

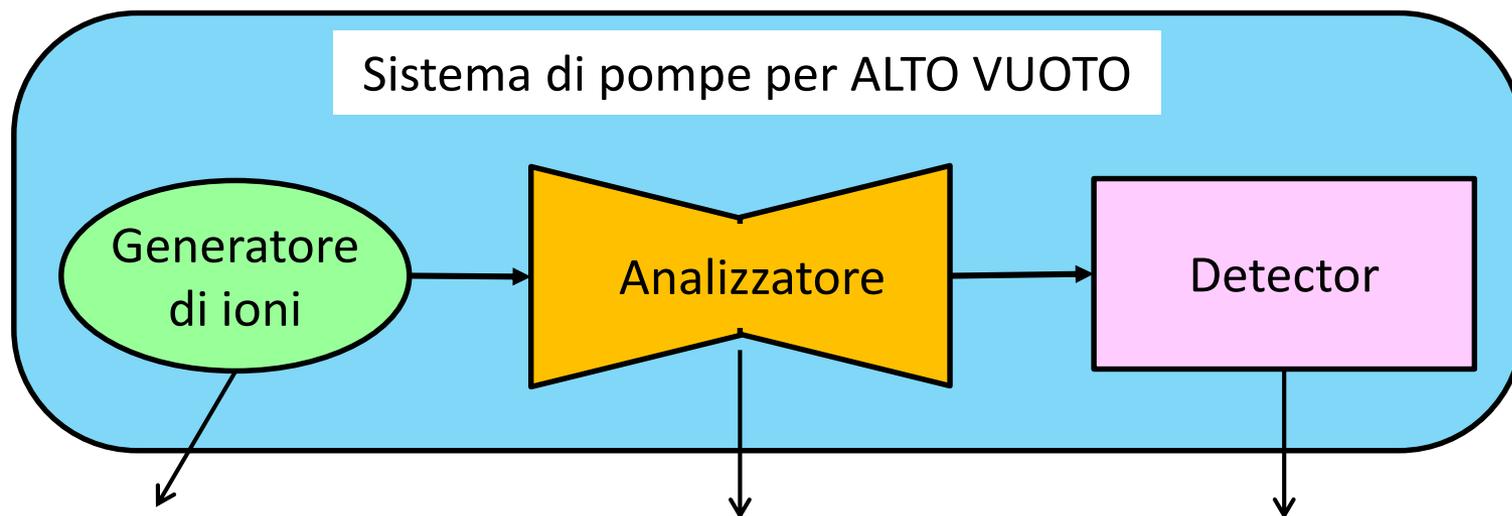
CHIMICA ANALITICA II

CON LABORATORIO

(AA 2019-20)

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

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)

Analizzatori (o selettori di m/z)

Per separare gli ioni formati tramite l'utilizzo dei sistemi di ionizzazione si sfruttano due fenomeni correlati alla massa ed alla carica.

- 1) la traiettoria di uno ione o di una particella carica in movimento può essere modificata per azione di un campo magnetico od elettrico, e l'entità della deviazione è funzione del rapporto m/z della particella: a parità di carica, particelle di massa minore subiranno deviazione maggiore;**
- 2) ioni o particelle cariche, accelerati da un campo elettrico, assumono velocità diverse in dipendenza della loro massa: a parità di carica, particelle di massa maggiore assumono velocità minore.**

Gli spettrometri di massa di prima generazione sfruttavano unicamente il primo fenomeno; attualmente sono disponibili strumenti che si basano sul primo o sul secondo fenomeno.

Gli analizzatori di tipo (1) sono detti "a scansione" poiché fanno passare ioni a differente m/z uno alla volta in lungo un certo percorso al loro interno.

Gli analizzatori di tipo (2) fanno passare tutti gli ioni assieme lungo un certo loro percorso interno.

segue →

Le cinque principali caratteristiche atte a valutare le prestazioni di un analizzatore di massa sono:

- 1) **l'intervallo di m/z misurabili;**
- 2) **la velocità di analisi (detta anche velocità di scansione)** ovvero la velocità a cui l'analizzatore riesce a misurare un certo intervallo di m/z (espressa in $u \cdot s^{-1}$ o $u \cdot ms^{-1}$);
- 3) **la trasmissione** ovvero il rapporto tra il numero di ioni che raggiungono il detector (quindi in uscita dall'analizzatore) rispetto al numero di ioni che entrano nell'analizzatore;
- 4) **l'accuratezza di misura della massa** ovvero la differenza tra risposta sperimentale e la massa esatta teorica (per misurare l'accuratezza si utilizzano sostanze di cui si conosce la massa esatta);

“The achievable mass accuracy in practice depends on the resolution of the mass analyzer and the quality and stability of the calibration of the m/z axis. An instrument providing unit-mass resolution generally allows m/z determination for single-charge ions with an accuracy of ± 0.1 u (nominal mass determination). In HRMS, the mass accuracy is generally expressed either as an absolute mass error (accurate mass–exact mass, in mu) or as a relative error (in ppm), calculated from

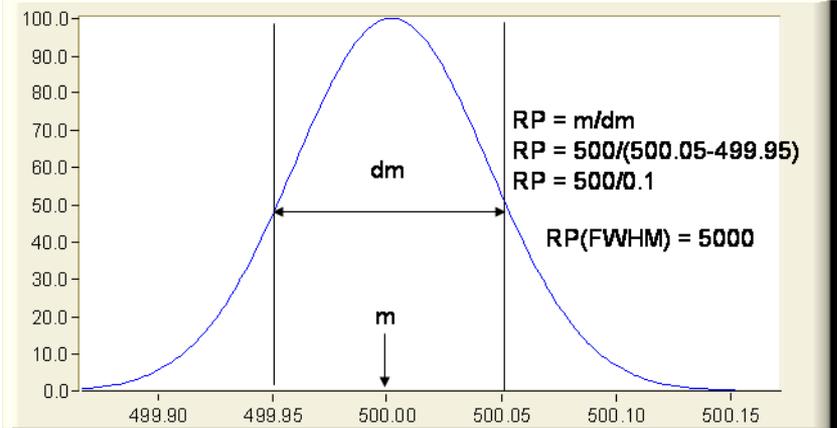
$$\frac{(\text{accurate mass} - \text{exact mass})}{(\text{exact mass})} \times 10^6$$

In HRMS of small molecules, the error in m/z determination will typically be in the third decimal place (accurate mass determination).”

