CHIMICA ANALITICA II

CON LABORATORIO

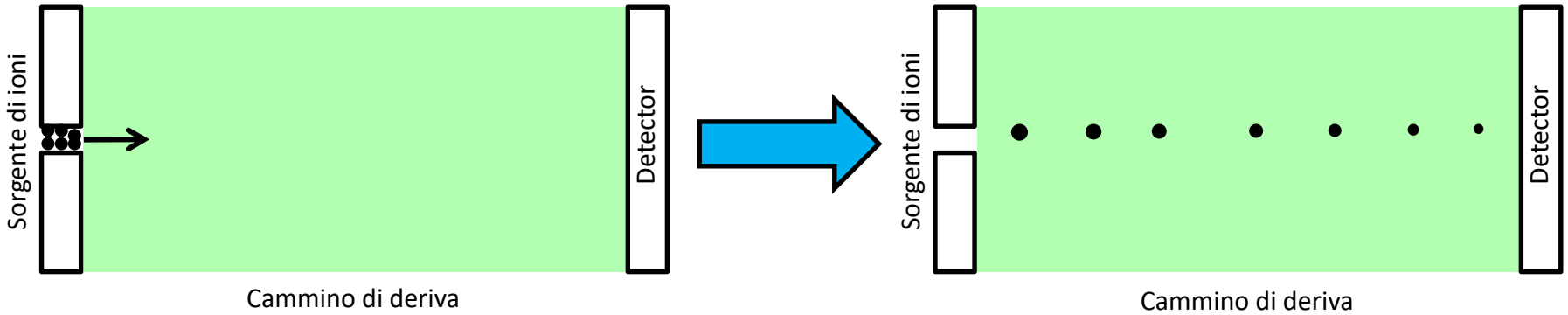
(AA 2018-19)

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

Analizzatori a Tempo di Volo (Time Of Flight Analyzer - TOF)

Il principio del TOF è semplice: ioni con differente m/z vengono separati nel tempo durante il loro volo lungo un cammino di deriva in assenza di campi elettrici e magnetici di lunghezza nota.

Se gli ioni iniziano il cammino nello stesso istante gli ioni più leggeri arriveranno prima al detector rispetto agli ioni più pesanti.



I TOF possono essere di tre tipi in base alle caratteristiche del dispositivo e della sua operatività:

Linear-TOF (LTOF) ***ReTOF (Reflectron-TOF)*** ***Orthogonal Acceleration TOF (oaTOF)***

Il sistema di ionizzazione d'elezione per questi analizzatori è il **MALDI** (Matrix-assisted laser desorption/ionization

MALDI è ideale per TOF perché consente la produzione di impulsi (pacchetti) di ioni

Può essere accoppiato con diversi sistemi di ionizzazione

E. de Hoffmann, V. Stroobant – Mass Spectrometry: Principles and Applications - WILEY
J.H. Gross – Mass spectrometry: a textbook - Springer

Teoria del tempo di volo di una massa in un TOF

La carica elettrica (q) di uno ione di massa (m_i) è uguale ad un numero intero (z) di cariche elettroniche (e), quindi q = ez. L' energia E_{el} acquisita dallo ione che si muove attraverso un voltaggio U è data 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 la velocità dello ione (v) è inversamente proporzionale alla radice quadrata della massa dello ione (m_i). Uno ione a m/z sconosciuto, dopo essere stato accelerato da un voltaggio U, percorre una determinata distanza (s) in un tempo (t) dato da:

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

quindi (t) è il tempo necessario allo ione per percorrere la distanza (s) a velocità costante, cioè, in un ambiente privo di campi elettrici o magnetici (cammino di deriva) dopo che il processo di accelerazione è stato completato.

segue →

E. de Hoffmann, V. Stroobant – Mass Spectrometry: Principles and Applications - WILEY
J.H. Gross – Mass spectrometry: a textbook - Springer

Riarrangiando l'equazione precedente si ottiene la relazione tra m_i/z e i parametri strumentali s e U e il valore di t ottenuto sperimentalmente:

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

Riarrangiando la precedente si ottiene che il tempo di deriva (t) attraverso una lunghezza fissa (s) di spazio libero da campi elettrici/magnetici è proporzionale alla radice quadrata di m_i/z:

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

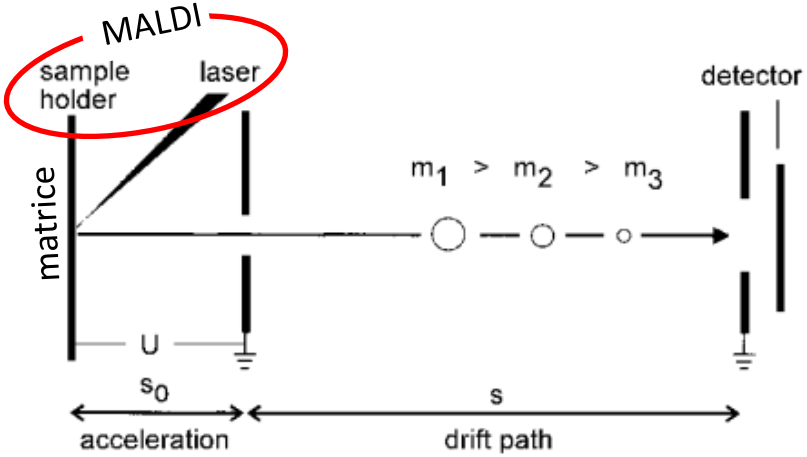
pertanto, l'intervallo di tempo Δt tra i tempi di arrivo di ioni a diverso m/z è proporzionale a $s \cdot (m_i/z_1^{1/2} - m_i/z_2^{1/2})$.

