
- b) le collisioni con altre molecole potrebbero produrre reazioni non desiderate e quindi aumentare la complessità dello spettro di massa ottenuto.

Secondo la teoria cinetica dei gas il **cammino libero medio** L (in m) è dato da:

$$L = \frac{kT}{\sqrt{2}p\sigma}$$

dove k è la costante di Boltzmann, T è la temperatura (in K), p è la pressione (in Pa) e σ è l'**area della sezione di collisione** (in m^2) con $\sigma = \pi \cdot d^2$, dove d (in m) è la somma dei raggi dello ione collidente e della molecola stazionaria.



segue →

$$L = \frac{kT}{\sqrt{2}p\sigma}$$

N.B. la costante di Boltzmann $k = \frac{R}{N_A}$

con R = costante universale dei gas (espressa in $\text{J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)
 N_A = numero di Avogadro.

Si può approssimare il cammino libero medio di uno ione a condizioni normali in uno spettrometro di massa sostituendo nell'equazione soprastante: $k = 1.38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$, $T \sim 300 \text{ K}$, $\sigma \sim 45 \times 10^{-20} \text{ m}^2$ (in cui approssimativamente ad es. $r_1 = 1 \text{ \AA}$ e $r_2 = 3 \text{ \AA}$):

$$L = \frac{0.0065}{p}$$

con L in **m**, e p in **Pa**

$$L = \frac{5 \cdot 10^{-5}}{p}$$

con L in **m**, e p in **Torr**

Quindi, ad es. per garantire ad uno ione un cammino libero di 1 metro il vuoto deve essere di almeno $5 \cdot 10^{-5} \text{ Torr}$.

Tuttavia, a seconda del tipo di spettrometro di massa, in cui possono variare i diversi dispositivi di generazione di ioni e separazione degli stessi, possono essere necessarie condizioni di vuoto diverse.

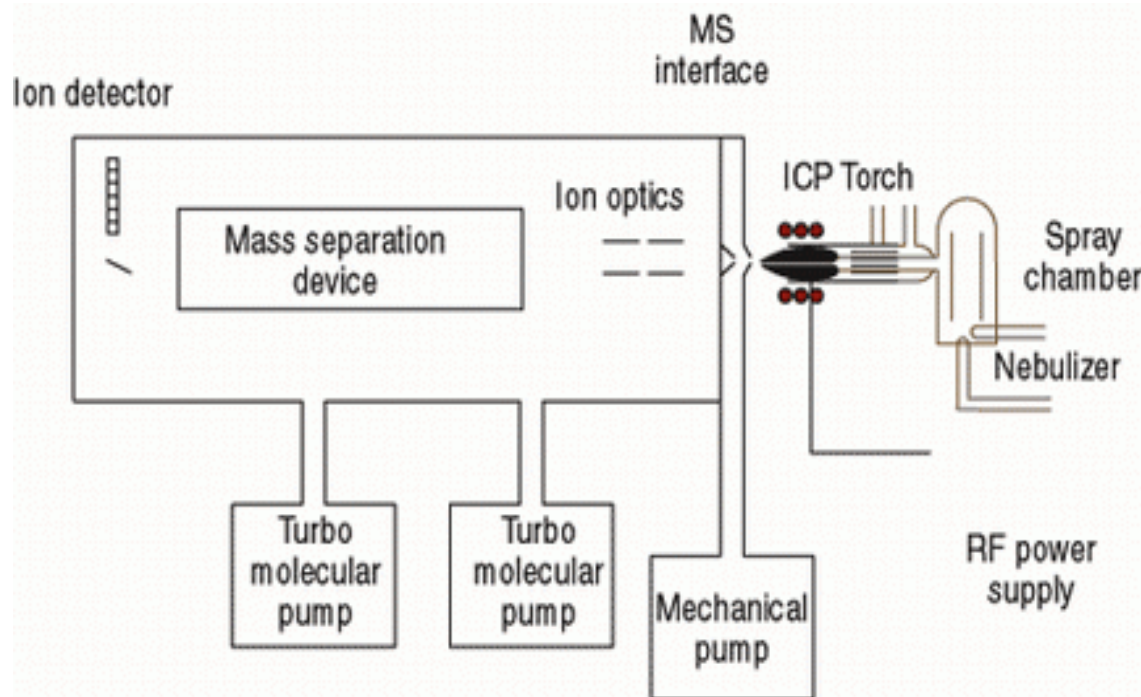
I sistemi di generazione del vuoto utilizzano delle pompe meccaniche in accoppiata con pompe turbomolecolari (o a diffusione o criogeniche). Le pompe meccaniche portano il sistema a circa 10^{-3} Torr , poi si attivano gli altri tipi di pompe che possono portare il sistema anche fino a circa 10^{-10} Torr .

La spettrometria di massa inorganica

La spettrometria di massa inorganica consente di effettuare l'analisi elementare qualitativa e quantitativa dei campioni. In questa tecnica non c'è necessità di rilevare ioni più grandi di 300 u (al contrario della spettrometria di massa organica, che verrà discussa in seguito).

Invece è di grande interesse riuscire a rilevare ioni con massa < 10 u.

