

CHIMICA ANALITICA II

CON LABORATORIO

(AA 2018-19)

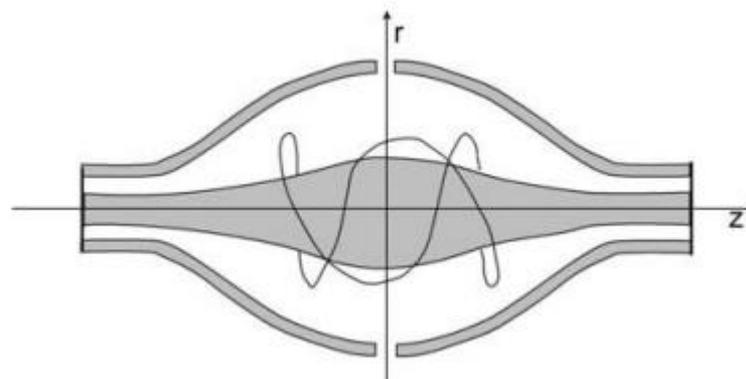
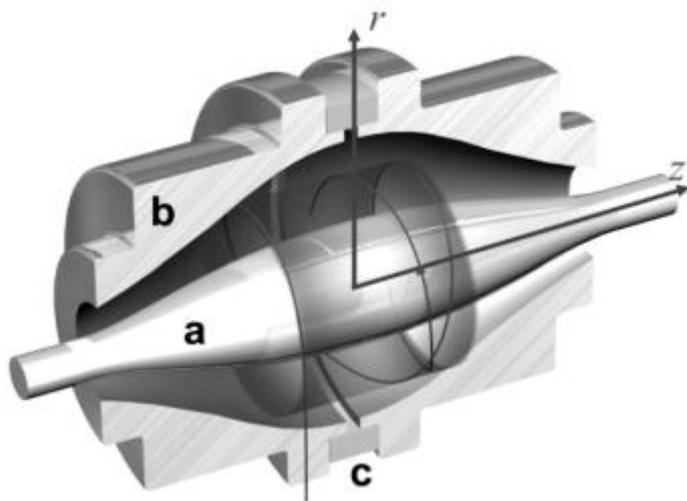
8 C.F.U. - Laurea triennale in Chimica

Orbitrap

L'Orbitrap è un analizzatore di masse costituito da trappola ionica che sfrutta unicamente un campo elettrostatico non omogeneo (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.

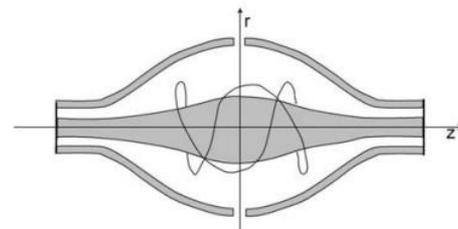


segue →

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:

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



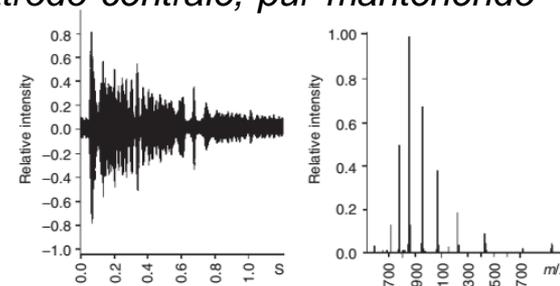
quindi è inversamente proporzionale alla radice quadrata di m/z (k è una costante che ingloba le caratteristiche del campo elettrico dovuto alla particolare forma dei due elettrodi concentrici).

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 .

Esistono diverse configurazioni per la tecnologia Orbitrap (vedi webinar più avanti)

Vantaggi dell'Orbitrap:

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



Una trasformata integrale è un'applicazione, generalmente lineare, di uno spazio di funzioni su un altro spazio di funzioni, realizzata attraverso un integrale.

La trasformata di Fourier permette di scrivere una funzione dipendente dal tempo nel [dominio delle frequenze](#),

<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ed064pA228>

Fourier transforms for chemists. Part 1. Introduction to the Fourier transform

L. Glasser

J. Chem. Educ., 1987, 64 (10), p A228

DOI: 10.1021/ed064pA228

Publication Date: October 1987

 Cite this: *J. Chem. Educ.* 64, 10, XXX-XXX

 RIS Citation 

topics in chemical instrumentation

edited by
FRANK A. SETTLE, JR.
Virginia Military Institute
Lexington, VA 24450

Fourier Transforms for Chemists

Part I. Introduction to the Fourier Transform

L. Glasser

University of the Witwatersrand, 1 Jan Smuts Avenue, Johannesburg 2001, South Africa

Using Mathematical Software To Introduce Fourier Transforms in Physical Chemistry To Develop Improved Understanding of Their Applications in Analytical Chemistry

Tierney C. Miller, John N. Richardson, and Jeb S. Kegerreis*

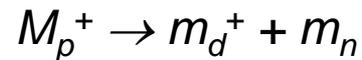
J. Chem. Educ., 2016, 93 (2), pp 299–303

DOI: 10.1021/acs.jchemed.5b00493

<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.jchemed.5b00493>

Spettrometria di Massa Tandem (MS/MS)

- Negli studi sulla struttura delle molecole, spesso **si vogliono maggiori informazioni sugli ioni generati nel processo di ionizzazione**. Ciò vale in particolare per le ionizzazioni “soft”.
- Un aumento dell'energia interna di uno ione generato con una ionizzazione soft, porterà alla frammentazione di questi ioni.
- Si può ottenere ciò in diversi modi; ad esempio con attivazione per collisione con molecole di gas neutro (**collision-induced dissociation, CID**), mentre altri approcci prevedono la foto-dissociazione indotta da laser o da superfici.
- A seguito dell'aumento di energia interna, si ha frammentazione unimolecolare



M_p^+ è lo ione precursore, m_d^+ lo ione prodotto e m_n rappresenta molecole neutre. Avviene fuori dalla sorgente di ioni. Alcuni frammenti si formano nella sorgente, altri nel percorso accelerato verso il detector (processo probabilistico)

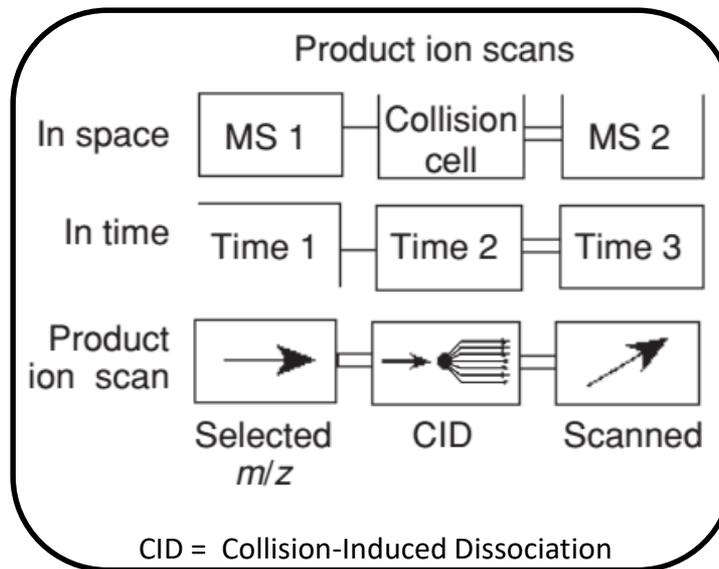
segue →

La spettrometria di massa Tandem (o MS/MS) comprende le numerose tecniche in cui ioni selezionati secondo determinati m/z vengono sottoposti ad una seconda analisi in spettrometria di massa.

Uno spettrometro di massa tandem incorpora almeno due stadi di analisi di m/z , di solito denominate MS1 e MS2.

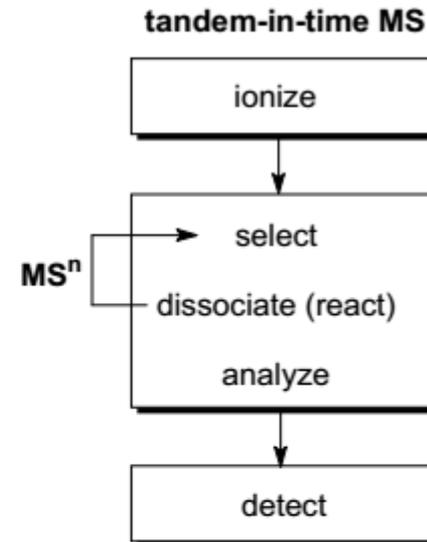
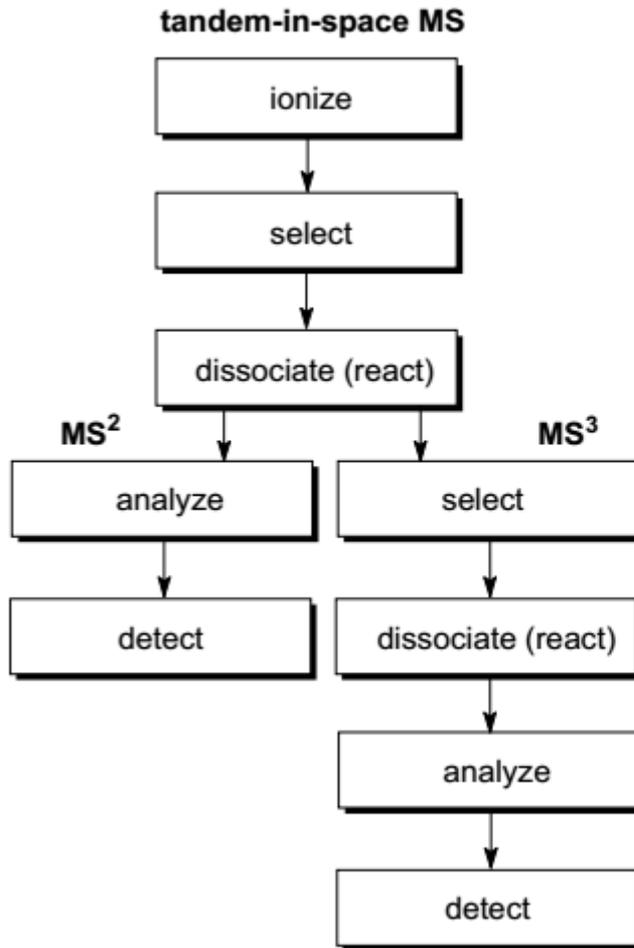
Uno strumento MS/MS può essere costruito secondo due diversi design : la "**MS/MS nello spazio**" o la "**MS/MS nel tempo**".