<u>La proporzionalità tra tempo di volo e la radice quadrata di m/z fa sì che il Δt per una data Δm/z diminuisca all'aumentare del valore di m/z</u>: alle medesime condizioni, un Δt che corrisponde ad un Δm/z = 1 u per m/z = 20 è uguale a 114 ns, a m/z = 200 è uguale a 36 ns mentre a m/z = 2000 è di soli 11 ns.

<u>Pertanto, la realizzazione di un analizzatore di massa a tempo di volo dipende dalla capacità di misurare brevi intervalli di tempo con sufficiente accuratezza.</u>

Linear-TOF (LTOF)

E' il più semplice assetto strumentale di un TOF. Gli ioni vengono estratti da una matrice tramite un laser (ionizzazione MALDI), accelerati con un voltaggio U fino all'ingresso del cammino libero di deriva. Il cammino (s) è lungo circa 1-2 m. Gli ioni formatisi durante l'impulso laser vengono continuativamente estratti e accelerati dal momento in cui passano dalla matrice alla fase gas. La trasmittanza di un LTOF si avvicina la 90%.



Limiti del LTOF:

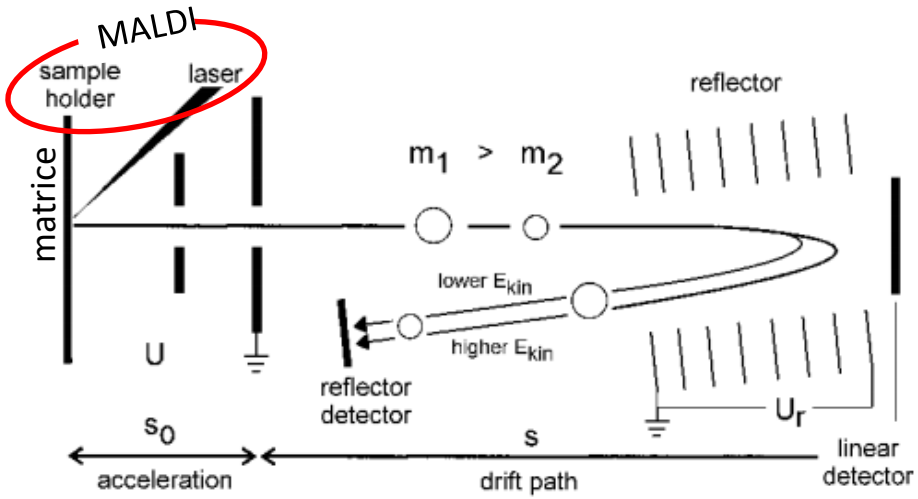
- *essendo che ad alte m/z una differenza Δm/z = 1 u comporta una variazione di tempo di volo Δt dell'ordine dei 10 ns, bisogna considerare che in un MALDI equipaggiato con un laser UV standard il tempo di estrazione degli ioni dalla matrice è di circa 10-50 ns, conseguentemente la variazione nei tempi di partenza di ioni con stesso m/z può essere superiore alla differenza in tempo di volo, con il conseguente peggioramento della risoluzione del LTOF.*
- *Gli ioni desorbiti tramite laser possiedono una energia di alcune decine di eV che si va ad aggiungere al voltaggio imposto per l'accelerazione degli ioni nel LTOF (10-30 kV) con la conseguenza che gli ioni che "partono" non possiedono tutti la stessa energia cinetica, quindi ioni a stesso m/z possono arrivare al detector con tempi diversi.*

Tutti questi effetti insieme limitano la risoluzione a R~ 500

J.H. Gross – Mass spectrometry: a textbook - Springer

Reflectron-TOF (ReTOF)

Il ReTOF è stato ideato per ovviare al difetto del LTOF di avere bassa risoluzione a causa della dispersione di energia cinetica tra ioni con stesso m/z entranti nella zona di cammino libero, che comporta una differenza Δt all'arrivo al detector NON correlata a differenze di m/z.



Nel Re-TOF il riflettore è posto alla fine del cammino libero. E' composto da una serie di elettrodi a forma di anello a potenziale via via maggiore quanto più sono posti lontano rispetto alla sorgente di ioni. Il loro voltaggio U_r è circa 1.05-1.10 volte il voltaggio U (di accelerazione degli ioni) per assicurare la riflessione di tutti gli ioni in arrivo.

Il riflettore è capace di riallineare (nel tempo) ioni con stesso m/z ma diversa energia cinetica E_{kin}. Gli ioni con E_{kin} più alta penetreranno all'interno del riflettore più a fondo rispetto a ioni con E_{kin} minore, con il risultato che poi tutti gli ioni con stesso m/z usciranno nello stesso momento dal riflettore per raggiungere il detector.

Questo effetto aumenta il potere risolvente del ReTOF rispetto a LTOF, permettendo di ottenere delle composizioni isotopiche risolte anche per molecole con m/z > 500.