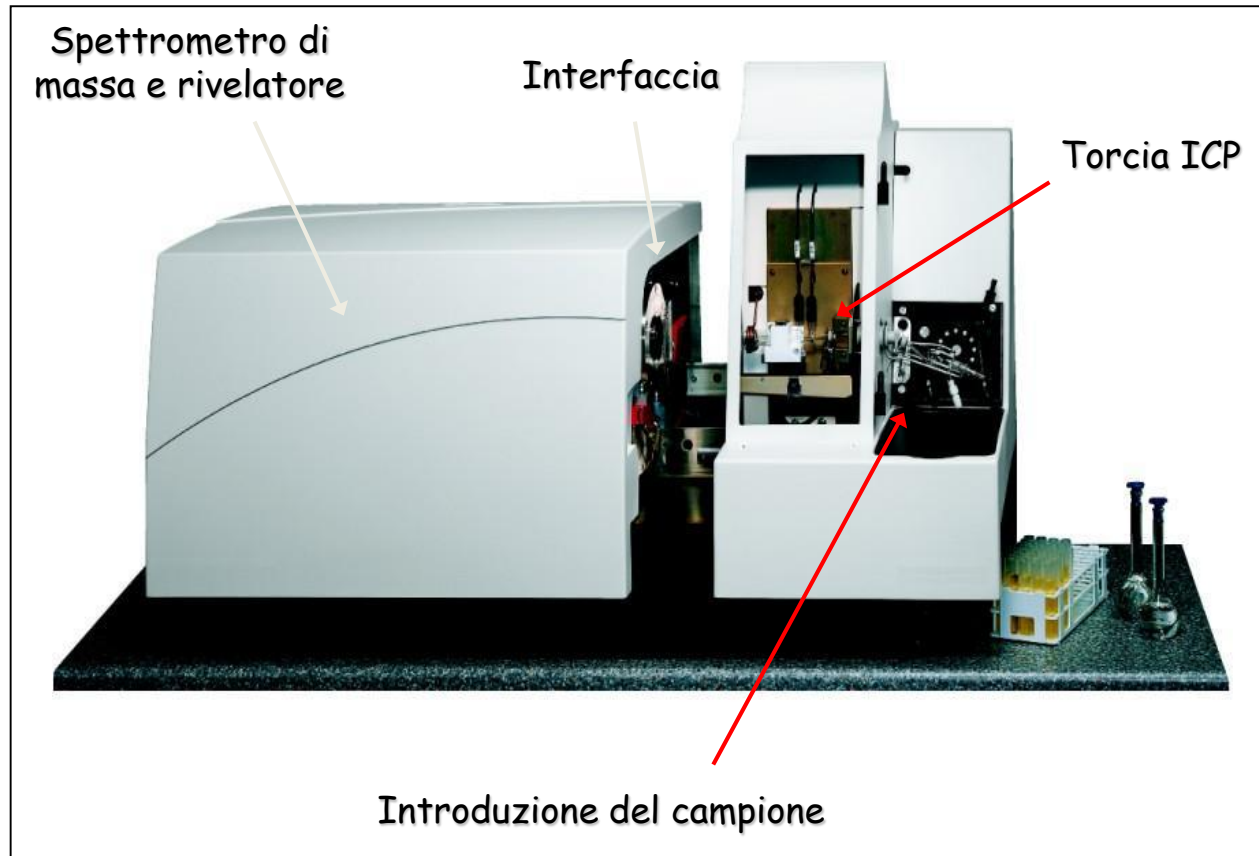
In questo tipo di tecnica il più diffuso dispositivo di GENERAZIONE DI IONI è il Plasma Induttivamente Accoppiato (ICP). In successione è presente un Analizzatore (separatore di ioni in base a m/z) e un Detector. I diversi tipi di Analizzatori e Detector sono comuni con la spettrometria di massa organica e verranno discussi in seguito.



segue →

Caratteristiche tecniche

- *tecniche distruttive (1500-8000 °C);*
- *si determinano elementi;*
- *si analizzano liquidi, solidi se disciolti;*
- *analisi totale del campione;*
- *risultati espressi in concentrazione;*
- *ottima sensibilità (ng/l)*



segue →

	ICP-MS	ICP-AES	Flame AAS	GFAAS
Detection limits	Excellent for most elements	Very good for most elements	Very good for some elements	Excellent for some elements
Sample throughput	all elements 2-6 min/sample	5-30 elements /min/sample	15 seconds/ element/sample	4 mins/element /sample
Linear dynamic range	10 ⁵ (10 ⁸ with range ext'n)	10 ⁵	10 ³	10 ²
Precision Short term Long term (4hrs)	1-3% <5%*	0.3-2% <5%*	0.1-1%	1-5%
* precision improves with use of internal standards				
Interferences Spectral Chemical (matrix) Ionization Mass effects Isotopes	few moderate minimal high on low yes	common almost none minimal NA no	almost none many some NA no	few many minimal NA no
Dissolved solids (maximum tolerable concentration)	0.1-0.4%	2-25%	0.5-3%	>20%
No. of elements	>75	>73	>68	>50
Sample usage	low	high	very high	very low
Semi-quantitative analysis	yes	yes	no	no
Isotope analysis	yes	no	no	no
Routine operation	easy	easy	easy	easy
Method development	skill required	skill required	easy	skill required
Unattended operation	yes	yes	no	yes
Combustible gases	no	no	yes	no
Operating cost	high	high	low	medium
Capital cost	very high	high	low	medium/high

Differenza di sensibilità per le diverse tecniche:

- mg/l per FAAS e FAES;
- µg/l per GFAAS e ICP-AES;
- ng/l per ICP-MS

segue →

Limiti di rilevabilità

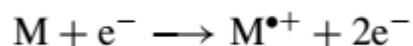
Table 3. Detection limit comparison (µg/L)

Element	ICP-MS	ICP-AES	Flame AAS	GFAAS
As	<0.050	<20	<500	<1
Al	<0.010	<3	<50	<0.5
Ba	<0.005	<0.2	<50	<1.5
Be	<0.050	<0.5	<5	<0.05
Bi	<0.005	<20	<100	<1
Cd	<0.010	<3	<5	<0.03
Ce	<0.005	<15	<200000	ND
Co	<0.005	<10	<10	<0.5
Cr	<0.005	<10	<10	<0.15
Cu	<0.010	<5	<5	<0.5
Gd	<0.005	<5	<4000	ND
Ho	<0.005	<1	<80	ND
In	<0.010	<30	<80	<0.5
La	<0.005	<0.05	<4000	ND
Li	<0.020	<1	<5	<0.5
Mn	<0.005	<0.5	<5	<0.06
Ni	<0.005	<10	<20	<0.5
Pb	<0.005	<20	<20	<0.5
Se	<0.10	<50	<1000	<1.0
Tl	<0.010	<30	<40	<1.5
U	<0.010	<30	<100000	ND
Y	<0.005	<0.5	<500	ND
Zn	<0.02	<1.0	<2	<0.01
ICP-MS, ICP-AES, Flame AAS:	Detection limits (defined on the basis of 3 standard deviations of the blank)			
GFAAS:	Sensitivity (0.0044 absorbance) measured with 20 µL of sample			
ND:	Not determined			

La spettrometria di massa organica

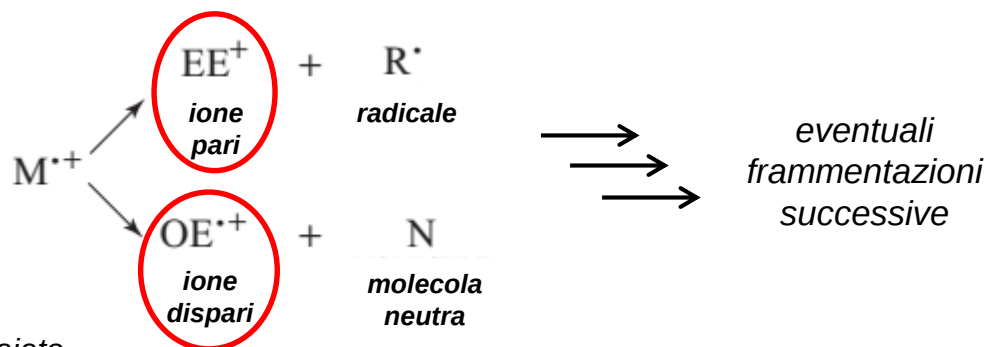
La spettrometria di massa organica consente di identificare e quantificare specie molecolari. Come già anticipato, le molecole vengono ionizzate, quindi con questa tecnica vengono identificati e quantificati i diversi ioni formati in base al loro rapporto **m/z**.