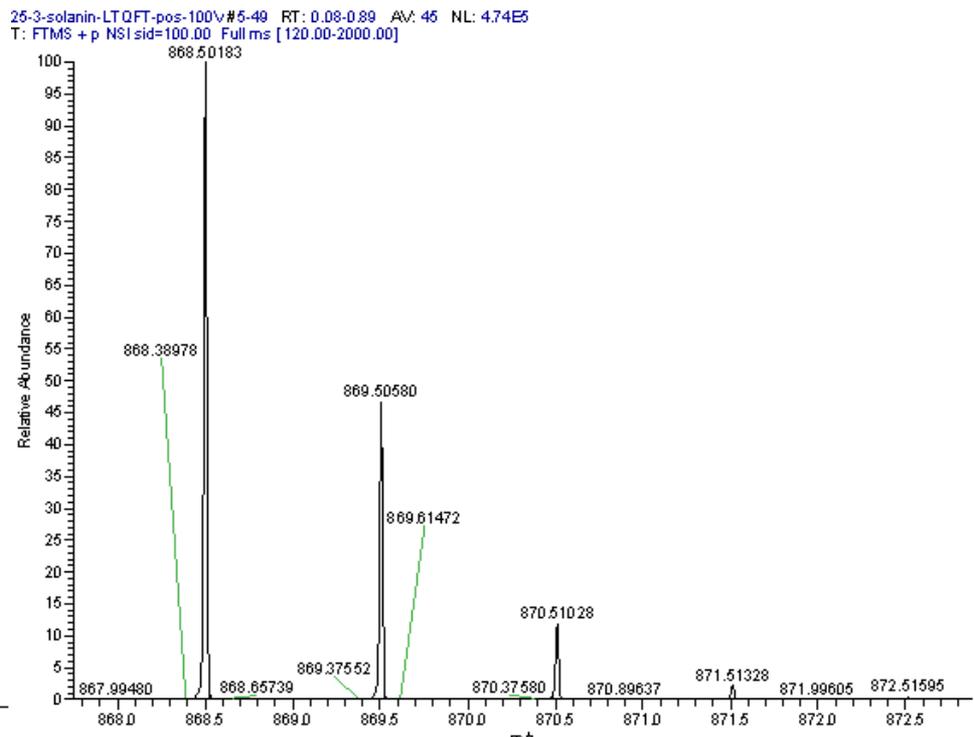
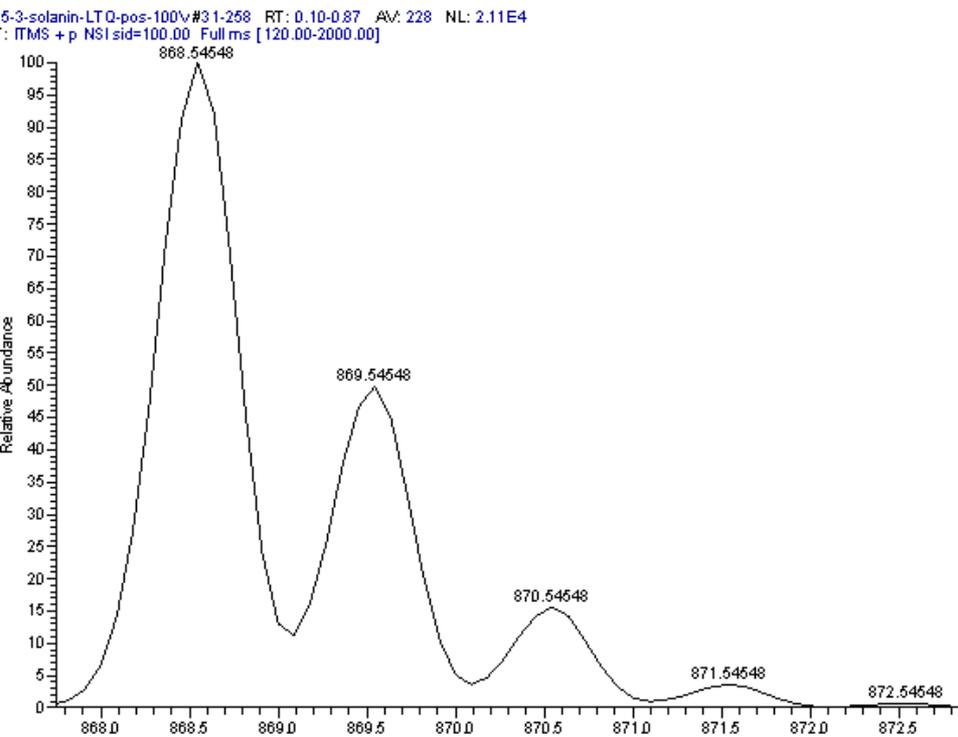
- 5) **il potere risolvete** ovvero il più piccolo $\Delta m/z$ che l'analizzatore riesce a discriminare.