DANI
A SCENT OF FUTURE

DANI MASTER TOF-MS PLUS Detector

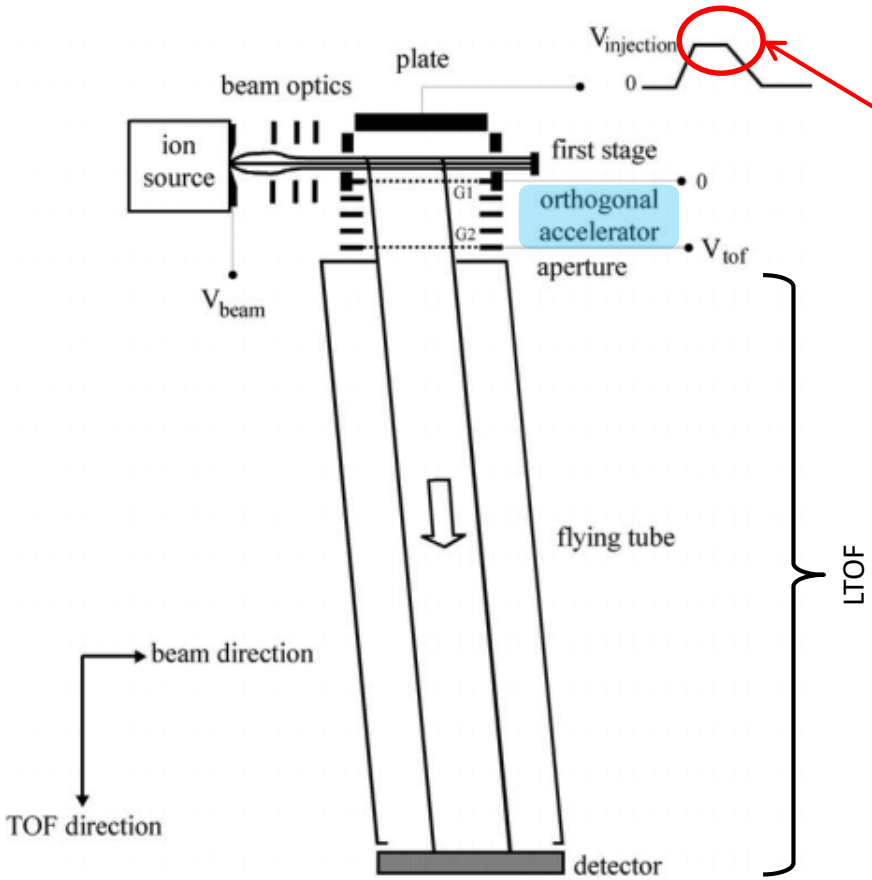
Technical Specifications

TOF-MS PLUS DETECTOR	
Detector Type	Time of Flight MS
Mass Range	5 to 1024u
Scan Rate	30,000 spectra/s (up to 1,000 Hz written to disk)
Resolution	2000 FWHM (Unit mass resolution)
Mass Accuracy	0.1u
Maximum Sensitivity	1 pg OFN S/N RSM > 600:1 Full Mass Range (evaluated on extracted m/z 272) High sensitive mode: 0.1 pg S/N RSM > 100:1 (High ETP Gain and reduced dynamic range)
Maximum Linearity	10^5 (0.05 pg to 10 ng OFN)
Tune Modes	One-click AutoTune and Manual Tune
Ion Source Mode	EI - Electronic Impact
Ion Source Type	Inert EI source
Maximum Source Temperature	250°C
Detector	High Speed Electron Multiplier
Filaments	Dual filament assembly
Maximum Transfer Line Temperature	350°C
Vacuum System	n.1 Internal Oil-free Diaphragm Pump n.2 Internal Turbo-molecular Pumps (260 L/s and 70 L/s)

Octafluoronaphthalene | C10F8

Orthogonal Acceleration -TOF (oaTOF)

L'oaTOF è stato ideato per essere accoppiato anche con sistemi di ionizzazione che producono ioni in modo continuo (e non solo pulsato come MALDI). <u>In linea di principio oaTOF può essere accoppiato con qualsiasi sistema di ionizzazione</u>. L'oaTOF è capace di estrarre ioni da una sorgente continua in modo pulsato, quindi non è più necessario che sia lo ionizzatore accoppiato al TOF a produrre gli impulsi di ioni.



i) Gli ioni focalizzati in uscita dallo ionizzatore flussano in modo continuo nello spazio tra il "plate" (inizialmente a voltaggio $V_{injection}$ = 0) e la griglia G1.

ii) Poi viene applicato un potenziale $V_{injection}$ che genera un campo elettrico tra il "plate" e G1 in direzione perpendicolare a quella di cammino degli ioni che vengono quindi deviati ortogonalmente verso G2.

iii) In G2 agli ioni viene applicato un potenziale V_{tof} = U che accelera gli ioni fino al cammino libero che porta al detector.