Supponiamo che una molecola venga ionizzata con l'ausilio di un fascio di elettroni:



La ionizzazione porta alla formazione di un catione radicale $M^{\bullet+}$ che possiede un certo rapporto m/z , quindi può essere rivelato dal detector. $M^{\bullet+}$ è detto anche "ione molecolare". Questo ione, a seconda del tipo di ionizzatore utilizzato, può essere ulteriormente frammentato in così detti "ioni figli". In particolare, essendo $M^{\bullet+}$ un radicale catione a numero dispari di elettroni, la sua frammentazione può portare alla formazione di un catione+un radicale oppure di un catione radicale+molecola neutra:

Solo gli ioni
vengono rilevati
dal detector!!!



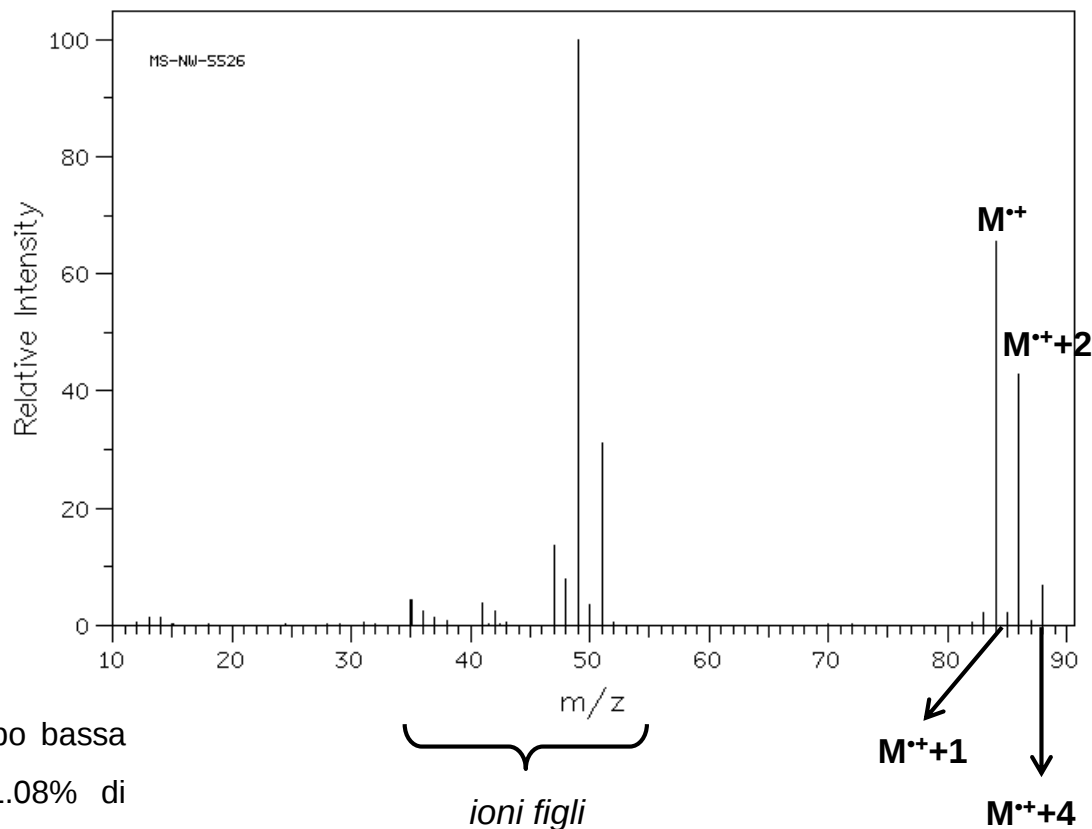
ione pari (even)=i. con elettroni appaiati
ione dispari (odd)=i. con un elettrone spaiato

segue →

Dato che molti elementi che si ritrovano in natura possono essere di- o poli-isotopici, se ne deduce che negli spettri di massa di molecole che contengono questi tipi di atomi si troverà riscontro delle abbondanze isotopiche:

Es. spettro di massa (con ionizzazione a impatto elettronico) del **CH₂Cl₂**, massa nominale = 84 u

Fonte: http://sdb.s.db.aist.go.jp/sdb.s/cgi-bin/direct_frame_top.cgi (free!!!)