Nella **MS/MS nello spazio** gli spettri di ioni vengono registrati utilizzando due analizzatori di massa posti in serie. Nel primo analizzatore vengono selezionati alcuni ioni con determinati m/z che vengono poi dissociati in un comparto successivo dello strumento e i prodotti vengono analizzati dal secondo analizzatore per ottenere lo spettro.



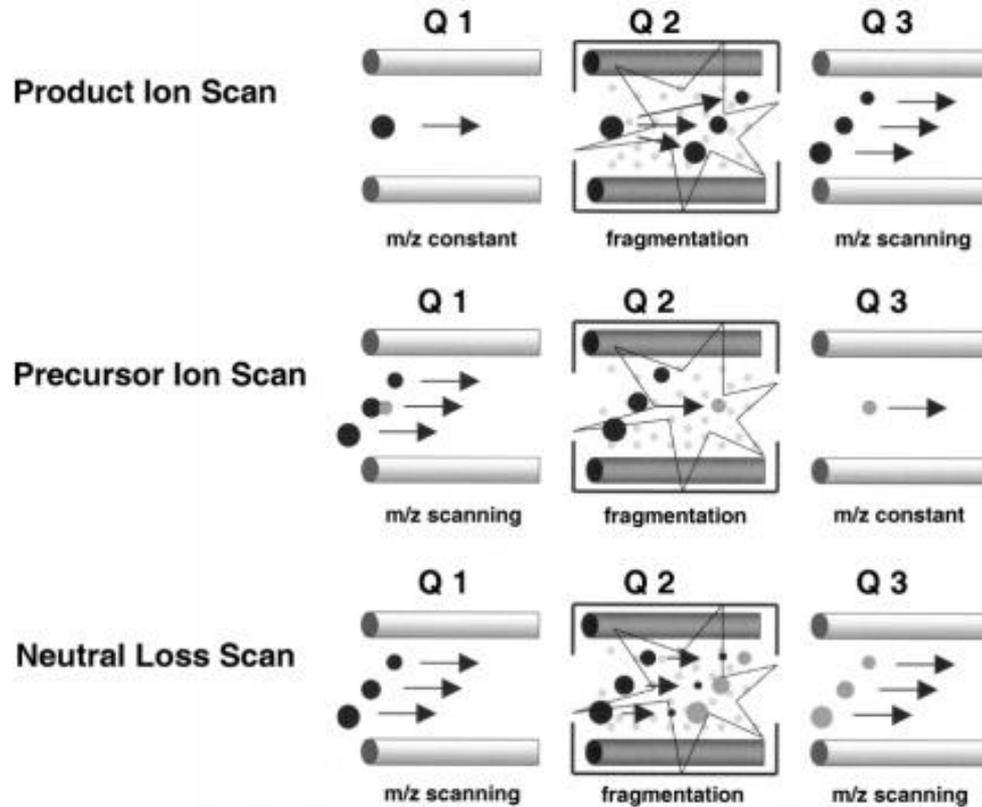
Nella **MS/MS nel tempo** si utilizza un unico analizzatore di massa che può operare per passaggi successivi di selezione di ioni, attivazione e analisi dei prodotti di ionizzazione nello stesso comparto dello strumento ma in sequenza nel tempo.

segue →



segue →

Tripli quadrupoli (QqQ)

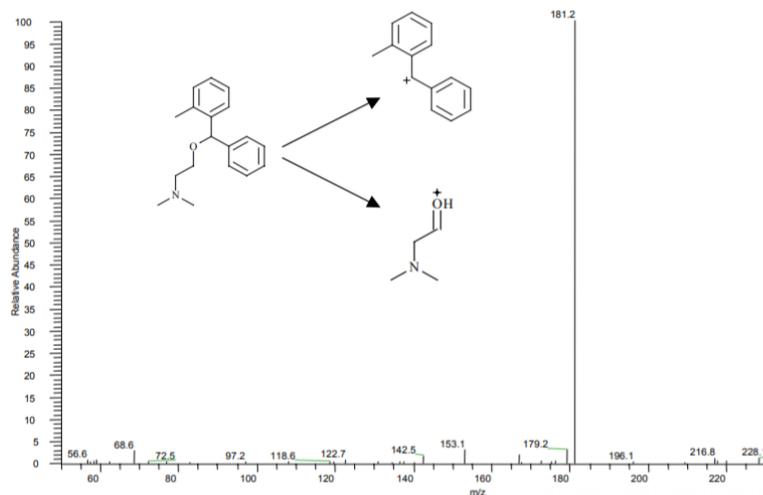


Possibili processi di frammentazione/analisi nel QqQ

Full Scan Product Ion

Q1 is set to allow only the transmission of Orphenadrine m/z 269

Q3 is scanned between 50 to 268 amu - qualitative information



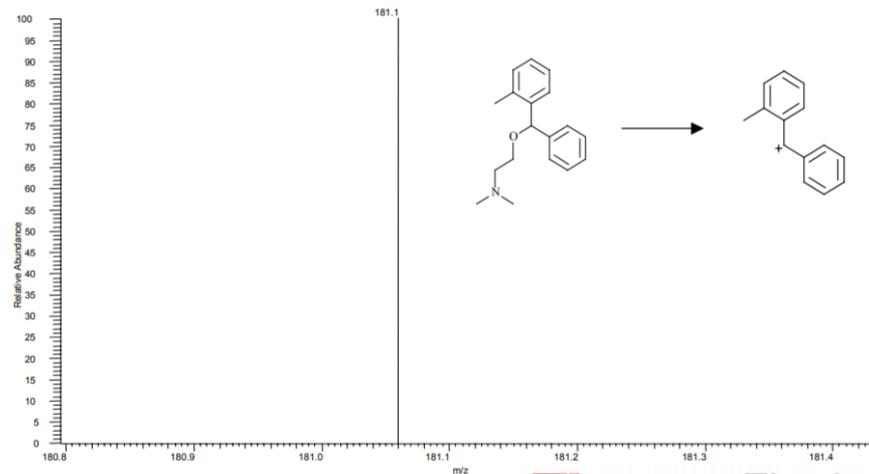
https://www.enovatia.com/wp-content/uploads/2009/07/Scan_types.pdf

SRM Product Ion Scan

Q1 is set to allow only the transmission of Orphenadrine m/z 269.9

Q3 is scanned only to detect m/z 181.1 +/- 0.3

SRM provides best selectivity and signal to noise ratio for quantitation

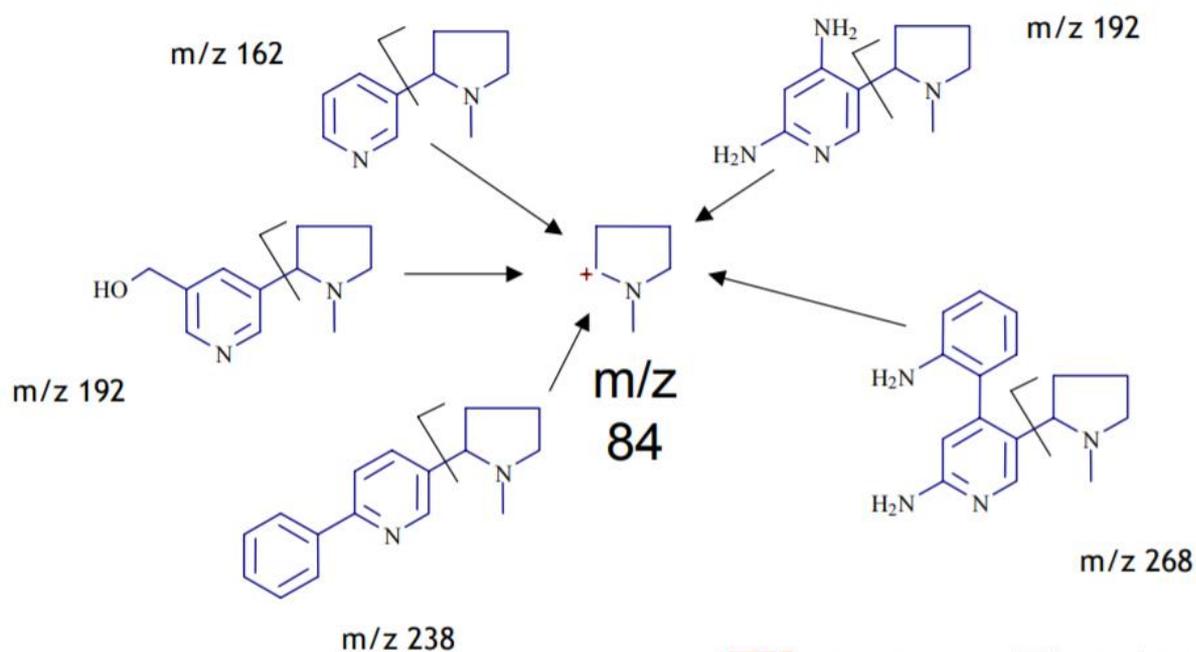


Product ion scans also know as daughter ion scans

- Q1 is set to allow only the transmission of one m/z
- The parent ion collides with Argon gas in Q2 to create fragment or product ions
- Product ions are scanned through Q3