Risoluzione (Resolving Power) FWHM

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

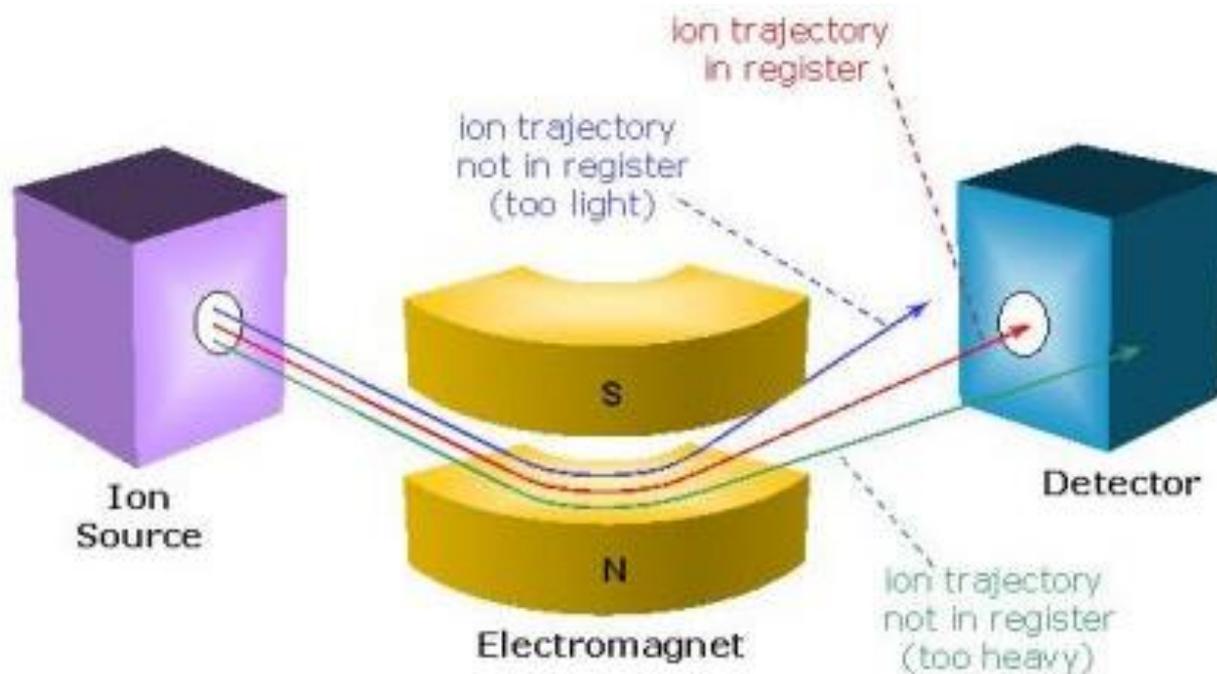


LTQ (low resolution, resolving power $R = 1737$ at m/z 868.5, peak width ~ 0.5 FWHM) and LTQ-FT (high resolution, resolving power = 48,250 at m/z 868.5, peak width ~ 0.018 ; FWHM)



L'analizzatore a Settore Magnetico

La tecnica consiste nell'accelerare ad alta velocità gli ioni provenienti dallo ionizzatore facendoli passare attraverso un settore magnetico in cui un campo magnetico è applicato perpendicolarmente rispetto alla direzione degli ioni. Variando il campo magnetico si consente solo a ioni con un determinato m/z di raggiungere il detector percorrendo una traiettoria corretta. Gli ioni a diverso m/z impattano contro le pareti dello strumento e non raggiungono il detector. Variando il campo magnetico con un certo "passo" si riesce a portare al detector gli ioni con diversi m/z "uno alla volta" (o meglio a "pacchetti" di ioni con massa uguale).



segue →

Per spiegare quale effetto viene esercitato su una particella carica che entra in un campo magnetico viene utilizzata l'**equazione della forza di Lorentz**. La forza di Lorentz (F_L) dipende dalla velocità della particella (v), dal campo magnetico (B) e dalla carica dello ione (q). Nella forma più semplice lo scalare della forza (che per sua natura è un vettore) è così espresso:

$$F_L = qvB$$

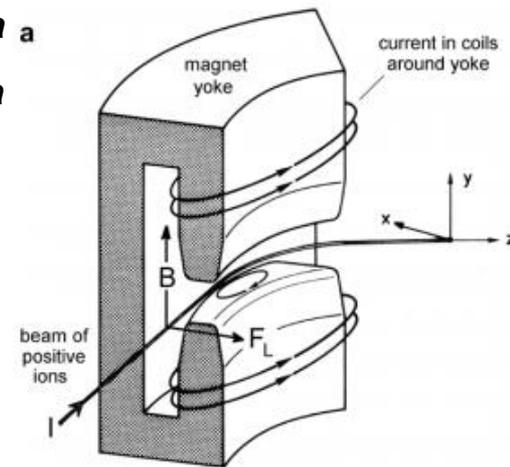
Questa espressione è valida se la velocità (v) e il campo magnetico (B) sono perpendicolari tra di loro.

Uno ione di massa (m) e carica (q) che viaggia in direzione perpendicolare rispetto a quella di un campo magnetico omogeneo **seguirà una traiettoria circolare di raggio (r_m)** che soddisfa le condizioni di equilibrio tra F_L e la forza centrifuga apparente F_C .

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

Dal riarrangiamento dell'equazione precedente si ottiene il raggio (r_m) di questa traiettoria circolare:

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



Questa espressione mostra il principio di funzionamento del settore magnetico, dove il raggio (r_m) della traiettoria di uno ione dipende dal suo momento (mv) e dalla sua carica (q), a parità di campo magnetico (B).

segue →

Bisogna ricordare che lo ione entra nel campo magnetico dopo aver subito una accelerazione nel sistema di ionizzazione. La sua energia cinetica in uscita dallo ionizzatore dipende dalla differenza di potenziale che è stata applicata, cioè dal campo elettrico applicato:

$$E_k = E_{el}$$

da cui:

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

dove:

$ez = q$ (carica dello ione) e

U = differenza di potenziale del campo elettrico

Quindi la velocità dello ione si può esprimere come:

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

Riprendendo le formule della slide precedente ($r = mv/qB$) e sostituendo v :

$$r_m = \frac{m_i}{ezB} \sqrt{\frac{2ezU}{m_i}} = \frac{1}{B} \sqrt{\frac{2\cancel{ez}m_i^2U}{z^2\cancel{e^2}m_i}} \quad \longrightarrow \quad r_m = \frac{1}{B} \sqrt{\frac{2m_iU}{ze}}$$

Quindi r_m dipende dalla radice quadrata del rapporto m/z .

segue →

Alternativamente il rapporto m_i/q può essere espresso come:

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

da cui, per sostituzione di v , si ottiene:

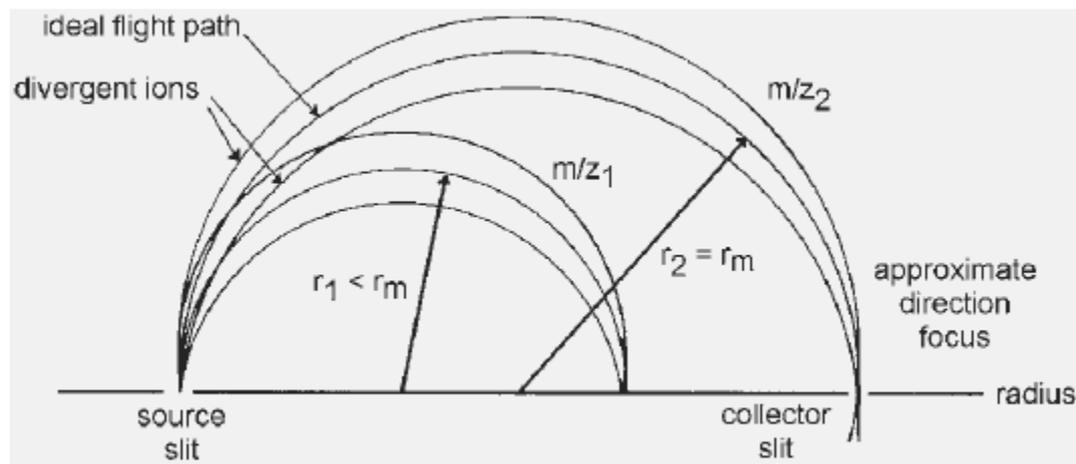
$$\frac{m_i}{q} = \frac{r_m B}{\sqrt{\frac{2qU}{m_i}}} \Rightarrow \frac{m_i}{q} = \frac{r_m^2 B^2}{2U}$$

Essendo il settore magnetico il primo tipo di analizzatore impiegato, l'equazione soprastante un tempo era conosciuta come "l'equazione base della spettrometria di massa".

Poiché ad oggi molti diversi analizzatori sono stati progettati e realizzati, è noto che in ogni tipo di analizzatore lo ione si comporta secondo una equazione base diversa che dipende dal modo in cui è stato costruito l'analizzatore impiegato.

segue →

La focalizzazione che avviene applicando un campo magnetico omogeneo a un fascio di ioni che hanno la stessa m/z e la stessa energia cinetica può essere ben illustrato su un settore circolare di 180° .



$$\frac{m_i}{q} = \frac{r_m^2 B^2}{2U}$$

Ad r_m , dati che siano B e U , giungono ioni caratterizzati da m_i/q

Ioni con differente m/z viaggiano lungo un traiettoria con un raggio diverso. Ad es. gli ioni più leggeri m_1/z collidono con la parete dello strumento mentre gli ioni con m_2/z riescono a raggiungere la fenditura (slit).

Per consentire la rivelazione di diverse masse, questo tipo di analizzatore fu equipaggiato con una piastra fotografica quale detector che deve essere posizionata nel piano focale. In questo modo sono stati ottenuti i primi, così detti, spettrografi di massa.

Alternativamente questo tipo di analizzatore può essere **concepito con un campo magnetico variabile** che consente di portare alla fenditura differenti m/z , quindi varia B e rimane costante r_m . In questo modo, effettuando una **scansione**, si riescono a portare alla fenditura in sequenza (nel tempo) tutti i rapporti m/z desiderati

segue →

Il design di settore magnetico di 180° richiede settori magnetici larghi e pesanti. Un singolo settore magnetico ottimizzato può dare una risoluzione di $R = 2000-7000$, dipendentemente dal raggio. $R = m/\Delta m$ (FWHM)

La limitazione nasce dal fatto che **gli ioni che emergono dalla sorgente non sono di fatto monoenergetici**, quindi ioni con differente m/z possono avere lo stesso momento (mv) e pertanto entrare insieme nella fenditura e sovrapporsi nella rivelazione.

Ad es. considerando l'equazione:
$$r_m = \frac{1}{B} \sqrt{\frac{2m_i U}{ze}}$$
 che deriva da
$$r_m = \frac{m_i v}{qB}$$

r_m rimane costante finché $m_i U = \text{cost}$. Se lo strumento lascia passare uno ione di $m/z = 500$ e energia di 3000eV , farà passare allo stesso modo anche uno ione di $m/z = 501$ con energia = 2994eV o $m/z = 499$ con energia 3006eV .

Questo è il motivo per cui per ottenere una alta risoluzione la distribuzione di energie cinetiche deve stare in un intervallo molto stretto.

Questa necessità ha portato alla progettazione di strumenti a DOPPIA FOCALIZZAZIONE.

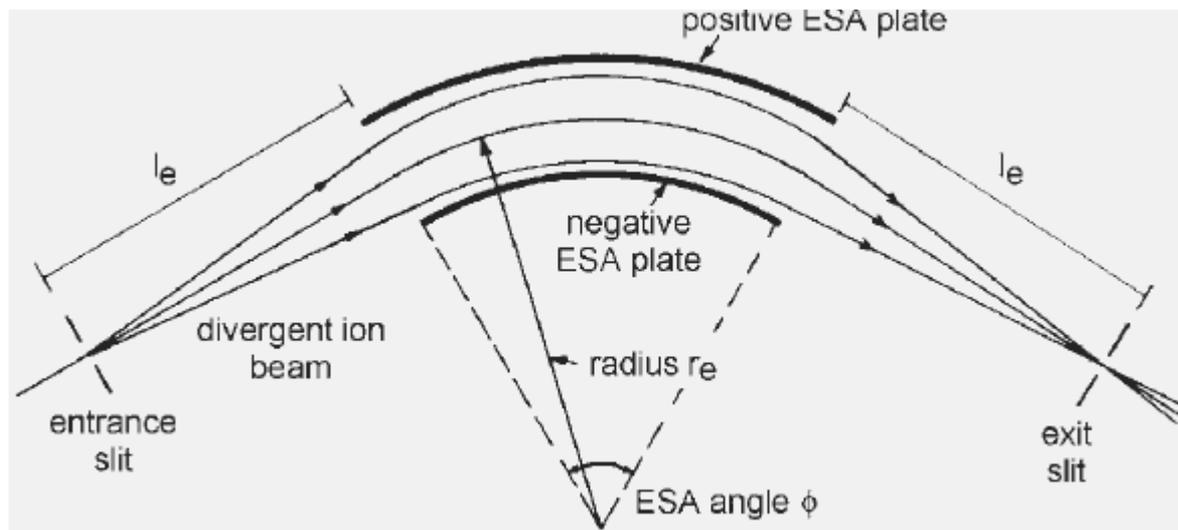
segue →

Si immagini uno **ione** (m/z con v maggiore dell'ideale) **che segue un percorso di deriva verso l'outer plate** che ha la stessa carica dello ione.