M⁺ contiene 2 atomi di ³⁵Cl e 1 di ¹²C

M⁺+1 contiene 2 atomi di ³⁵Cl e 1 di ¹³C

M⁺+2 contiene 1 atomo di ³⁵Cl, 1 di ³⁷Cl e 1 di ¹²C

M⁺+4 contiene 2 atomi di ³⁷Cl e 1 di ¹²C

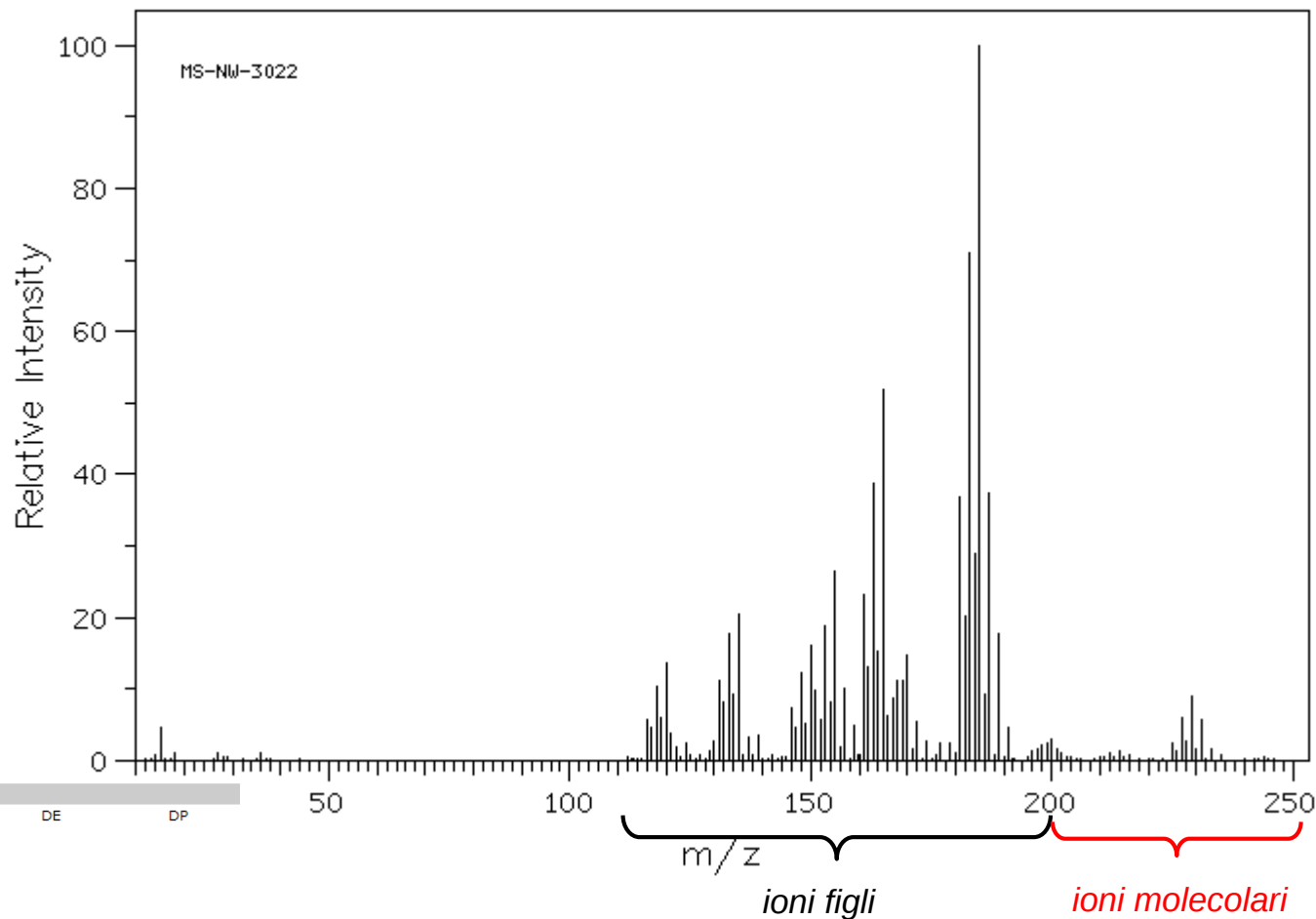
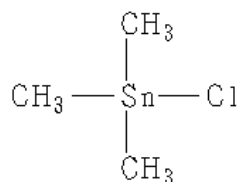
Altre combinazioni con il ¹³C hanno abbondanza troppo bassa per essere rilevate (considerando che il ¹³C ha 1.08% di abbondanza relativa, rispetto al 100% del ¹²C).

segue →

Es. spettro di massa (con ionizzazione a impatto elettronico) del trimetilstagno cloruro ($(CH_3)_3SnCl$,

massa nominale = 200 u

Fonte: http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi (free!!!)



Lo stagno ha 10 isotopi
stabili conosciuti in natura!

Isotopi più stabili					
iso	NA	TD	DM	DE	DP
112Sn	0,97%	Sn è stabile con 62 neutroni			
114Sn	0,65%	Sn è stabile con 64 neutroni			
115Sn	0,34%	Sn è stabile con 65 neutroni			
116Sn	14,54%	Sn è stabile con 66 neutroni			
117Sn	7,68%	Sn è stabile con 67 neutroni			
118Sn	24,23%	Sn è stabile con 68 neutroni			
119Sn	8,59%	Sn è stabile con 69 neutroni			
120Sn	32,59%	Sn è stabile con 70 neutroni			
121Snm		55anni	IT	0,006	121Sb
122Sn	4,63%	Sn è stabile con 72 neutroni	β-	0,394	
124Sn	5,79%	Sn è stabile con 74 neutroni			
126Sn	sintetico	1 · 10 ⁵ anni	β-	0,380	126Sb

iso = isotopo
NA = abbondanza in natura
TD = tempo di dimezzamento
DM = modalità di decadimento
DE = energia di decadimento in MeV
DP = prodotto del decadimento

segue →

Per un singolo composto => possibile alta complessità dello spettro di massa
(anche se si considerano solo i possibili ioni molecolari senza le frammentazioni!)

E per miscele di composti????



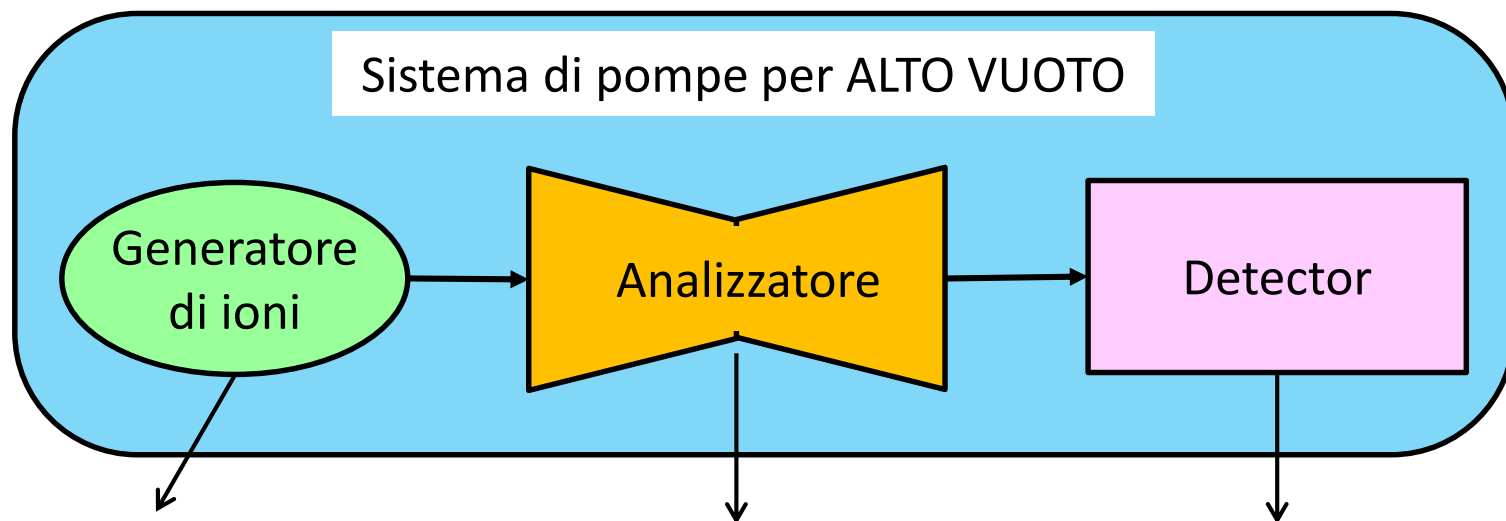
Software
per l'interpretazione



Database di
spettri di massa

P.S.: c'è un'altra possibilità → separare le miscele prima dell'introduzione nello spettrometro di massa
...to be continued... **!!!**

Possibili assetti strumentali di uno spettrometro di massa



- Impatto elettronico (EI)
- Ionizzazione Chimica (CI)
- Electrospray (ESI)
- CI a pressione atmosferica (APCI)
- FAB (*Fast Atom Bombardament*)
- MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*)

- Quadrupoli lineari (Q)
- Quadrupoli a trappole ioniche (QIT)
- Settori magnetici
- Tempo di volo (TOF)
- Risonanza ciclotronica (FT-ICR-MS)
- Orbitrap

- Faraday cup
- Elettromoltiplicatori
- Microchannel Plate (per TOF)
- Corrente Immagine (per FT-ICR e Orbitrap)

Generatori di ioni (o sistemi di ionizzazione)

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.