Precursor ion scans

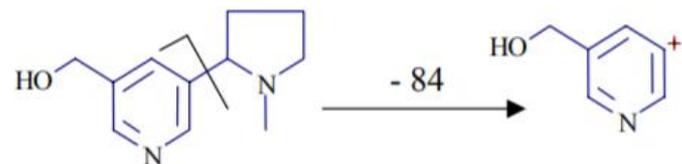
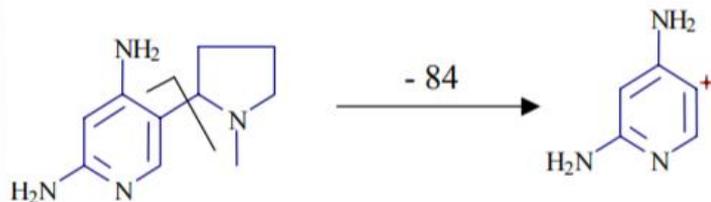
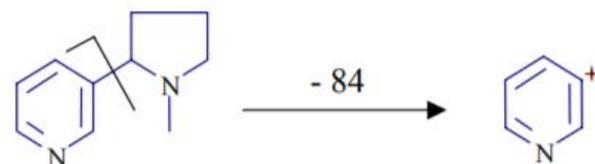
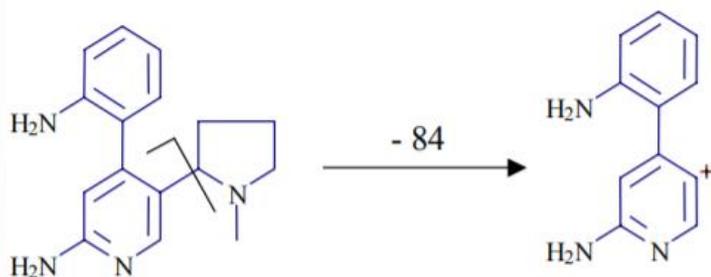
Precursor ion scans are used for screening experiments where a group of compounds all give the same fragment ion



ThermoFinnigan

Neutral loss scans

Neutral loss scans are used for screening experiments where a group of compounds all give the same loss



ThermoFinnigan

MS/MS con trappola ionica (QIT)

In pratica la trappola trattiene alcuni ioni espellendo gli ioni che non sono di interesse.

Gli ioni rimasti vengono poi "attivati" per indurre la frammentazione e quindi espulsi in sequenza verso il detector.

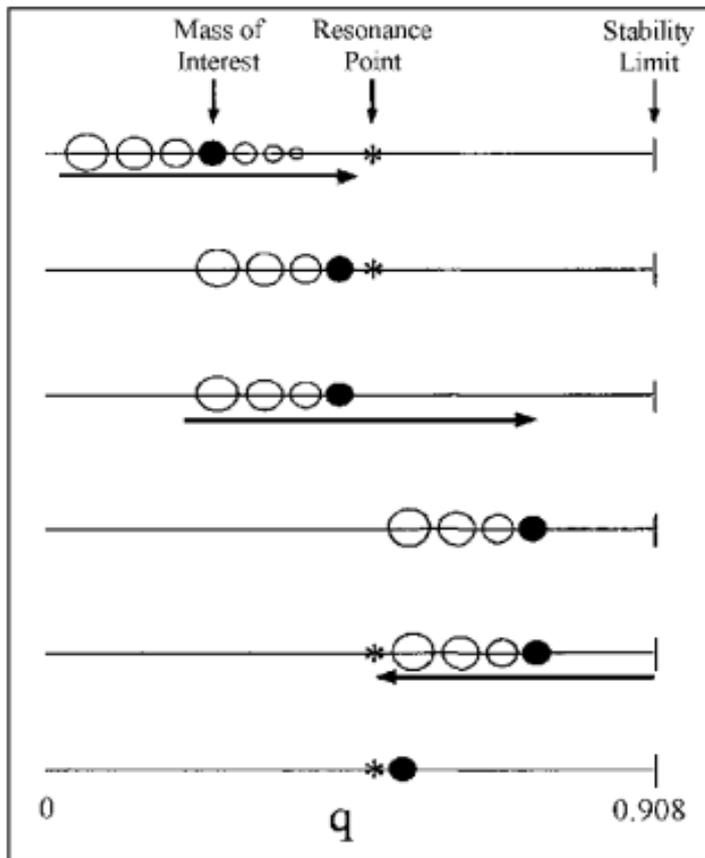
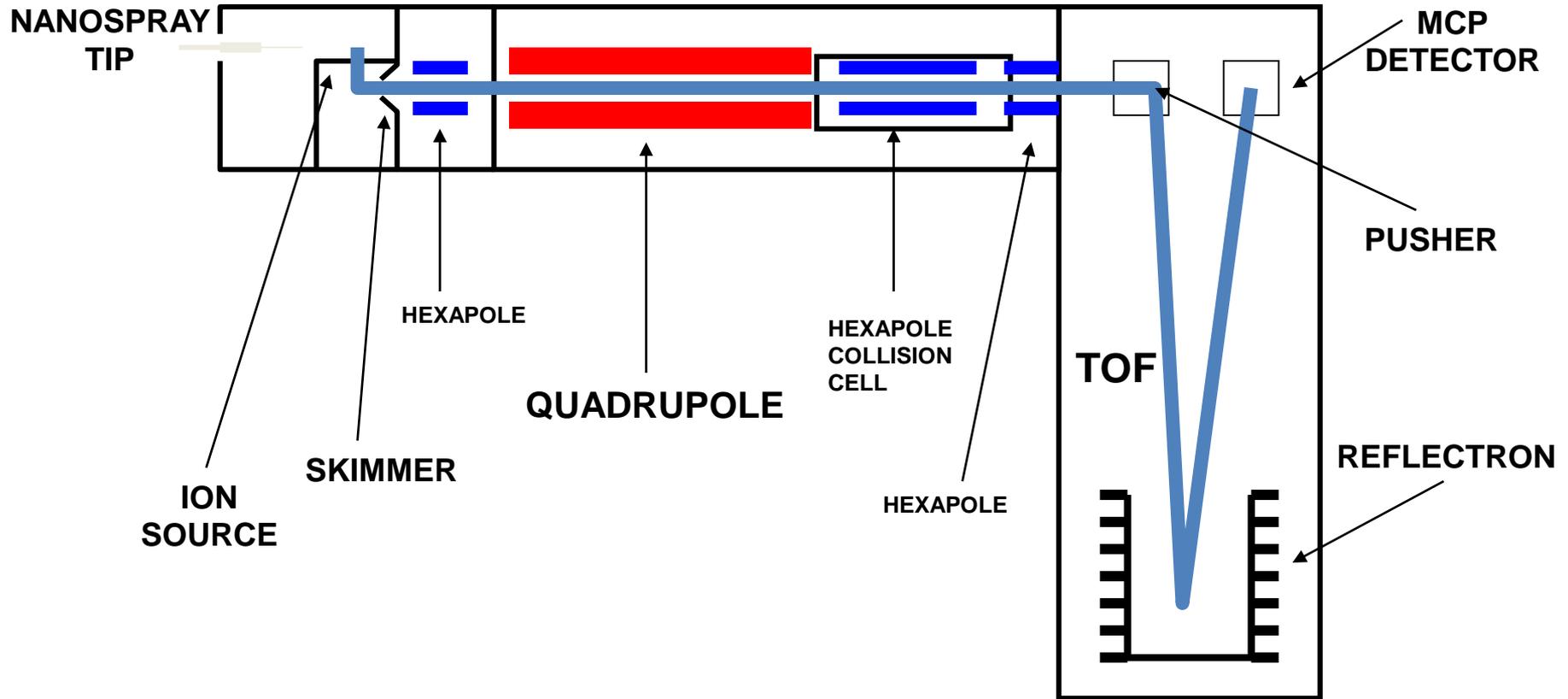
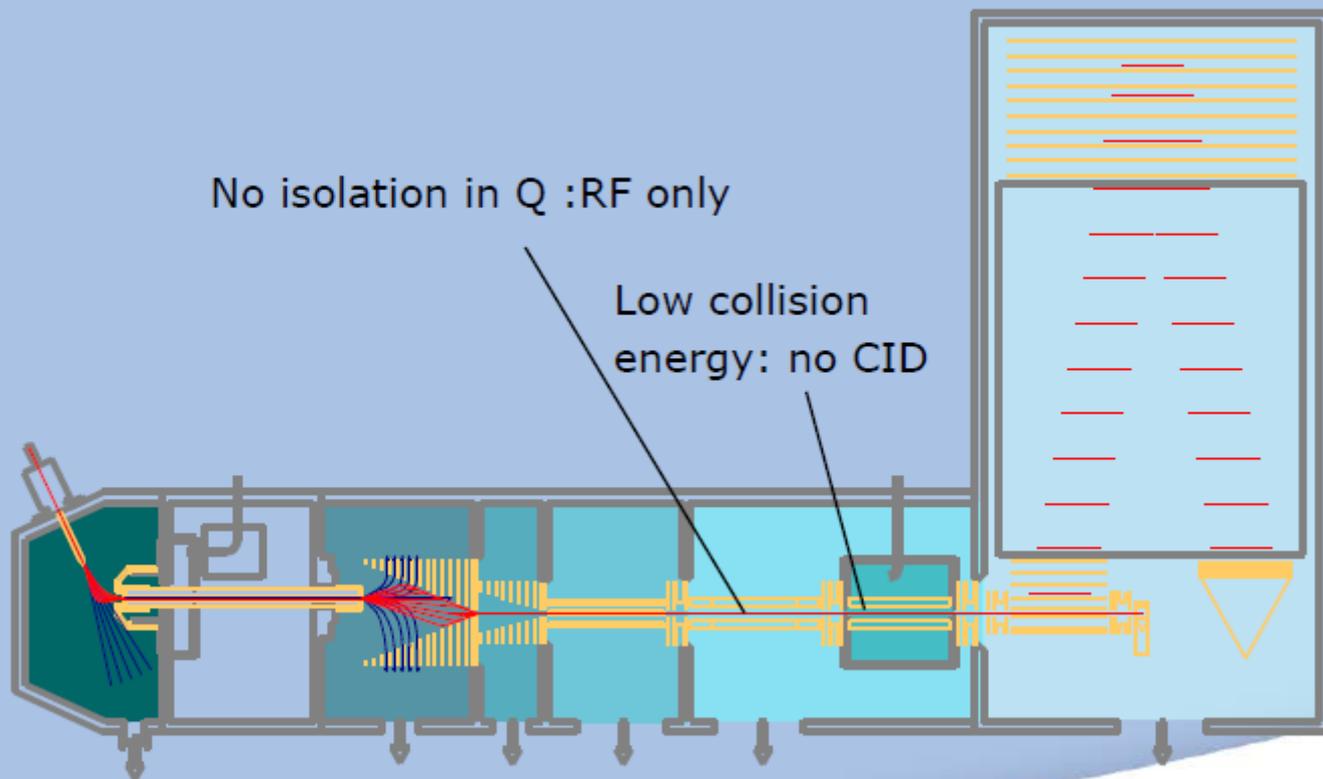