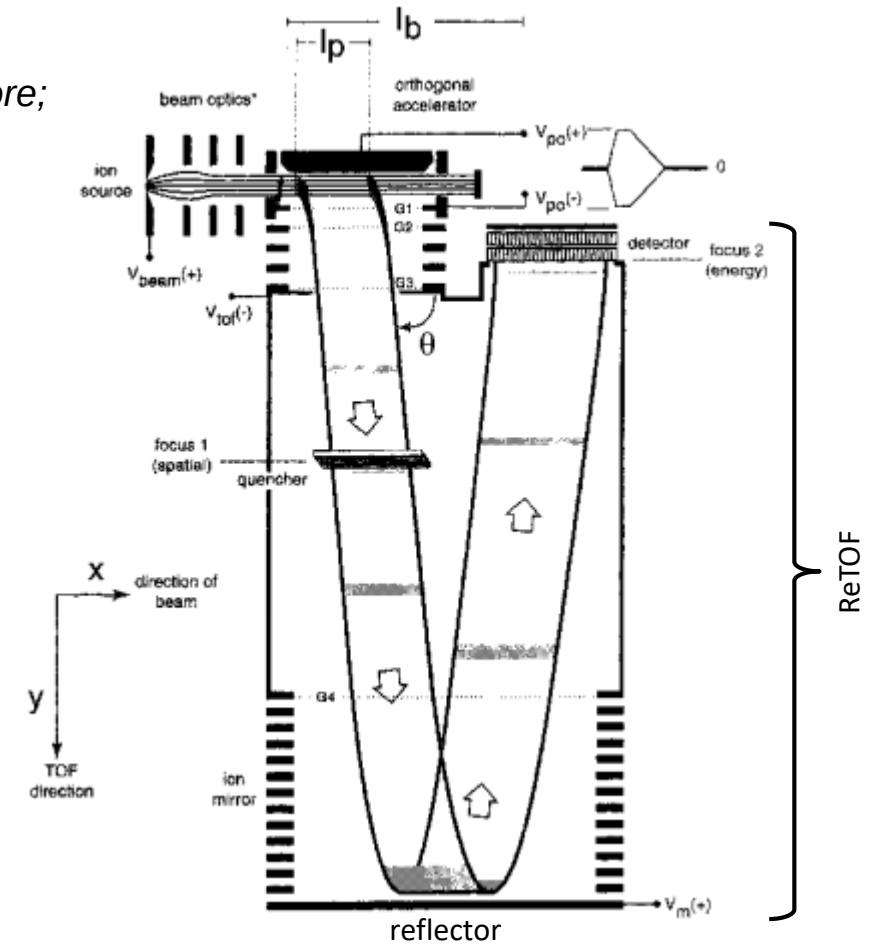
segue →

E. de Hoffmann, V. Stroobant – Mass Spectrometry: Principles and Applications - WILEY
J.H. Gross – Mass spectrometry: a textbook - Springer

I vantaggi dell'oa TOF sono:

- *alta trasmissione (quindi alta sensibilità);*
- *alta velocità di scansione;*
- *alto potere risolvente;*
- ***masse accurate anche a più di 1 ppm**;*
- *possibilità di accoppiamento con diversi tipi di ionizzatore;*
- *design compatto.*

Gli oaTOF possono anche essere costruiti con il TOF in modalità Re-TOF →



E. de Hoffmann, V. Stroobant – Mass Spectrometry: Principles and Applications - WILEY

J.H. Gross – Mass spectrometry: a textbook - Springer

Vantaggi TOF

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 (oaTOF) consentono misurazioni di massa accurate e accoppiamento di analizzatori di massa in serie (MS-MS tandem)

NOTA:

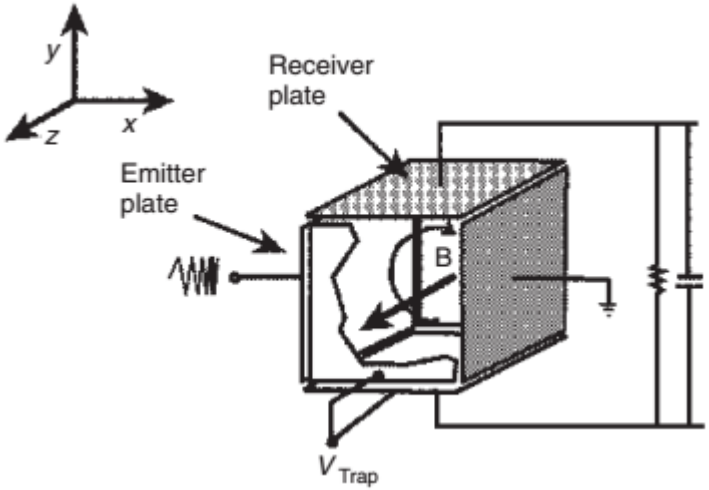
a) l'implementazione dei sistemi per alto vuoto porta ad un aumento del potere risolvente poiché ci sono meno molecole "non desiderate" con cui gli ioni possono collidere nella loro traiettoria lungo il cammino libero;

b) nella tecnica TOF è fondamentale che il detector possa misurare Δt molto piccoli, il potere risolvente del TOF è anche correlato alla velocità di conversione del segnale da analogico a digitale del detector. Con detector con frequenza di conversione di 4 GHz il potere risolvente può arrivare fino a R = 45'000.

E. de Hoffmann, V. Stroobant – Mass Spectrometry: Principles and Applications - WILEY
J.H. Gross – Mass spectrometry: a textbook - Springer

Analizzatore a risonanza ionica ciclotronica a trasformata di Fourier (FT-ICR)

Come già visto negli analizzatori a settore magnetico, ioni immersi in un campo magnetico curvano la loro traiettoria. Se la velocità dello ione non è elevata e il campo magnetico è grande, il raggio della traiettoria diventa piccolo, tanto che lo ione può rimanere "intrappolato" in una traiettoria circolare all'interno del campo magnetico, questo è il principio del ciclotrone per ioni.



Il campo magnetico è orientato lungo l'asse z. Gli ioni vengono iniettati nella trappola e intrappolati da un voltaggio (1 V) imposto tra i due "plate" opposti della trappola.

Gli ioni intrappolati si muovono con una traiettoria con due componenti: circolare intorno all'asse z e lineare lungo l'asse z. Il senso di rotazione dipende se gli ioni hanno carica positiva (in figura) o carica negativa.

segue →

Gli ioni si stabilizzano lungo una traiettoria risultante dal bilancio della forza centripeta e centrifuga:

$$qvB = \frac{mv^2}{r} \quad \text{or} \quad qB = \frac{mv}{r}$$

Forza centripeta — Forza centrifuga

Lo ione completa una traiettoria circolare di 2πr con una frequenza di: $\nu = \frac{v}{2\pi r}$

Quindi la velocità angolare risultante è: $\omega_c = 2\pi\nu = \frac{v}{r} = \frac{q}{m}B$

La frequenza e la velocità angolare, pertanto, <u>dipendono dal rapporto (q/m) e da B, ma sono indipendenti dalla velocità</u>.