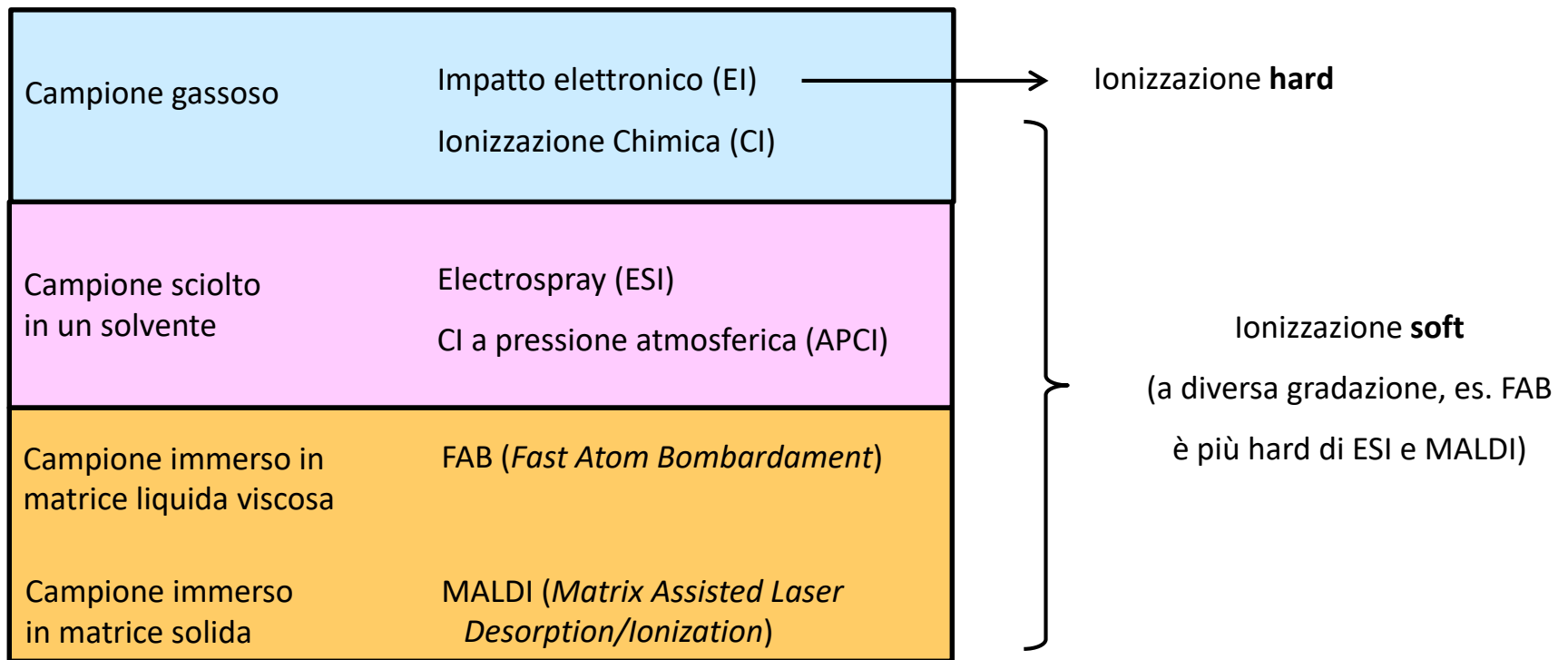
Il campione, che può essere solido, liquido o gassoso, viene introdotto in una camera da vuoto mediante un opportuno sistema di introduzione.

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.

segue →

I sistemi di ionizzazione possono essere classificati principalmente in due modi:

- a seconda **dello stato in cui deve essere il campione** quando viene introdotto nello strumento (gas, sciolto in un solvente, immerso in una matrice);
- a seconda **della quantità di energia di ionizzazione** che viene fornita al campione (molta → "hard ionization", poca → "soft ionization")



segue →

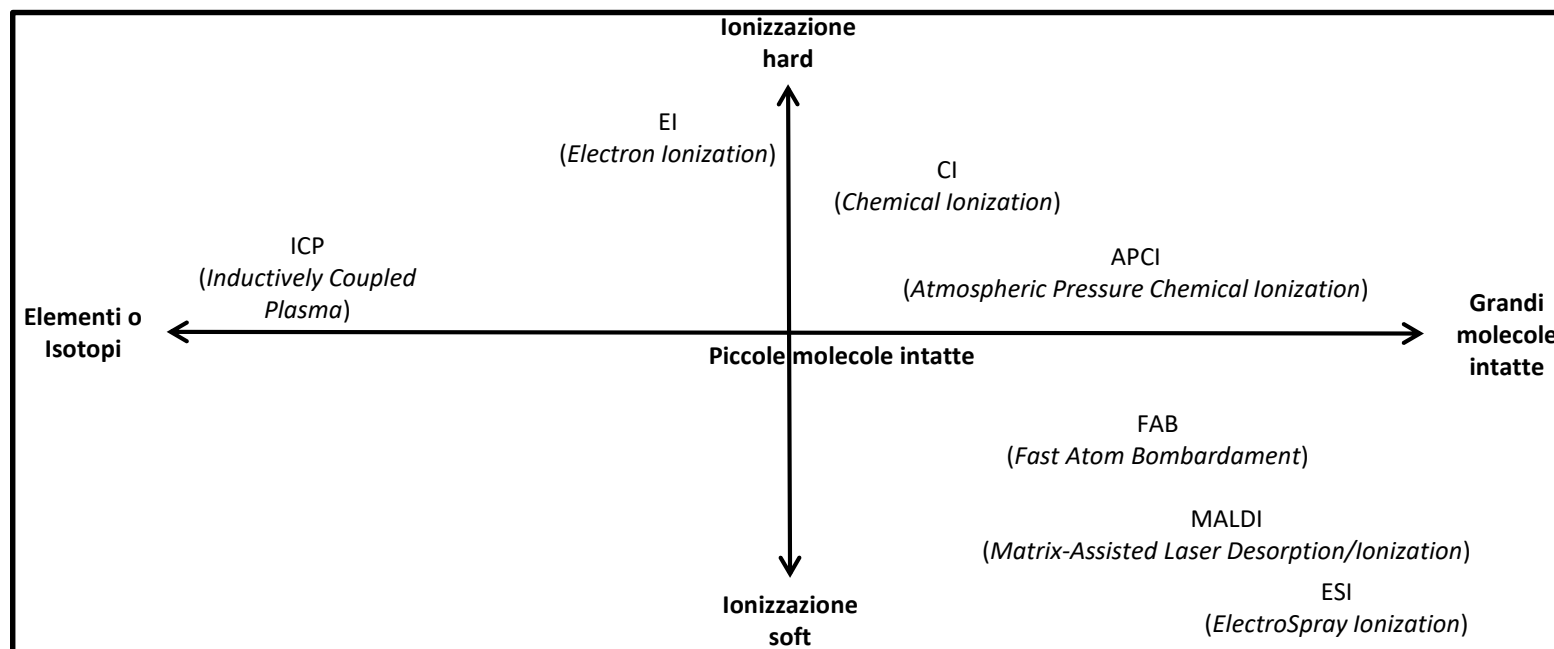
➤ **Ionizzazione hard:** un quantitativo rilevante di energia è trasferito allo ione analita durante il processo di ionizzazione, generando gli ioni molecolari e, per frammentazione, gli ioni figli.