Fig. 9.19. The principle of isolation of a precursor ion by using forward and reverse scanning of a QIT. Ions smaller than the precursor are ejected by exciting them above the stability limit at $q = 0.908$, then settings are changed so that reduction of the RF amplitude causes ejection of the heavier ions. Reproduced from Ref. [106] with permission. © John Wiley & Sons, 1992.

Quadrupolo-TOF (QTOF)

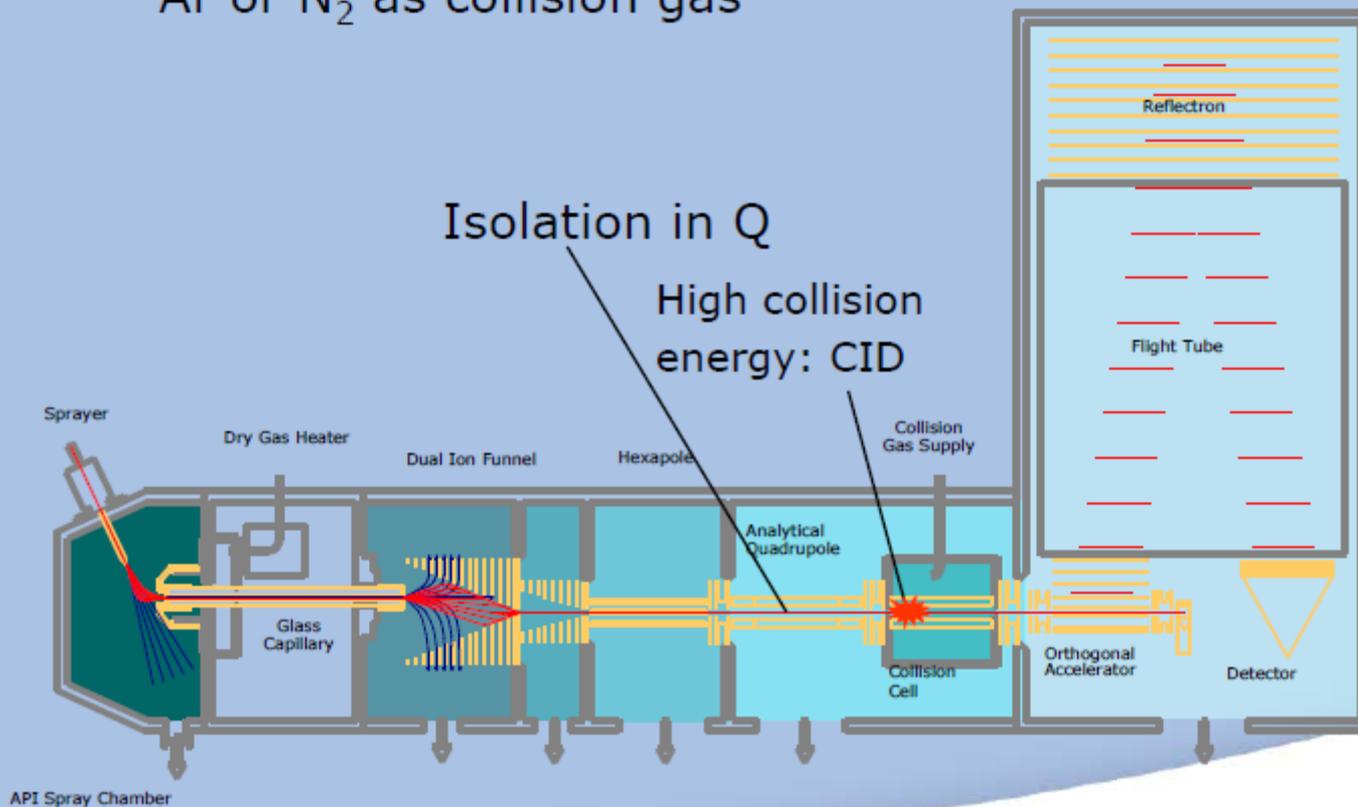


microOTOF Q in MS mode



MicrOTOF Q MSMS mode

Ar or N₂ as collision gas



Ultimate Performance with Superiour Detection Power

Fragments Analysis

The micrOTOF-Q provides exceptional mass accuracy in MS/MS for metabolite and protein identification.

Achieve optional additional fragmentation performance with a source designed for ion fragmentation prior to the quadrupole (In-Source CID). After isolation in the analytical quadrupole, the ISCID fragments can be further fragmented in the collision cell (CID).

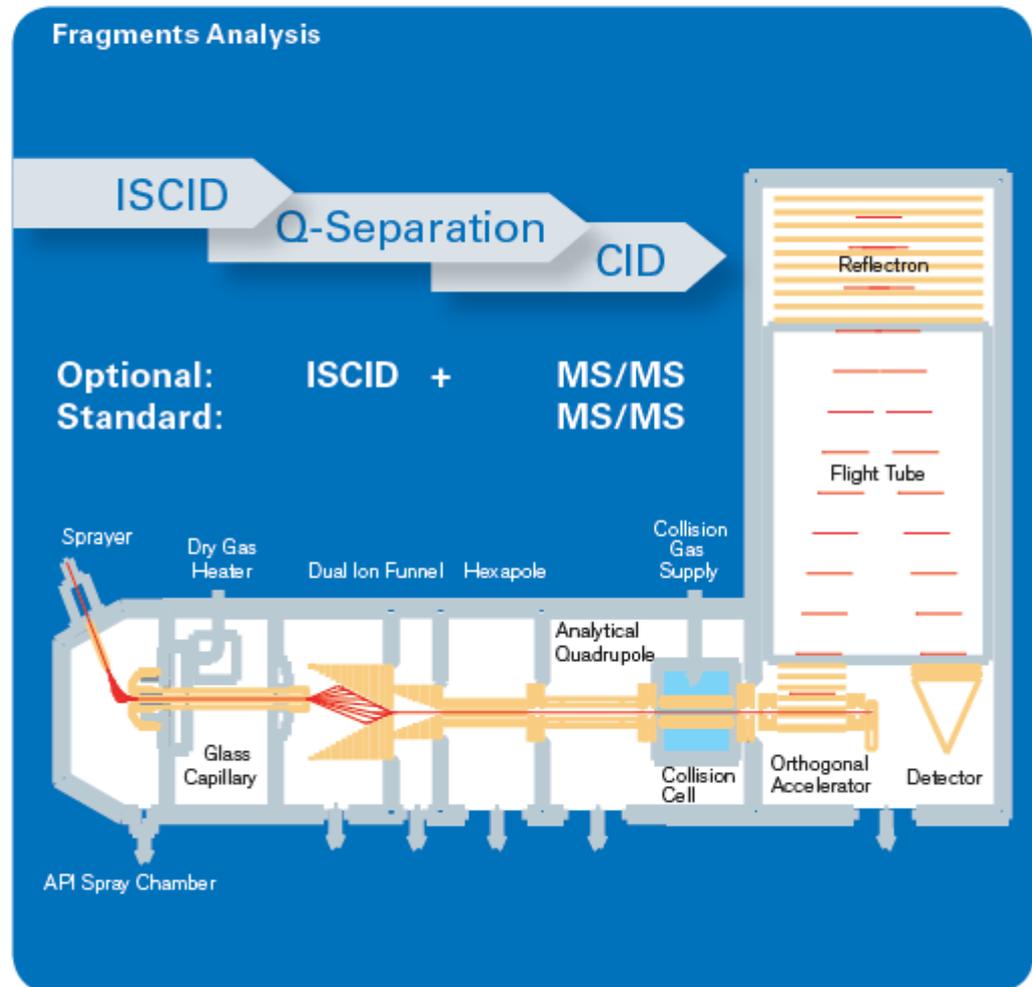


Table 4.1. Common mass analyzers

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

ThermoFisher SCIENTIFIC

Orbitrap Instrumentation: the First Decade and Beyond

Alexander Makarov
April 24, 2015

"Orbitrap and Science: 10 years together"