Al suo avvicinarsi al plate lo ione subisce una decelerazione a causa del campo elettrico opposto ed infine viene riflesso verso il centro del fascio. Dato che **la sua componente radiale della velocità (v) viene invertita, esso attraversa il cammino ideale l_e .**

Allo stesso modo, **uno ione** (m/z con v minore dell'ideale) **che si avvicina all'inner plate** viene accelerato dalla forza attrattiva.

La velocità incrementata che ne risulta, causa un aumento della forza centripeta e quindi agisce come una correzione della traiettoria verso quella ideale.

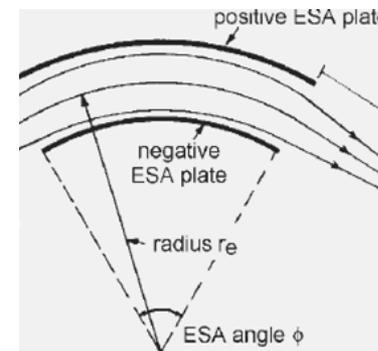


segue →

Il settore elettrostatico o analizzatore elettrostatico (ESA) produce un campo elettrico radiale tra due lastre (plates) a carica opposta che si estendono attraverso l'angolo ESA (Φ). Uno ione attraversa il percorso intermedio (centrale) di un ESA su un percorso circolare se:

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

dove F_e = forza elettrica, E = intensità del campo elettrico, r_e = raggio dell'ESA.



ESA funziona come dispositivo di dispersione di energia:

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

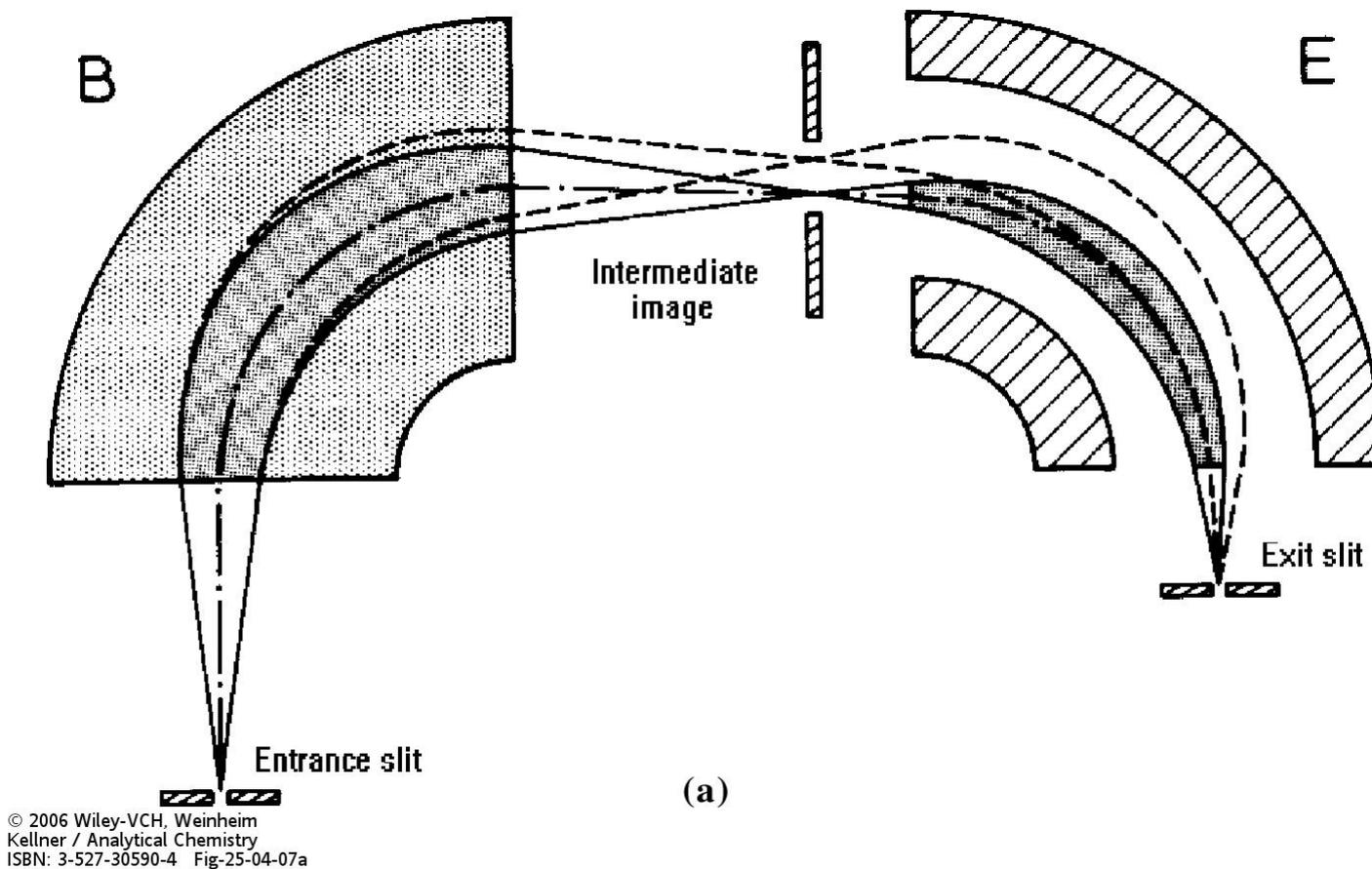
$$v = \sqrt{\frac{2ezU}{m_i}}$$

la distribuzione di energia cinetica di un fascio di ioni può essere ristretta. La seguente relazione descrive il raggio dell'ESA.