E' possibile che tutti gli ioni molecolari vengano frammentati, quindi si perde l'informazione sulla massa dello ione, ma dai tipi di frammentazione avvenuta si possono ricavare informazioni strutturali sulla molecola.

➤ **Ionizzazione soft:** genera una frammentazione limitata fornendo quindi informazione sulla massa molecolare. 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 $[M - H]^-$. Le due modalità (positiva e negativa) possono generare informazioni complementari sulla molecola.



Ionizzazione elettronica (EI)

Un fascio di elettroni viene fatto passare attraverso il campione (allo stato gassoso). Gli elettroni collidono con le molecole neutre di analita producendo gli ioni molecolari M^{*+} (cationi radicale) che vengono ulteriormente frammentati in ioni figli. Generalmente vengono utilizzati elettroni con energia di 70 eV.

Questo metodo produce spettri di massa molto riproducibili (a parità di energia fornita dagli elettroni) che forniscono informazioni strutturali sulla molecola (tramite le frammentazioni), poiché lo schema delle frammentazioni è tipico per ogni specie molecolare.

Questo metodo consente di creare dei database di spettri di massa di sostanze che sono utilizzabili per il riconoscimento delle stesse utilizzando un qualsiasi strumento con il medesimo assetto strumentale e a parità di energia degli elettroni utilizzati.

La sorgente consiste in un filamento riscaldato che emette elettroni.

Gli elettroni vengono accelerati verso un anodo e collidono con le molecole di campione (allo stato gassoso) che sono state iniettate nella camera di ionizzazione.

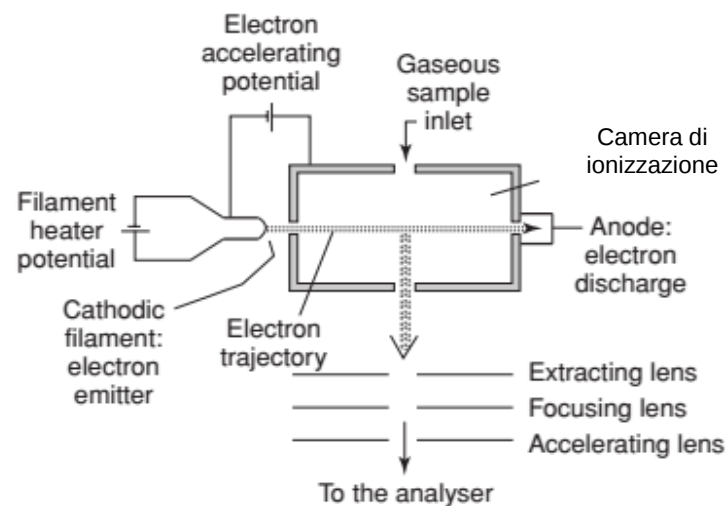


Figure 1.1
Diagram of an electron ionization source.

Ionizzazione chimica (CI)

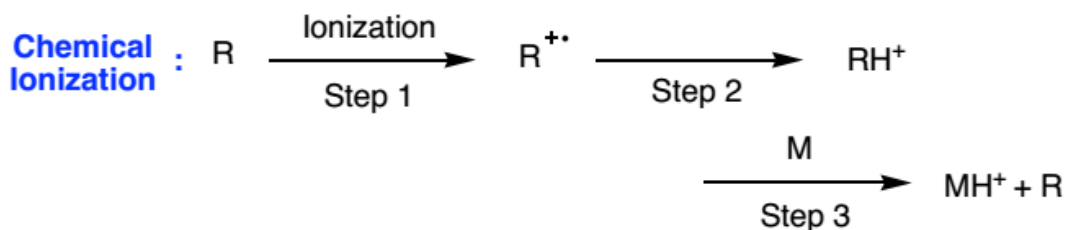
Gli analiti sono ionizzati da reazioni ione-molecola in fase gassosa.

Per ottenere ciò un gas reagente (di solito metano, iso-butano, ammoniaca o acqua) è inserito nella sorgente di ioni a pressione relativamente alta (1-250 Pa) e gli ioni gassosi reagenti sono prodotti per impatto elettronico.

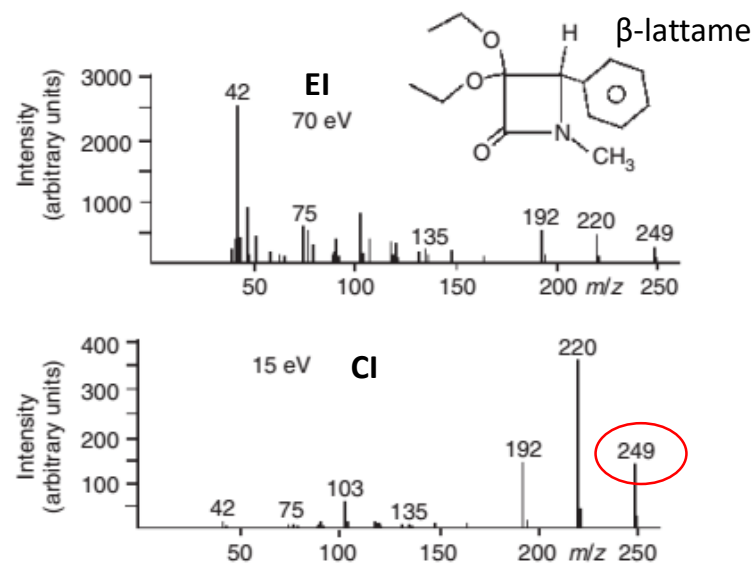
Le molecole di analita sono ionizzate indirettamente attraverso una serie di reazioni con il gas reagente, attraverso il quale solo un piccolo quantitativo di energia è trasferito alle molecole tramite collisioni.