The world leader in serving science

making connections winning together

0:03 / 31:33

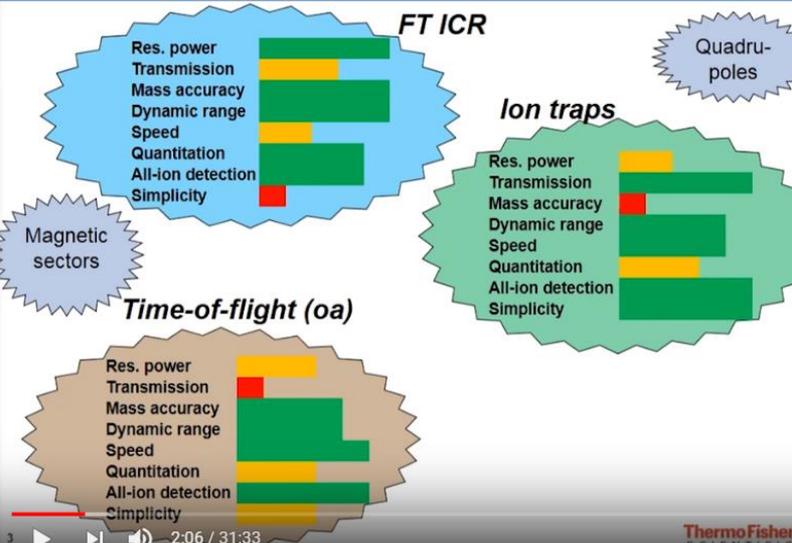


Alexander Makarov, PhD
Director of Global Research LSMS
Thermo Fisher Scientific

ThermoFisher SCIENTIFIC

Un webinar
<https://www.youtube.com/watch?v=jijxTW1NbTg>

Learning from experience...



Metric	FT ICR	Ion traps	Time-of-flight (oa)
Res. power	High	Low	Low
Transmission	High	Low	Low
Mass accuracy	High	Low	Low
Dynamic range	High	High	High
Speed	High	High	High
Quantitation	High	High	High
All-ion detection	High	High	High
Simplicity	Low	High	Low

FT ICR

Ion traps

Time-of-flight (oa)

Quadrupoles

Magnetic sectors

ThermoFisher SCIENTIFIC

2:06 / 31:33



Alexander Makarov, PhD
Director of Global Research LSMS
Thermo Fisher Scientific

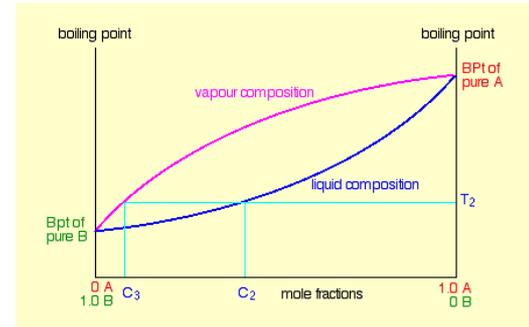
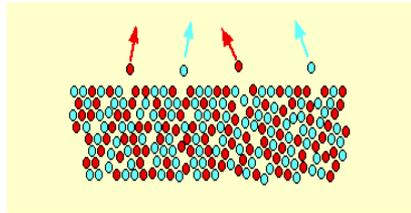
ThermoFisher SCIENTIFIC

EQUILIBRI ETEROGENEI

INTRODUZIONE

Il chimico analitico è interessato a sistemi eterogenei primariamente dal punto di vista dello sviluppo di tecniche di separazione.

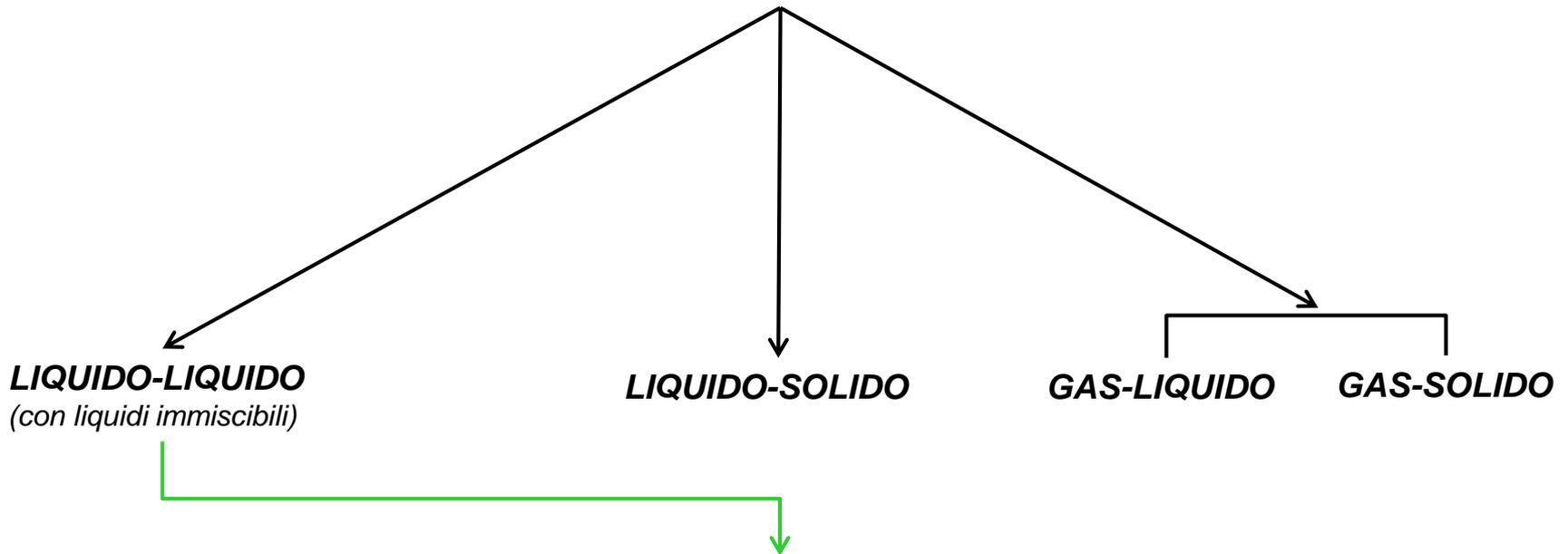
*Nelle **separazioni di fase all'equilibrio** (es. un liquido in equilibrio con il suo vapore), le fasi sono miscele in cui la sostanza di interesse rappresenta una componente maggiore; la composizione delle fasi è espressa come frazioni molari*



*Nell'**equilibrio di distribuzione**, le fasi coinvolgono componenti diversi dall'analita. L'analita non è la componente maggiore e la composizione della fase è convenientemente espressa in termini di concentrazione dell'analita (e.g. mol l⁻¹)*



Tipologie di equilibri eterogenei



E' la modalità di separazione più datata, al giorno d'oggi la maggior parte delle tecniche di separazione liquido-liquido utilizzate a scopi analitici sono cadute in disuso perché sostituite da tecniche più efficienti, che richiedono meno tempo e quantità di solvente molto modeste o addirittura nessun solvente.

In campo analitico viene ancora utilizzata per l'estrazione o la purificazione dei metalli.

Questa tecnica è ancora molto utilizzata per la separazione di prodotti di sintesi organica.

Curiosità: *il processo PUREX (PLutonium/URanium EXtraction process) viene utilizzato per il recupero di combustibili nucleari spenti. Il plutonio e l'uranio vengono separati dagli altri prodotti di fissione dissoluzione in acido nitrico e successiva estrazione con un opportuno solvente organico in cui migrano solo i due elementi e non gli altri prodotti di fissione.*

Equilibri Liquido-Liquido

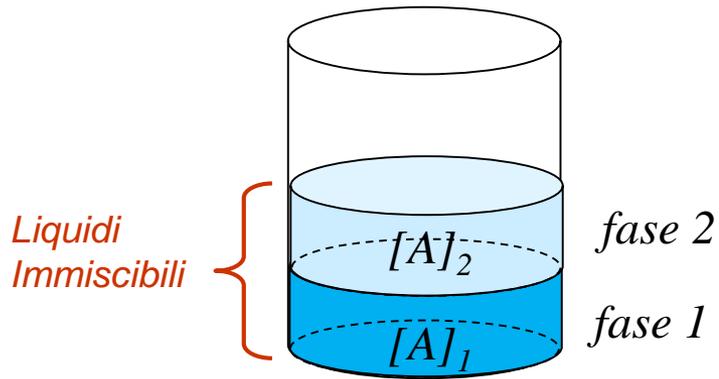
L'entità con cui soluti, sia inorganici che organici, si distribuiscono tra due liquidi immiscibili può essere molto varia, e queste differenze sono state impiegate per decenni per realizzare separazioni di specie chimiche.