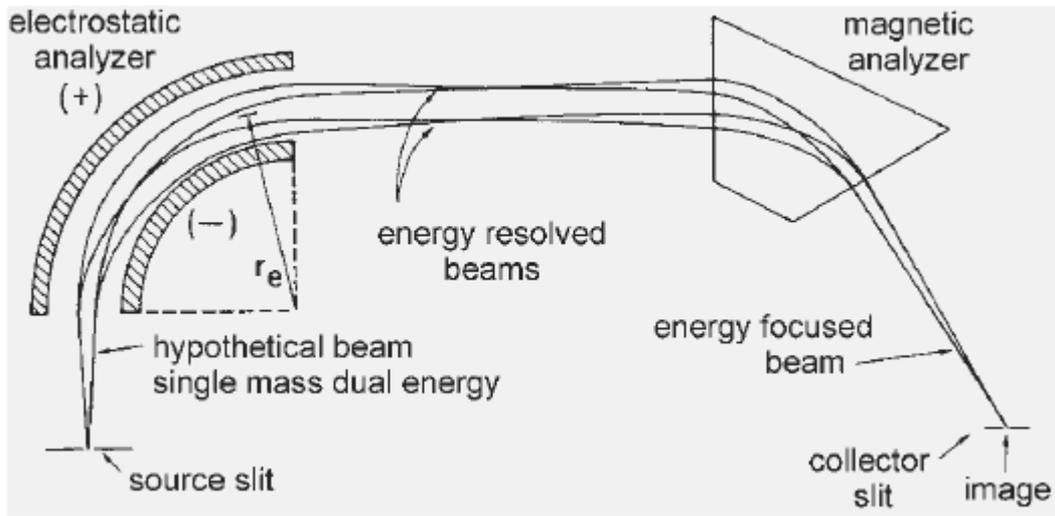
$$r_e = \frac{2U}{E}$$

segue →

Dall'accoppiamento di un settore elettrostatico ESA e di un settore magnetico B si ottengono gli strumenti a DOPPIA FOCALIZZAZIONE

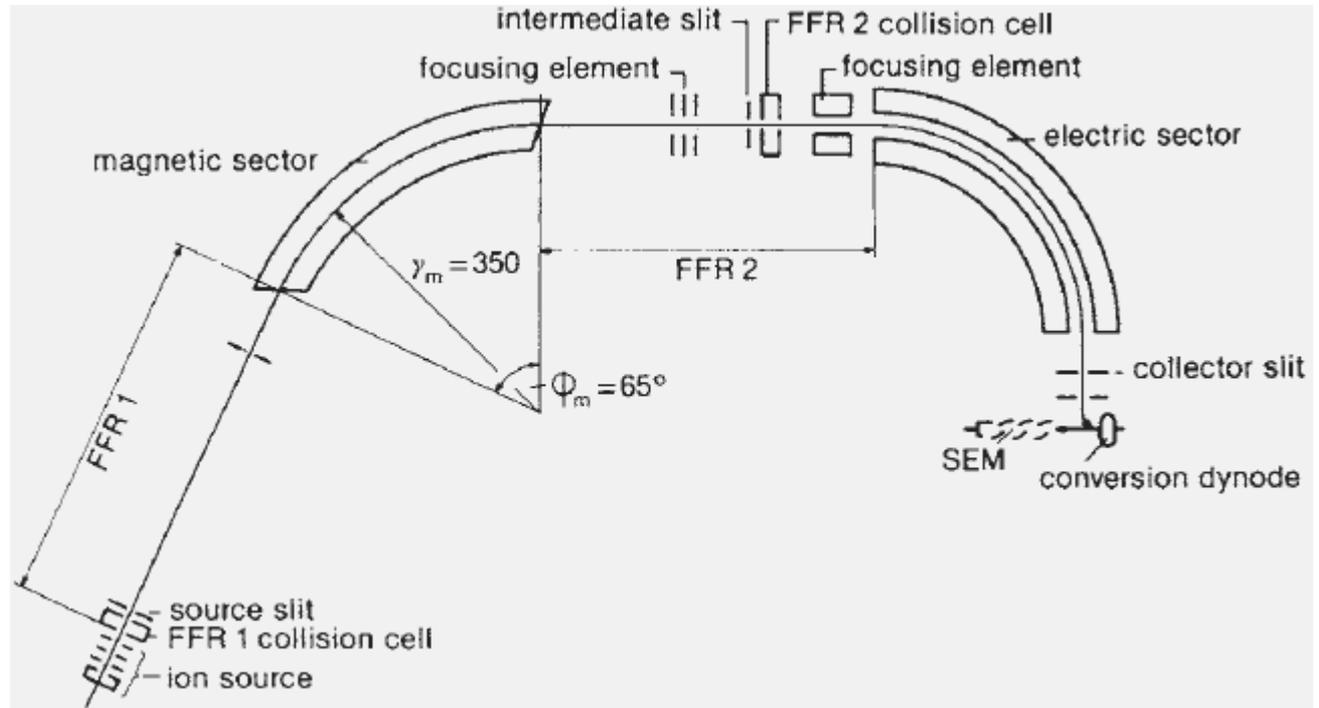


segue →



Configurazione diretta EB
R>10000

Configurazione
 Inversa BE
R>70000



segue →

IN CONCLUSIONE:

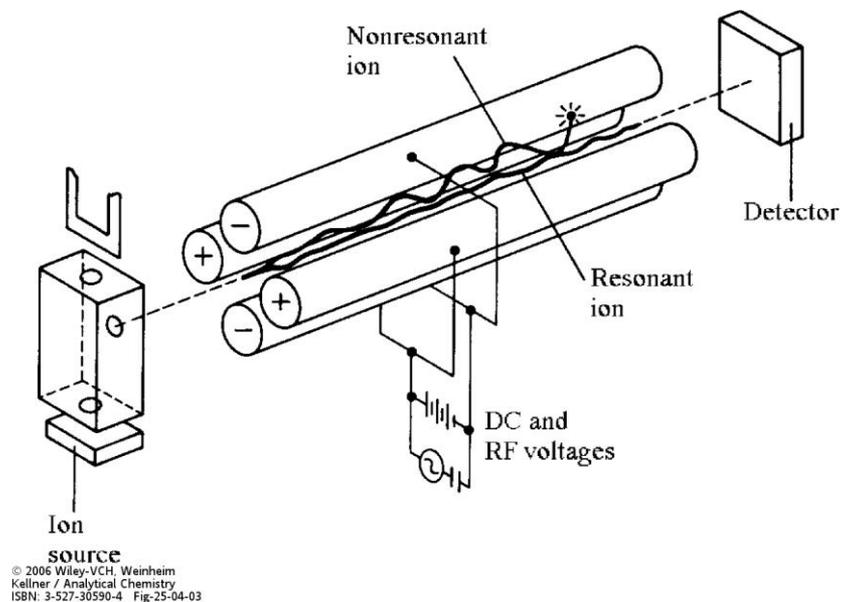
La separazione di ioni con diverso rapporto m/z si può conseguire con:

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

L'analizzatore a quadrupolo

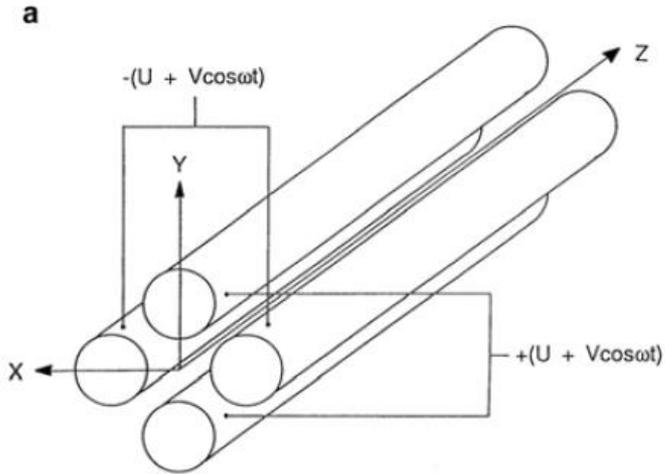
Ioni generati dalla sorgente ionica sono estratti elettrostaticamente e introdotti in un analizzatore di massa (filtro) a quadrupolo.

È un dispositivo che consiste di quattro barre di acciaio con sezione circolare o iperboliche, posizionate parallelamente con disposizione radiale.

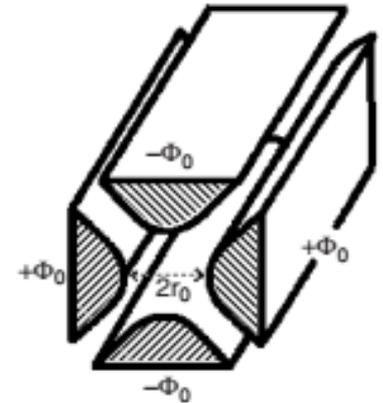


segue →

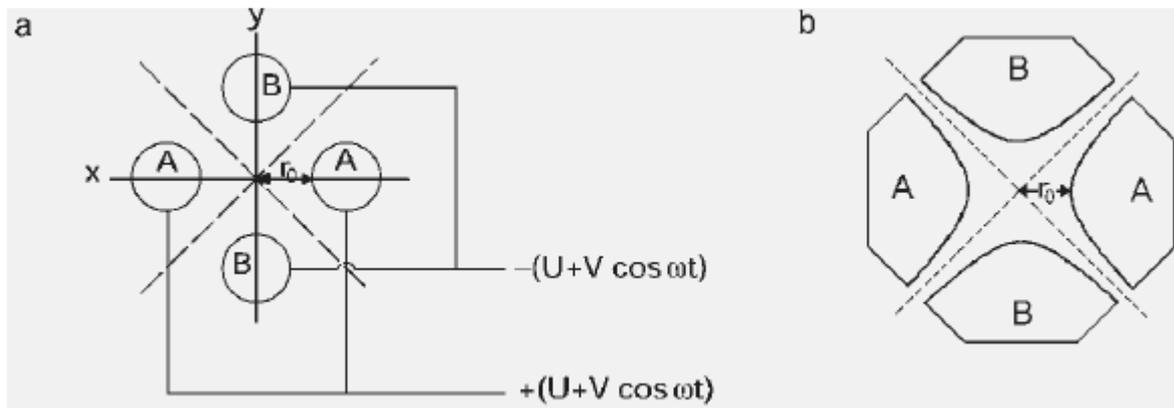
Un quadrupolo lineare consiste in quattro barre (elettrodi) a forma cilindrica o iperbolica **che si estendono nella direzione z e sono montate in configurazione perpendicolare (rispetto alle direzioni x e y)**



Le barre a due a due opposte sono mantenute allo stesso potenziale che è composto da una componente di **corrente continua (DC)** ed una di **corrente alternata (AC)**



Sezione di un quadrupolo (a) con barre di forma cilindrica, (b) con barre di forma iperbolica. Il campo elettrico è =0 lungo le linee tratteggiate.



segue →

Quando uno ione entra nel quadrupolo lungo l'asse z una forza attrattiva è operata su di esso da una delle barre, la barra di carica opposta rispetto allo ione.

Se il voltaggio applicato alle barre è periodico l'attrazione e la repulsione lungo le direzioni x e y (che sono entrambe perpendicolari al cammino dello ione in direzione z) vengono alternate nel tempo, poiché il cambio di voltaggio fa cambiare il segno al campo elettrico applicato.

Se il voltaggio applicato è composto da un voltaggio a corrente continua (DC) U e un radiofrequenza (RF) con voltaggio V e frequenza ω che funge da corrente alternata (AC), **il potenziale totale Φ_0** è dato da:

$$\Phi_0 = U + V \cos \omega t$$

Quindi le equazioni del moto della particella risultano essere:

$$\frac{d^2 x}{dt^2} + \frac{e}{m_i r_0^2} (U + V \cos \omega t) x = 0$$

$$\frac{d^2 y}{dt^2} - \frac{e}{m_i r_0^2} (U + V \cos \omega t) y = 0$$

Il campo elettrico è = 0 lungo i piani tratteggiati illustrati nelle figure della slide precedente, **quindi è possibile per uno ione attraversare il quadrupolo lungo l'asse z senza impattare contro le barre**, se il suo movimento ondulatorio intorno all'asse z è stabile ed ha ampiezza limitata nel piano xy.