In pratica gli ioni vengono iniettati nel dispositivo e si trovano immersi in un campo magnetico di 3-9.4 Tesla, prodotto da un magnete superconduttore.

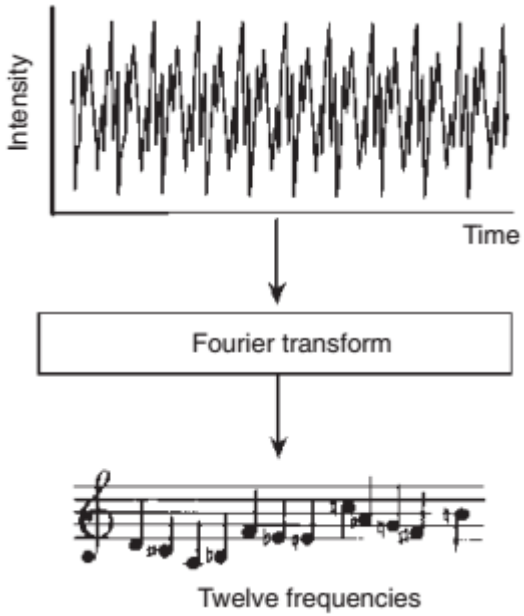
La relazione tra la frequenza e la massa mostra che in questo caso <u>la determinazione della massa si effettua misurando una frequenza.</u>

segue →

Per misurare la frequenza degli ioni si utilizza la tecnica della ***Trasformata di Fourier*** *.*

Principio della trasformata di Fourier (FT):

l'intensità di un segnale misurata come una funzione tempo-dipendente, è formata dalla sovrapposizione delle singole intensità di ogni frequenza da cui essa è formata. La trasformazione di Fourier consente di individuare le singole frequenze e la loro intensità



Nell' analizzatore FT-ICR gli ioni intrappolati nel ciclotrone vengono eccitati simultaneamente *<u>da una rapida scansione di un largo intervallo di frequenze</u>* *(con una corrente alternata AC in radiofrequenza – RF – a voltaggio V_0) nel tempo di circa 1μs. Gli ioni, eccitati da questa scansione, dispongono la loro traiettoria tutti lungo lo stesso raggio, che dipende da:*

$$r = \frac{V_0 T_{exc}}{B_0}$$

T_{exc} → tempo di eccitazione

B_0 → campo magnetico

Il raggio è indipendente da m/z, invece la frequenza a cui "risuonano" gli ioni nel ciclotrone dipende da m/z.

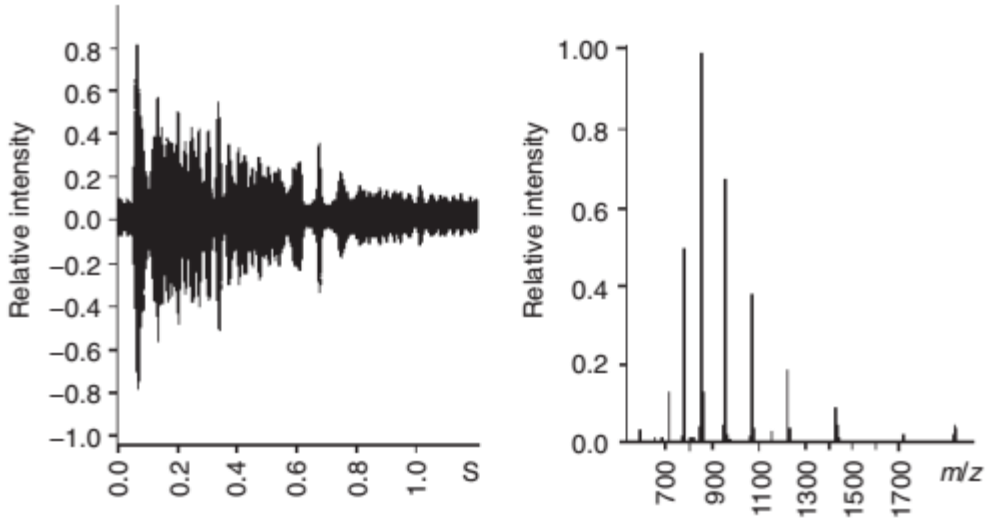
<u>Quindi dopo l'eccitazione ogni ione avrà una sua frequenza caratteristica, pur ruotando sulla traiettoria di raggio r assieme agli altri ioni.</u>

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

segue →

E. de Hoffmann, V. Stroobant – Mass Spectrometry: Principles and Applications - WILEY
J.H. Gross – Mass spectrometry: a textbook - Springer

Quindi nel FT-ICR l'intensità del segnale in funzione del tempo viene trasformata in intensità parziali in funzione di m/z



Vantaggi del FT-ICR:

- *potere risolvente $R = 10^5$-10^6;*
- *accuratezza di misura della massa $\Delta m = 10^{-4} – 10^{-3}$ u;*
- *sensibilità fino alle attomoli (10^{-18} moli) in dipendenza del sistema di ionizzazione accoppiato;*
- *elevato intervallo di m/z misurabile.*

Svantaggi del FT-ICR:

- *necessità di magneti superconduttori per ottenere l'intensità di campo magnetico necessaria (quindi necessità di utilizzo di gas criogenici);*
- *necessità di un alto vuoto perfettamente controllato (per evitare collisioni "indesiderate" degli ioni con molecole presenti che possono defasare la frequenza di ioni con stesso m/z.*

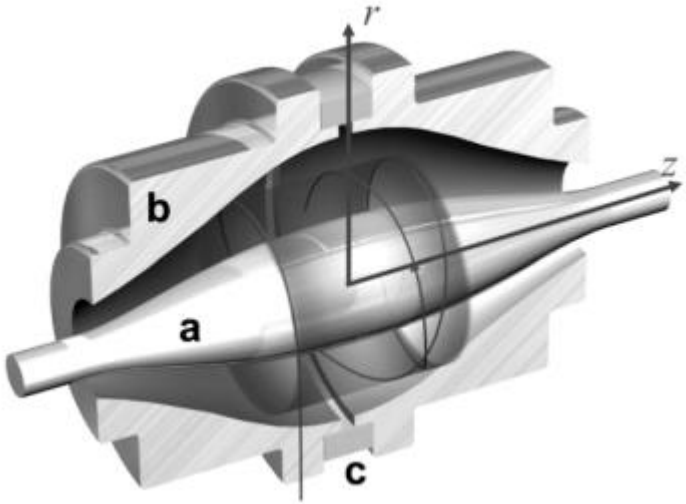
E. de Hoffmann, V. Stroobant – Mass Spectrometry: Principles and Applications - WILEY
J.H. Gross – Mass spectrometry: a textbook - Springer

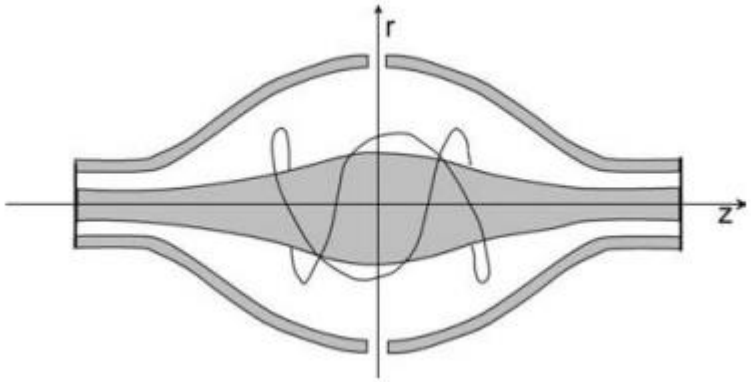
Orbitrap

L'Orbitrap è un trappola ionica che sfrutta unicamente un campo elettrostatico (no campo magnetico, no corrente AC in radiofrequenza) per intrappolare gli ioni.

E' formato da due elettrodi "concentrici": l'elettrodo interno è a forma di fuso, l'elettrodo esterno è a forma di botte ed è diviso in due parti mantenute isolate da un anello di ceramica.

Gli ioni che vengono iniettati all'interno, tramite un orifizio nell'anello di ceramica, si muovono in spirali attorno all'elettrodo centrale. Il movimento degli ioni si assesta in traiettorie a spirale indotte dal campo elettrostatico generato applicando una differenza di potenziale tra i due elettrodi.



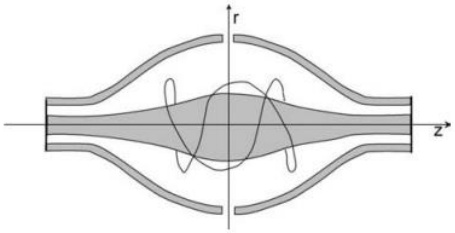


segue →

E. de Hoffmann, V. Stroobant – Mass Spectrometry: Principles and Applications - WILEY
J.H. Gross – Mass spectrometry: a textbook - Springer

La traiettoria a spirale ha due componenti: radiale (lungo r) e assiale (lungo z).

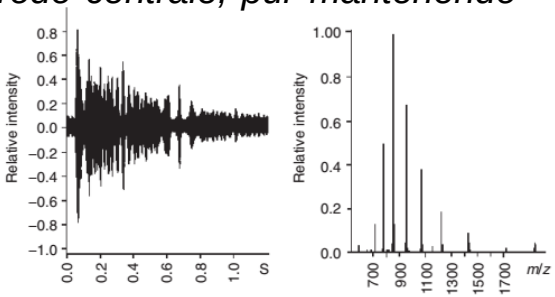
Si può dimostrare che la frequenza di oscillazione assiale è data da:



$$\omega_z = \sqrt{k\left(\frac{q}{m_i}\right)}$$

quindi è inversamente proporzionale alla radice quadrata di m/z (k è una costante che ingloba le caratteristiche del campo elettrico dovuto alla particolare forma dei due elettrodi concentrici).

La misura di m/z dei diversi ioni presenti nella trappola avviene utilizzando la trasformata di Fourier, come per FT-ICR, anche se in questo caso non serve applicare una corrente alternata AC prima della misura, poiché è il campo elettrico che allinea le traiettorie degli ioni alla stessa distanza dall'elettrodo centrale, pur mantenendo frequenza di oscillazione assiale diversa in dipendenza di m/z.



Vantaggi dell'Orbitrap:

- *non necessita di intensi campi magnetici e correnti alternate (RT) come FT-ICR;*
- *ha un potere risolvente più alto di FT-ICR a m/z > 800 (mentre FT-ICR ha un potere risolvente più alto di Orbitrap a valori di m/z più bassi).*

E. de Hoffmann, V. Stroobant – Mass Spectrometry: Principles and Applications - WILEY

J.H. Gross – Mass spectrometry: a textbook - Springer

Riassumendo...