- *Una delle più comuni separazioni semplici;*
- *L'attrezzatura è semplice (imbuti separatori o fiale (vial) + siringhe);*
- *I due liquidi **devono essere immiscibili** (formare due fasi distinte);*
- *Molto spesso una delle due fasi è acqua (o tampone acquoso) e l'altra un solvente organico poco polare*

L'estrazione si utilizza per separare il composto di interesse (l'analita/i) da altri composti che compongono la matrice (campione = analita/i + matrice).

segue →

La **ripartizione (o partizione)** del soluto **A** tra due fasi chimiche (**1 e 2**) è descritta tramite la costante di equilibrio K .



La costante K di questo particolare equilibrio viene denominata costante di partizione K_d e si esprime come:

$$K_d = \frac{[A]_2}{[A]_1}$$

La costante K_d è correlata alla costante termodinamica di distribuzione K_d' dalla seguente equazione:

$$K_d' = K_d (\gamma_{fase 2} / \gamma_{fase 1})$$

dove γ sono i coefficienti di attività delle due fasi

segue →

Esempi:

- fase 1 = H_2O , $CHCl_3$, CH_2Cl_2 ;
- fase 2 = Et_2O , etere di petrolio, $AcOEt$, toluene, esano

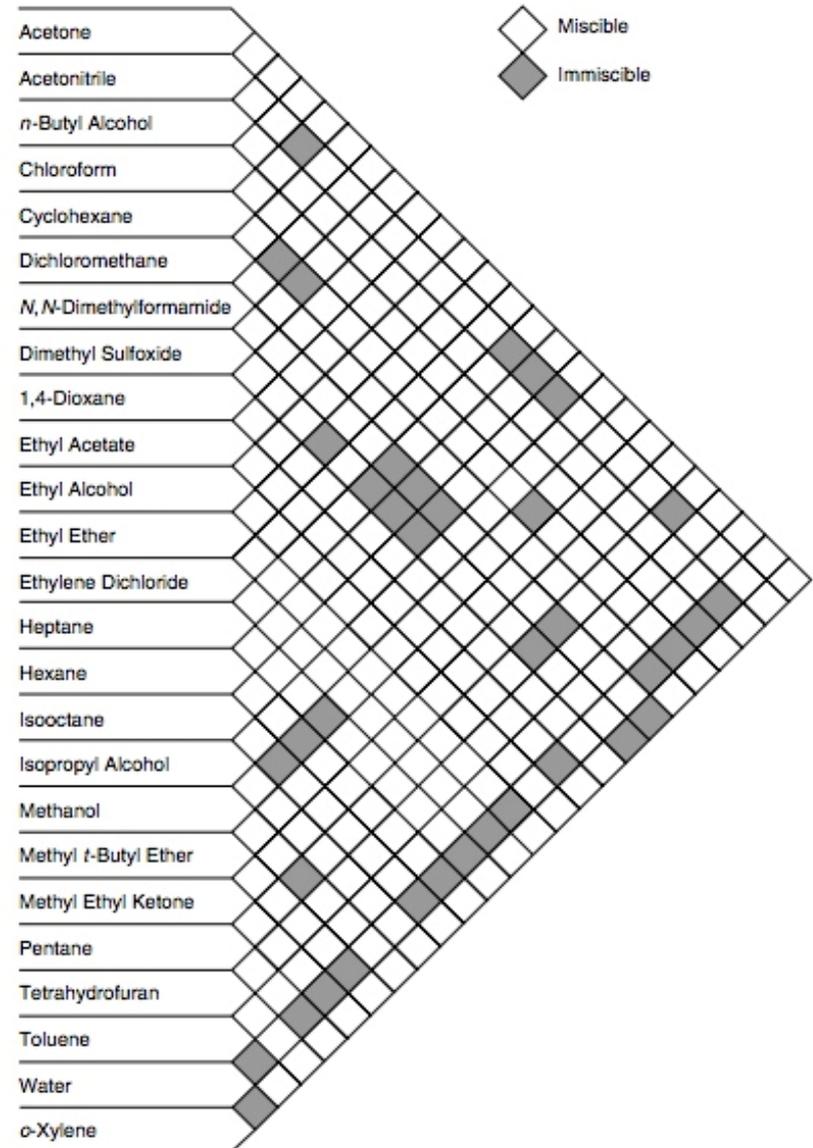


Figure 2.12. Solvent miscibility chart. (Reprinted with permission from Ref. 39. Copyright © 2002 Honeywell Burdick & Jackson.) Available online at

Efficienza Di Estrazione:

si può determinare la frazione di moli di A rimanenti nella fase 1 dopo una estrazione conoscendo il valore di K_d e i volumi delle due fasi.

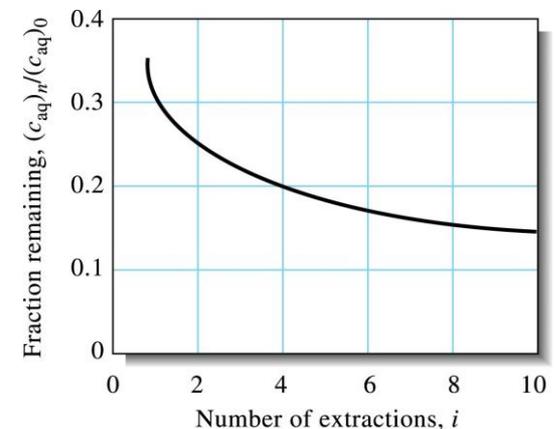


$$q = \frac{V_1}{(V_1 + K_d \cdot V_2)}$$

dove: q = frazione delle moli di **s** (soluto) rimanente nella fase 1
 $= r/n$ = moli rimanenti nella fase 1 / moli iniziali / totali
 V_1 = volume della fase 1
 V_2 = volume della fase 2
 K_d = coefficiente di partizione

Procedendo con estrazioni ripetute e **assumendo V_2 costante**, ogni estrazione rimuove la stessa frazione di composto. La frazione di **A** rimanente nella fase 1 dopo **n** estrazioni è:

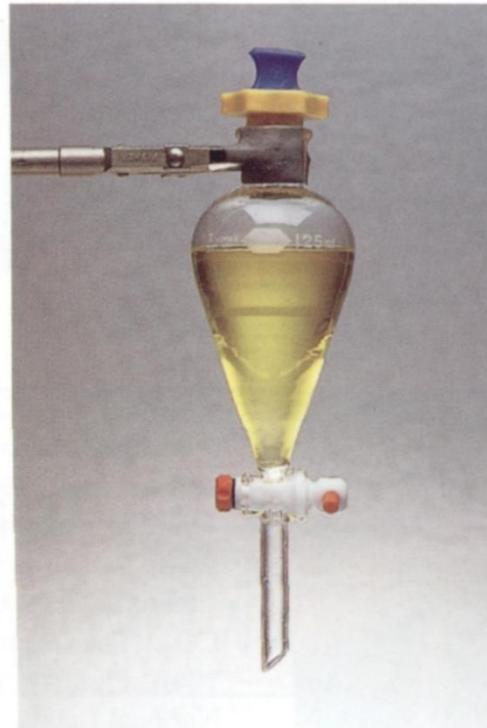
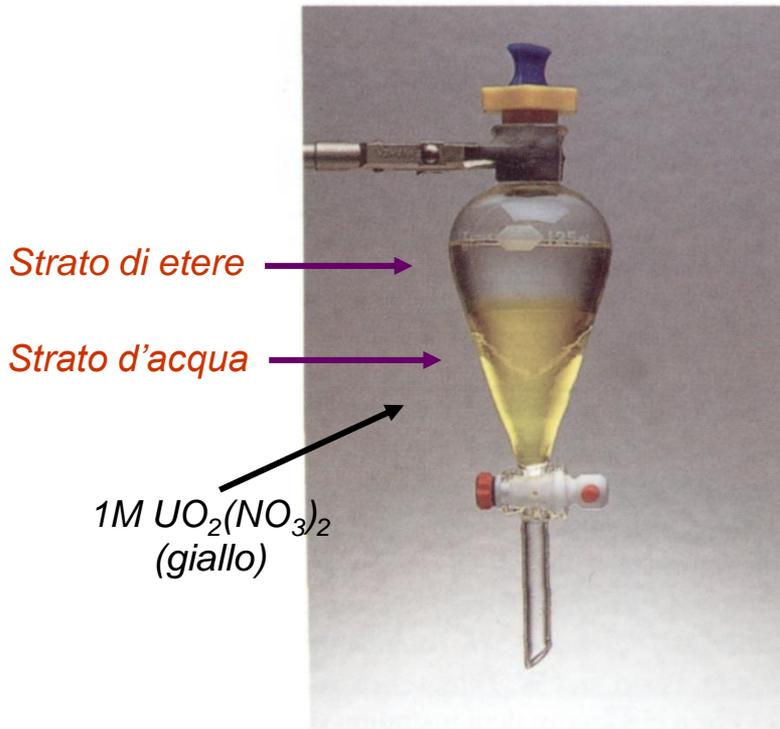
$$q_n = \left(\frac{V_1}{(V_1 + K_d \cdot V_2)} \right)^n$$