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 database.



reagent gas (R)	molecular ion	reactive reagent ion
H ₂	H ₂ ^{+\bullet}	H ₃ ⁺
C ₄ H ₁₀	C ₄ H ₁₀ ^{+\bullet}	C ₄ H ₁₁ ⁺
NH ₃	NH ₃ ^{+\bullet}	NH ₄ ⁺
CH ₃ OH	CH ₃ OH ^{+\bullet}	CH ₃ OH ₂ ⁺
NO	NO ^{+\bullet}	NO ⁺



El e CI sono tecniche che danno informazioni complementari

ElectroSpray Ionization (ESI)

Si basa sulla nebulizzazione di un liquido e la successiva generazione di ioni dalle goccioline. La nebulizzazione avviene a pressione atmosferica.

Lo spray viene prodotto applicando un forte campo elettrico, a pressione ambiente, a un liquido che passa attraverso un tubo capillare con un debole flusso (circa $1\text{-}10\ \mu\text{l min}^{-1}$).

Il campo elettrico si ottiene applicando una differenza di potenziale tra il capillare e il contro-elettrodo.

Il campo elettrico induce un accumulo di carica alla superficie del liquido che si trova alla punta del capillare, che consente la separazione del liquido in gocce multi-carica.



Le gocce passano attraverso un flusso laminare di azoto riscaldato per la rimozione delle molecole di solvente.

La formazione delle gocce inizia ad un determinato voltaggio, in dipendenza della tensione superficiale del solvente.

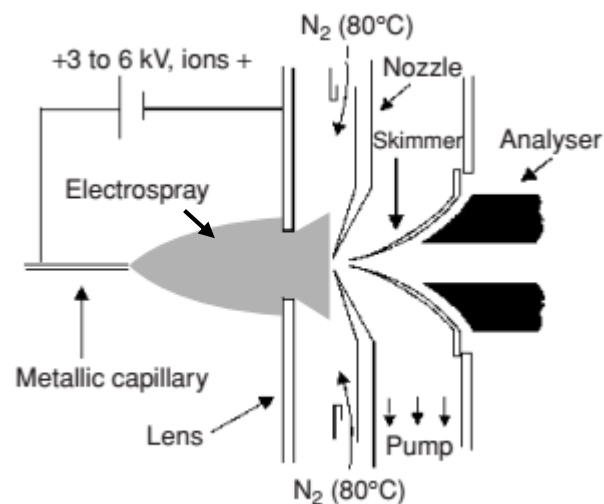


Diagramma della sorgente electrospray, che usa dei restringimenti (*skimmer*) per la focalizzazione degli ioni e un flusso laminare di azoto riscaldato per la desolvatazione.

segue →

La teoria della formazione degli ioni dallo spray, che coinvolge diversi principi fisici, è ancora dibattuta al giorno d'oggi. Comunque si ritiene un fatto consolidato che la formazione degli ioni avvenga attraverso i seguenti passaggi:

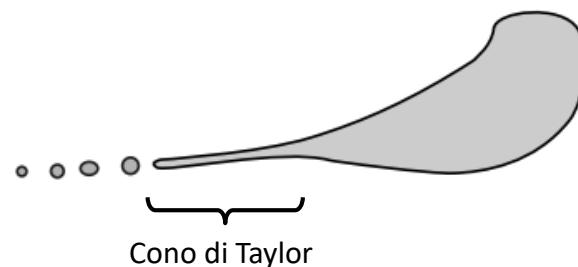
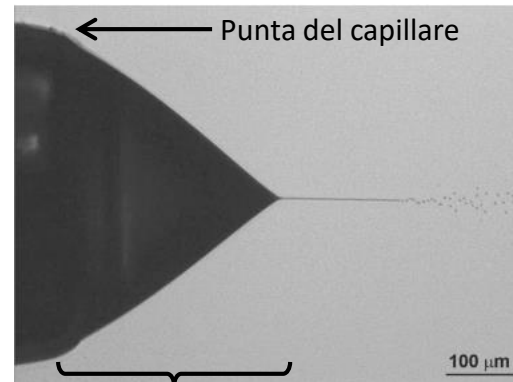
- i) generazione di un spray caricato elettricamente;
- ii) drastica riduzione della grandezza delle gocce per desolvatazione;
- iii) liberazione degli ioni dalla superficie delle gocce.

Una goccia staccatasi dalla punta del capillare, cioè dal così detto "cono di Taylor", che si forma a causa della presenza del campo elettrico, è detta di "prima generazione" e ha un diametro di circa $1.5\ \mu\text{m}$ e porta circa 50'000 cariche.

A causa della presenza del campo elettrico le cariche all'interno della goccia si spostano deformando la goccia stessa, fino a formare un cono di Taylor sulla goccia, da cui si staccano delle "gocce figlie" di circa $0.1\ \mu\text{m}$ di diametro e che portano circa 300-400 cariche, con un fattor moltiplicativo di densità di carica di circa 7.

Da qui avviene un processo a cascata di formazione di "gocce figlie" sempre più piccole (e contenenti sempre meno solvente), quindi con sempre maggiore densità di carica finché il campo elettrico alla superficie delle gocce risulta abbastanza elevato da consentire l'espulsione degli ioni molecolari desolvatati dalla superficie delle gocce.