Table 2.1 Types of analysers used in mass spectrometry.

Type of analyser	Symbol	Principle of separation
Electric sector	E or ESA	Kinetic energy
Magnetic sector	B	Momentum
Quadrupole	Q	*m/z* (trajectory stability)
Ion trap	IT	*m/z* (resonance frequency)
Time-of-flight	TOF	Velocity (flight time)
Fourier transform ion cyclotron resonance	FTICR	*m/z* (resonance frequency)
Fourier transform orbitrap	FT-OT	*m/z* (resonance frequency)

Table 4.1. Common mass analyzers

Type	Acronym	Principle
Time-of-flight	TOF	Time dispersion of a pulsed ion beam; separation by time-of-flight
Magnetic sector	B	Deflection of a continuous ion beam; separation by momentum in magnetic field due to Lorentz force
Linear quadrupole	Q	Continuous ion beam in linear radio frequency quadrupole field; separation due to instability of ion trajectories
Linear quadrupole ion trap	LIT	Continuous ion beam delivers ions for trapping; storage, and eventually separation in linear radio frequency quadrupole field by resonant excitation
Quadrupole ion trap	QIT	Trapped ions; separation in three-dimensional radio frequency quadrupole field by resonant excitation
Fourier transform-ion cyclotron resonance	FT-ICR	Trapped ions in magnetic field (Lorentz force); separation by cyclotron frequency, image current detection and Fourier transformation of transient signal
Orbitrap	orbitrap	Axial oscillation in inhomogeneous electric field; detection of frequency after Fourier transformation of transient signal

E. de Hoffmann, V. Stroobant – Mass Spectrometry: Principles and Applications - WILEY

Detector (o rivelatori)

I detector sono dispositivi che sono in grado di convertire la corrente di ioni in uscita dall'analizzatore in una corrente elettrica proporzionale all'abbondanza degli ioni.

Esistono diversi tipi di detector, tutti sono basati sulla rivelazione della massa e/o della carica e/o della velocità degli ioni. Il detector, in genere, viene scelto in base alle caratteristiche dell'analizzatore presente nello strumento o comunque in base all'assetto strumentale complessivo. Sotto vengono illustrati gli accoppiamenti più diffusi:

Faraday cup → per spettrometria di massa inorganica (Isotopic Ratio Mass Spectrometry)

Elettromoltiplicatori → Quadrupolo, Trappole ioniche, Settore magnetico

Elettromoltiplicatori → *Microchannel Plate* → TOF

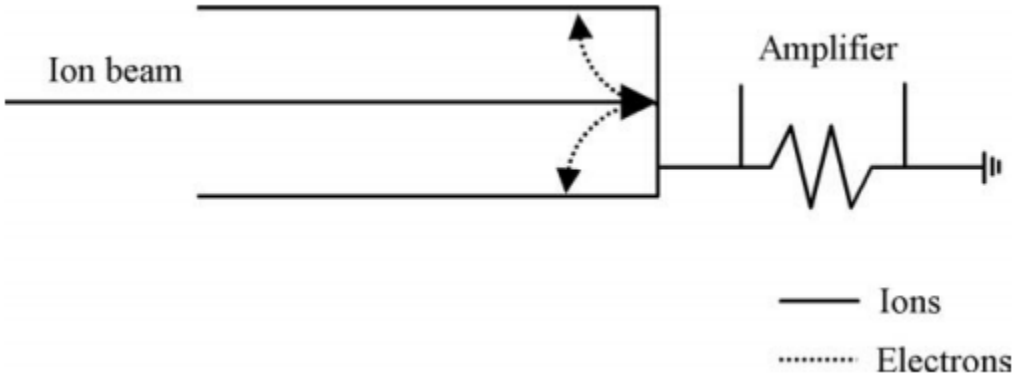
Image Current → FT-ICR, Orbitrap

E. de Hoffmann, V. Stroobant – Mass Spectrometry: Principles and Applications - WILEY

Faraday cup

La coppa di Faraday è il primo e più semplice detector applicato agli spettrometri di massa. E' formata da una coppa o un cilindro di metallo con un piccolo orifizio per l'ingresso degli ioni. Gli ioni che entrano nella coppa vengono neutralizzati quando collidono con le pareti donando o acquisendo un elettrone (a seconda del segno della loro carica). Queste collisioni generano una corrente nel resistore che viene amplificata. E' un dispositivo con bassa sensibilità e un tempo di risposta lento.

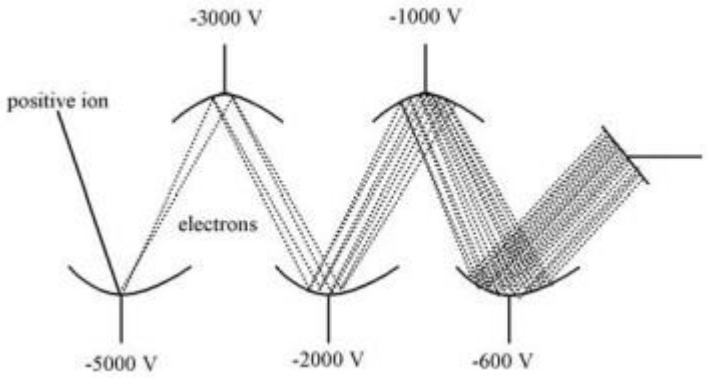
Le sua applicazione è al giorno d'oggi è limitata alla misura di differenze isotopiche di alcune specie atomiche con alta accuratezza (es. $^{12}C/^{14}C$)