© 2004 Thomson - Brooks/Cole

segue →

Esempio di Efficienza Di Estrazione:



Dopo il mescolamento,
 $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ si distribuisce in
entrambi gli strati



Dopo 8 estrazioni,
 $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ è stato
rimosso dall'acqua

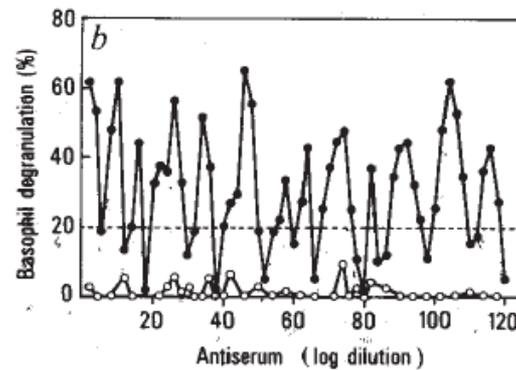
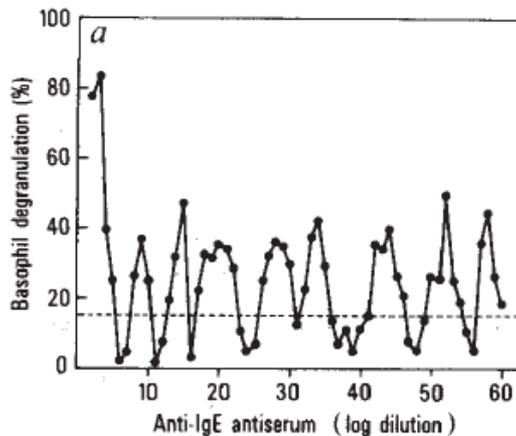
segue →

Cosa accade se $n \rightarrow \infty$?

la quantità di s che rimane nella fase 1 $\rightarrow 0$ (la soluzione è infinitamente diluita).

This Situation Created a Strange Saga in Science – Water Memory

- a founding principal of homeopathic medicine
- the claim is that water *remembers* the activity of the drug after it has been removed



Nature (1988) 333:816-818

Authors' claim to still observe antibody activity even after a 1×10^{120} fold dilution.

Less than 1 molecule is present with a 1×10^{14} dilution

Human basophil degranulation triggered by very dilute antiserum against IgE

E. Davenas, F. Beauvais, J. Amara, M. Oberbaum, B. Robinson, A. Miadonnai, A. Tedeschi, B. Pomeranz, P. Fortner, P. Belon, J. Sainte-Laudy, B. Poitevin & J. Benveniste

Nature 333, 816–818 (30 June 1988)

doi:10.1038/333816a0

Download Citation

Received: 24 August 1987

Accepted: 13 June 1988

Published online: 30 June 1988

Scientific Paper

Human basophil degranulation is not triggered by very dilute antiserum against human IgE

S. J. Hirst, N. A. Hayes, J. Burridge, F. L. Pearce & J. C. Foreman

Nature 366, 525–527 (09 December 1993)

doi:10.1038/366525a0

Download Citation

Received: 16 April 1993

Accepted: 22 October 1993

Published online: 09 December 1993

segue →

Esempio 1:

Il Soluto A ha una $K_d = 3$ per un'estrazione tra acqua (fase 1) e diclorometano (fase 2).

Se 100 mL di una soluzione 0.01M di A in acqua sono sottoposti ad estrazione per una volta con 500 mL diclorometano, che frazione sarà estratta?

Soluzione:

prima si determina la frazione NON estratta (q):

$$q_n = \left(\frac{V_1}{(V_1 + K_d \cdot V_2)} \right)^n = \left(\frac{100}{(100 + 3 \cdot 500)} \right)^1 = 0.062 = 6.2 \%$$

La frazione di **s** estratta (p) è uguale a:

$$p = 1 - q = 1 - 0.062 = 0.938 = 93.8 \%$$

segue →

Esempio 2:

Il Soluto A ha una $K_d = 3$ per un'estrazione tra acqua (fase 1) e diclorometano (fase 2). (**come esempio 1**)

Se 100 mL di una soluzione 0.01M di A in acqua (**come esempio 1**) sono sottoposti ad estrazione **per 5 volte con 100 mL** diclorometano, che frazione sarà estratta?

Soluzione:

prima si determina la frazione NON estratta (**q**):

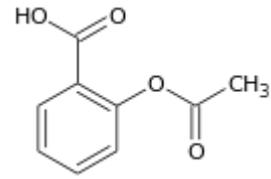
$$q_n = \left(\frac{V_1}{(V_1 + K_d \cdot V_2)} \right)^n = \left(\frac{100}{(100 + 3 \cdot 100)} \right)^5 = 0.00098 = 0.098 \%$$

La frazione di **s** estratta (**p**) è uguale a:

$$p = 1 - q = 1 - 0.00098 = 0.99902 = 99.902 \%$$

Conclusione: per lo stesso volume totale di diclorometano (500 mL), si estrae più A se si impiegano molte piccole porzioni di diclorometano piuttosto che una unica grande aliquota.

Effetto del pH sulle estrazioni:



➤ Per acidi (HA) e Basi (B) deboli

- Le forme protonate e non-protonate usualmente hanno diversi coefficienti di partizione (K_d)
- Forme con carica (A^- or BH^+) NON saranno estratte in fase organica
- Forme neutre (HA or B) saranno estratte

➤ La partizione è descritta in termini del quantitativo totale di sostanza (Total Amount of a Substance)

- Le concentrazioni individuali di B & BH^+ o HA & A^- sono più difficili da determinare
- La Partizione non dipende dalla forma in entrambe le fasi
- E' descritta dal Coefficiente di Distribuzione (D)

$$D = \frac{\text{Concentrazione totale di A nella fase 2}}{\text{Concentrazione totale di A nella fase 1}}$$

segue →

➤ **La distribuzione di una base o di un acido deboli sono pH dipendenti**

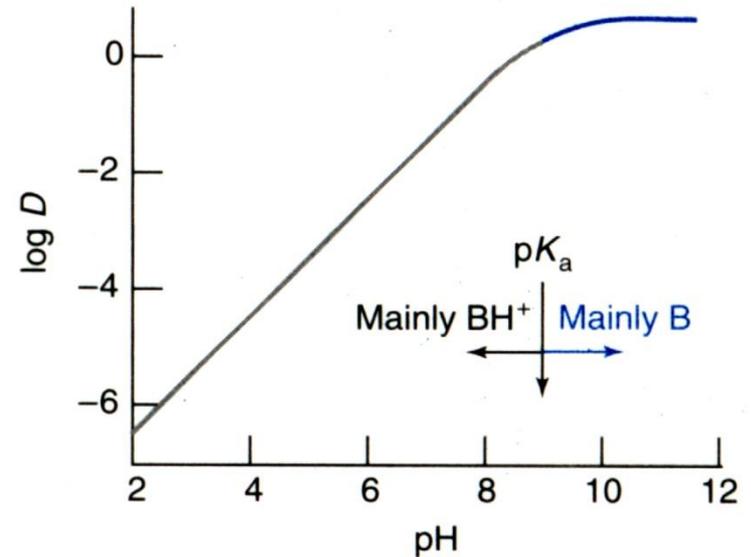
Per una base debole (B) per la quale BH^+ esiste solo nella fase 1:

$$D = \frac{\text{Concentrazione totale di A nella fase 2}}{\text{Concentrazione totale di A nella fase 1}}$$



$$K_{d(BH^+)} = \frac{0}{[BH^+]_1} = 0$$

$$D = \frac{[B]_2}{[B]_1 + [BH^+]_1}$$



segue →

Sostituendo le definizioni di K_a e $K_{d(B)}$ in D :

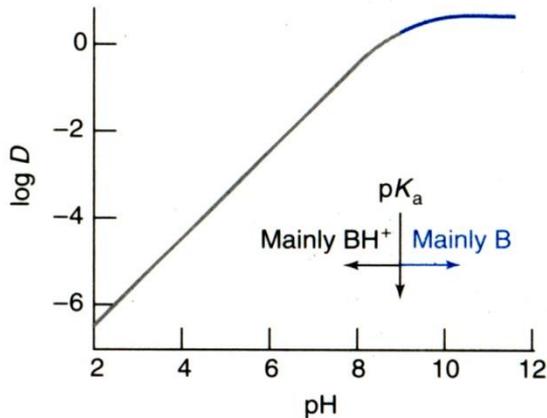
$$D = \frac{[B]_2}{[B]_1 + [BH^+]_1}$$

$$K_{d(B)} = \frac{[B]_2}{[B]_1}$$

$$K_a = \frac{K_w}{K_b} = \frac{[H^+][B]}{[BH^+]}$$

(coefficiente di partizione)