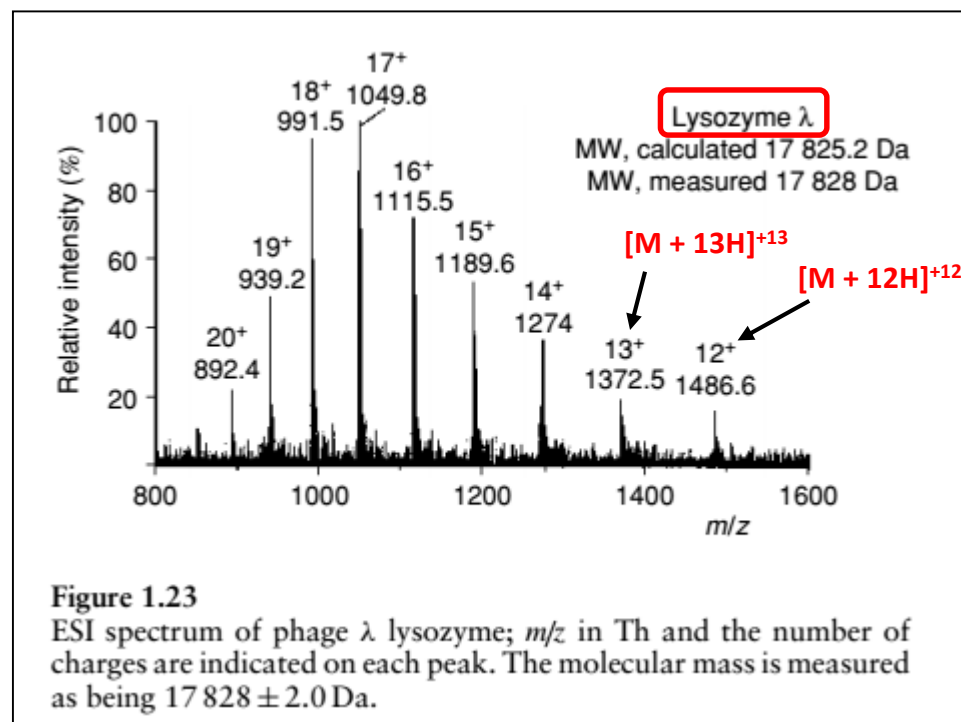
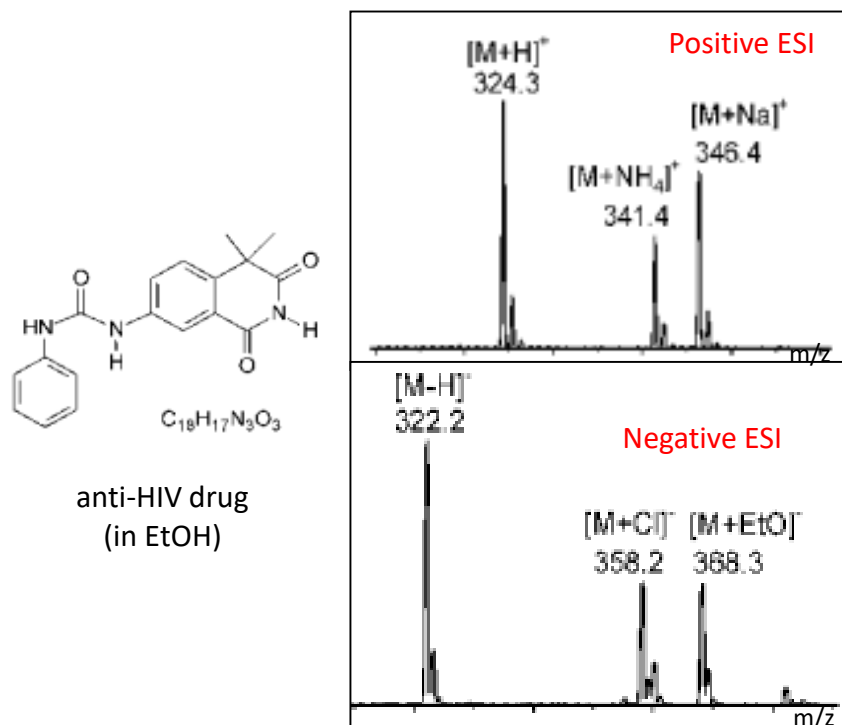
Il tempo che intercorre tra la formazione della prima goccia dal capillare e l'espulsione degli ioni è di meno di un millisecondo!!!



ESI viene utilizzata per identificare e misurare la massa di specie molecolari che possiedono siti ionizzabili (positivi o negativi). I cationi e gli anioni vengono acquisiti dalla molecola sono presenti nel solvente in cui è sciolto il campione.

ESI è in grado di desolvatare ioni molecolari carichi positivamente o negativamente (a seconda della modalità in cui si opera).

Di solito gli ioni prodotti da molecole molto grandi (es. proteine) sono multi-carica poiché esse possiedono molti siti ionizzabili, mentre quelli di molecole relativamente piccole sono monocarica.



$$1 \text{ Thomson} = 1 \text{ Th} = 1 \text{ u/e} = 1.036\,426 \times 10^{-8} \text{ kg C}^{-1}$$

Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)

Si basa su principi analoghi a CI (ionizzazione chimica), tuttavia il campione viene iniettato tramite una soluzione e non allo stato gassoso. I dispositivi per EI, se progettati appropriatamente, possono operare anche in modalità CI. Allo stesso modo dispositivi ESI possono operare anche in modalità APCI.

La differenza principale è che ESI ha bisogno di flussi molto bassi di soluzione (circa $1-10 \mu\text{l min}^{-1}$), mentre APCI di flussi molto più elevati (circa $200-1000 \mu\text{l min}^{-1}$).

In APCI il processo di desolvatazione avviene per riscaldamento (500°C), tuttavia il passaggio nella "cartuccia riscaldata" è veloce, quindi le molecole non riescono a raggiungere l'equilibrio termico, pertanto anche molecole termicamente labili possono essere analizzate con questa tecnica.

APCI è utile perché, al contrario di ESI, è in grado di generare attivamente ioni da molecole neutre.

Tipicamente **la scarica elettrica per effetto corona genera ioni N_2^+ o O_2^+** . **Questi reagiscono con il solvente allo stato gassoso, il quale forma ioni di gas reagente che ionizzano gli analiti presenti.**

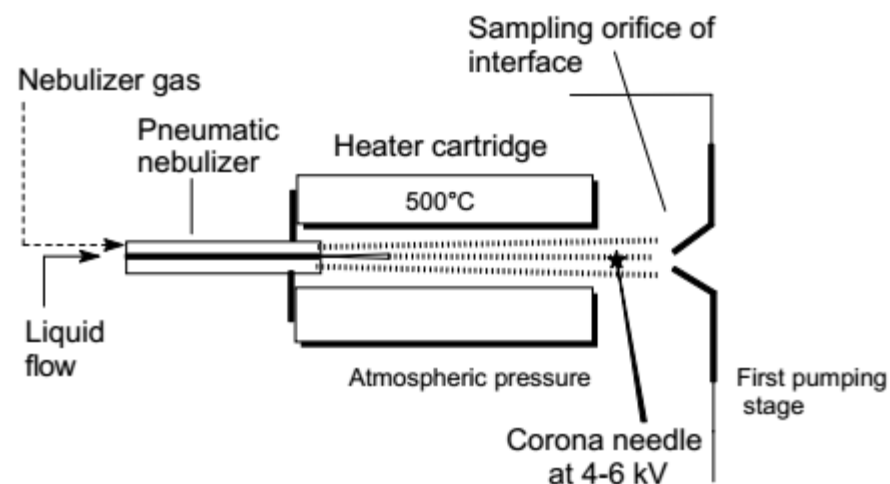


Diagramma della sorgente APCI. Il flusso di liquido viene spruzzato pneumaticamente in un vaporizzatore riscaldato, dove la ionizzazione viene iniziata per effetto corona a pressione atmosferica.