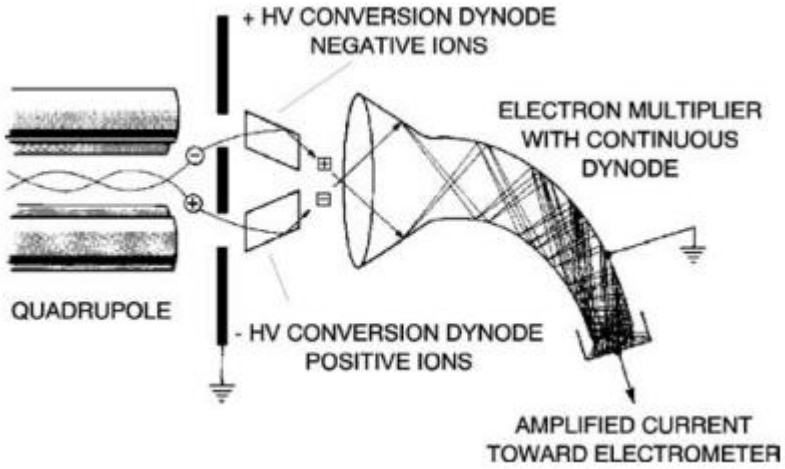
E. de Hoffmann, V. Stroobant – Mass Spectrometry: Principles and Applications - WILEY

Elettromoltiplicatori (EM)

Sono i detector al giorno d'oggi più utilizzati in spettrometria di massa. In questi detector gli ioni che provengono dall'analizzatore vengono accelerati ad alta velocità all'interno di un elettrodo a serie di dinodi, in cui viene mantenuto un potenziale di 3-30 kV di segno opposto rispetto alla carica degli ioni. Uno ione che impatta con un dinodo produce una serie di particelle secondarie (elettroni) che continuano a moltiplicarsi lungo tutta la serie di dinodi, amplificando il segnale. Gli EM possono essere a serie di dinodi discreta (con 12-20 dinodi) o costituiti da un unico dinodo (elettromoltiplicatore a dinodo continuo), il secondo ha un potere di amplificazione maggiore del primo.



EM a serie discreta di dinodi



EM a dinodo continuo ricurvo

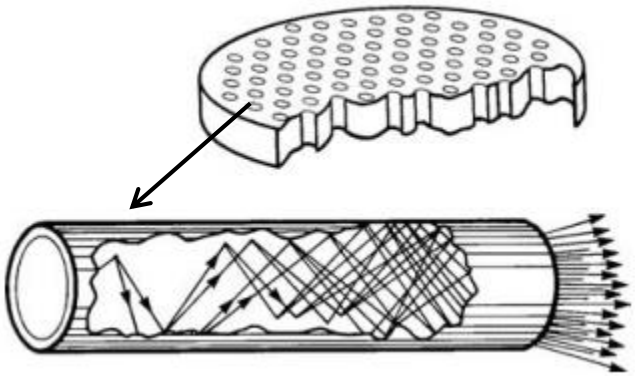
segue →

E. de Hoffmann, V. Stroobant – Mass Spectrometry: Principles and Applications - WILEY
J.H. Gross – Mass spectrometry: a textbook - Springer

Microchannel plate

E' composto da un array di dinodi continui lineari, può moltiplicare il numero di elettroni nell' ordine di 10^2 - 10^4.

E' possibile predisporre più microchannel plates in serie per raggiungere amplificazioni fino a 10^8.



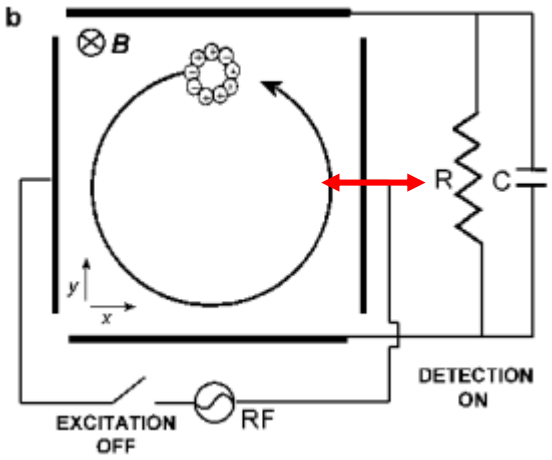
Questo detector è caratterizzato da una risposta molto veloce poiché il percorso degli elettroni nei canali è molto breve (la lunghezza di ogni microcanale è di pochi millimetri). Quindi è ottimale per essere accoppiato con analizzatori TOF in cui gli ioni arrivano al detector con intervalli temporali di decine o centinaia di ns.

E. de Hoffmann, V. Stroobant – Mass Spectrometry: Principles and Applications - WILEY

Image Current

Questo detector viene utilizzato in accoppiata con FT-ICR e Orbitrap.

Esso consiste in una coppia di placche di metallo (plates), che fungono da elettrodi, poste all'interno dell'analizzatore molto vicino alle traiettorie percorse dagli ioni. Una nube di ioni in movimento ripetitivamente attrae (se ioni positivi) o respinge (se ioni negativi) gli elettroni dell'elettrodo a cui si avvicina inducendo negli elettrodi una piccolissima corrente (corrente immagine) che poi viene amplificata e trasformata in un voltaggio.



Rivelazione della corrente immagine in un FT-ICR