(costante di equilibrio)



$$D = \frac{K_{d(B)} K_a}{K_a + [H^+]}$$

D è direttamente correlato a $[H^+]$

segue →

Una simile espressione può essere utilizzata per un acido debole HA:

$$D = \frac{K_{d(HA)} [H^+]}{K_a + [H^+]}$$

dove: $K_{d(HA)} = \frac{[HA]_2}{[HA]_1}$

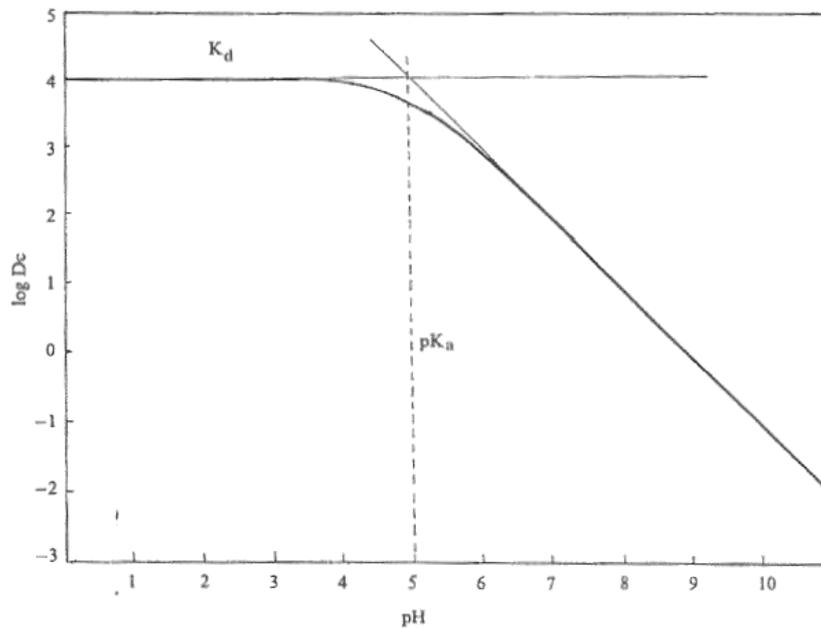


Figure 14.1. Distribution ratio as a function of pH in the partitioning of hypothetical carboxylic acid ($pK_a/5$) between an organic phase and an aqueous buffer solution ($K_d = 10^4$)

Quando $[H^+] \gg K_a$, $D \approx K_{d(HA)}$

segue →

> **La possibilità di modificare - attraverso il pH - il rapporto di distribuzione di un acido debole o di una base debole, è utile per selezionare le condizioni che estrarranno alcuni composti ma non altri.**

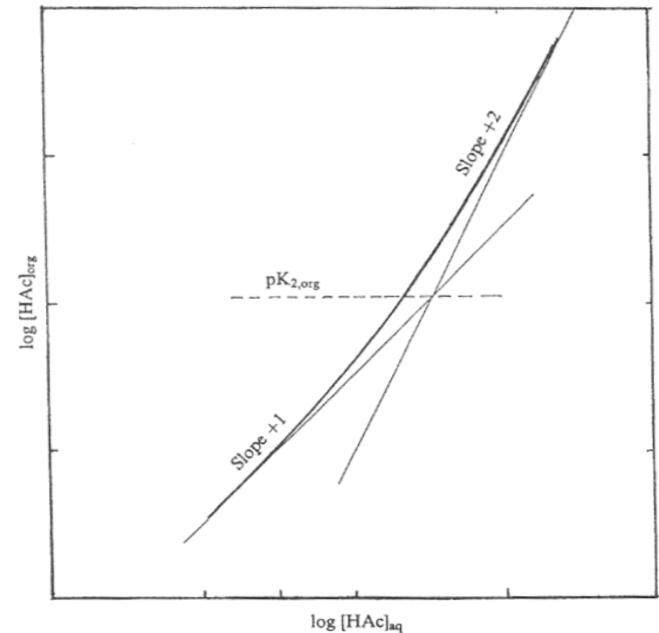
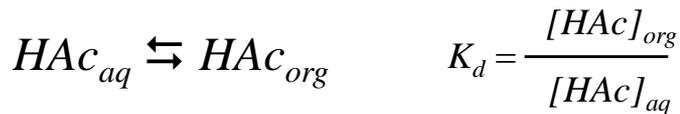
- Usare pH bassi per estrarre HA ma non BH⁺ (estrazione di acidi deboli)

- Usare pH elevati per estrarre B ma non A⁻ (estrazione di basi deboli)

Esempio:

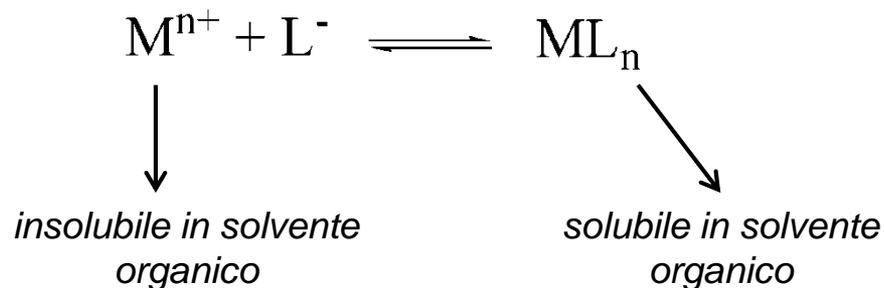
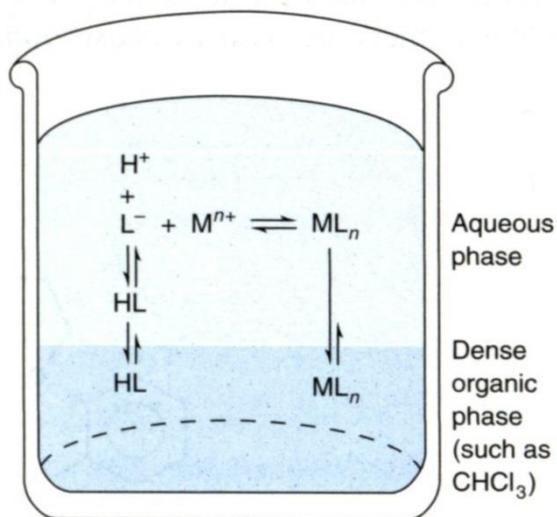
La specie estratta polimerizza in fase organica: l'acido acetico in un solvente organico non polare dimerizza

Figure 14.2. Hypothetical extraction of acetic acid from an aqueous phase into an organic solvent in which the acid forms a dimeric species



Estrazioni con agenti chelanti per metalli:

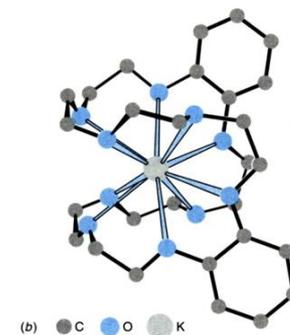
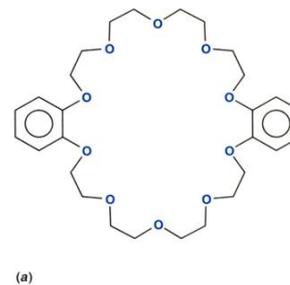
Ioni metallici possono essere separati l'uno dall'altro usando vari agenti complessanti organici che rendono il metallo solubile in solvente organico.



Agenti complessanti comuni:

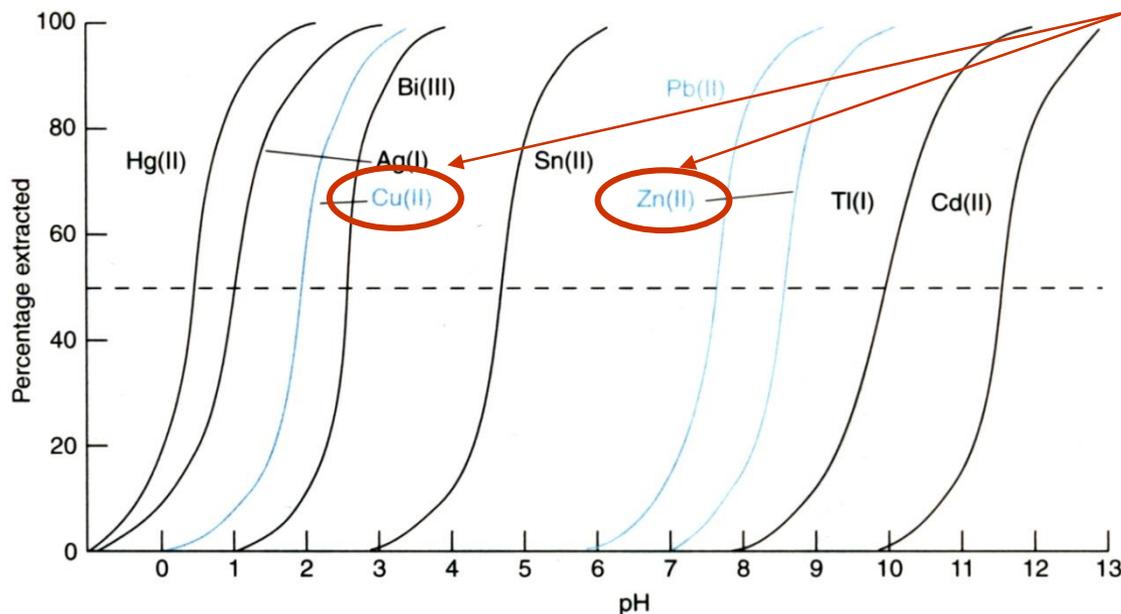


Crown ethers



segue →

- **Molti agenti complessanti si legano a una varietà di metalli:**
 - *Differente forza e costanti di equilibrio*
- **L'estrazione di uno ione metallico può esser resa selettiva per un particolare metallo attraverso:**
 - *La scelta di un agente complessante con elevata affinità per quel metallo (piccola K)*
 - *La regolazione del pH nell'estrazione*



Cu²⁺ è estratto completamente dalla soluzione a pH 5 mentre lo Zn²⁺ rimane nella soluzione acquosa.

Selettività del pH per il ditizione per l'estrazione di ioni metallici