Queste condizioni possono essere derivate dalla teoria delle equazioni di Mathieu.

segue →

Scrivendo le equazioni in forma adimensionale, si ottiene:

$$\frac{d^2 x}{d\tau^2} + (a_x + 2q_x \cos 2\tau)x = 0$$

$$\frac{d^2 y}{d\tau^2} + (a_y + 2q_y \cos 2\tau)y = 0$$

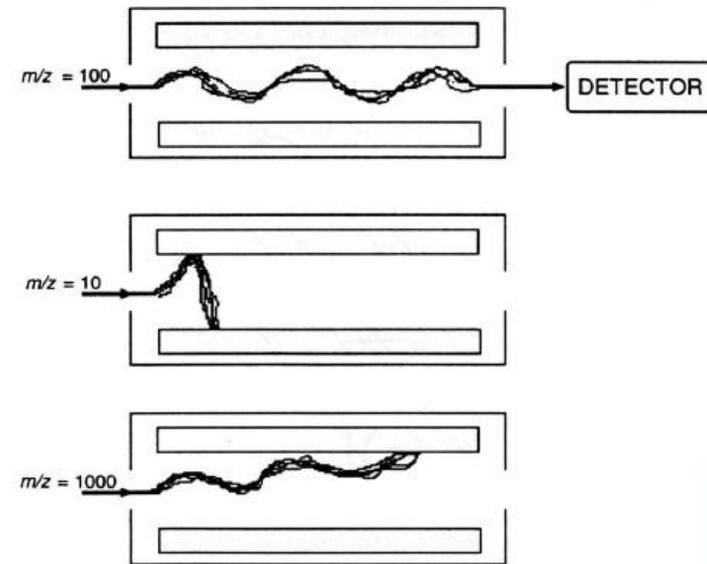
In cui i parametri a e q sono:

$$a_x = -a_y = \frac{4eU}{m_j r_0^2 \omega^2}, \quad q_x = -q_y = \frac{2eV}{m_j r_0^2 \omega^2}, \quad \tau = \frac{\omega t}{2}$$

Per una data combinazione di U , V e ω il moto risultante dello ione si esplica in una traiettoria stabile che consente a ioni con un certo m/z o un certo intervallo (ristretto) m/z di attraversare tutto il quadrupolo lungo la direzione z ed arrivare al detector.

Ioni che oscillano entro la distanza $2r_0$ tra gli elettrodi (o barre) hanno traiettorie stabili e arrivano al detector.

La stabilità del cammino (traiettoria) di un particolare ione è definita dalla grandezza del voltaggio V di RF (radiofrequenza) e dal rapporto U/V .



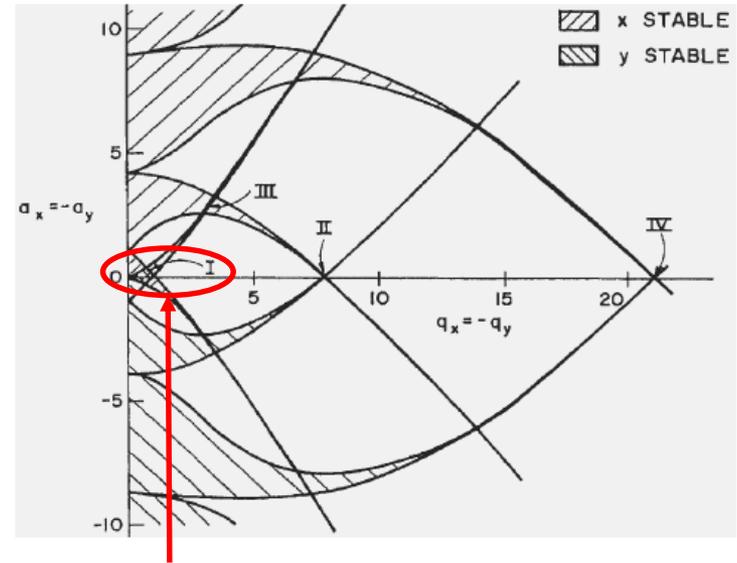
http://it.wikipedia.org/wiki/Funzioni_di_Mathieu

segue →

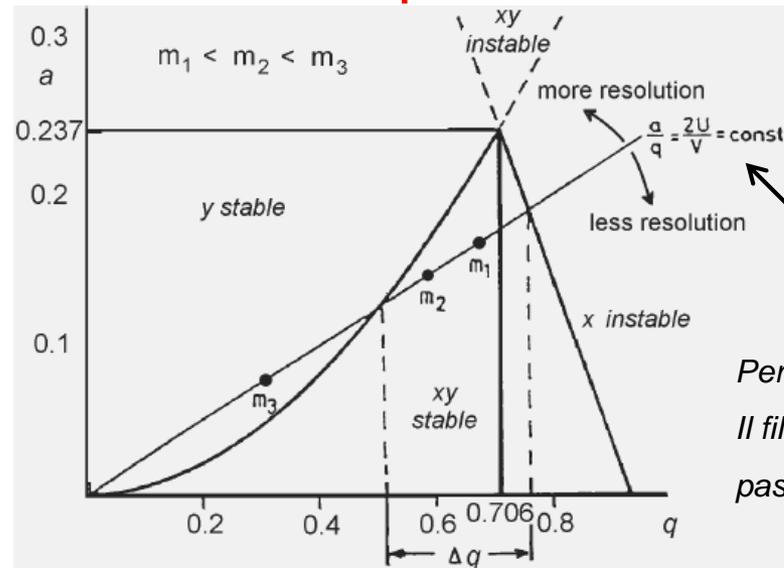
Riportando in grafico il parametro a (in ordinata, campo che non varia nel tempo) contro q (in ascissa, campo che varia nel tempo) si ottiene il **diagramma di stabilità di un campo quadrupolare a due dimensioni**.

Il diagramma mostra le regioni in cui:

- i. entrambe le traiettorie x - e y sono stabili;
- ii. la traiettoria x è stabile;
- iii. la traiettoria y è stabile;
- iv. entrambe le traiettorie x e y non sono stabili.



La regione contrassegnata con I è di particolare interesse per le normali operazioni di separazione di ioni in un quadrupolo



Dettaglio della metà superiore della regione I del diagramma di stabilità per un quadrupolo lineare

Per questo valore di a/q il filtro a quadrupolo fa passare sia m_1 che m_2

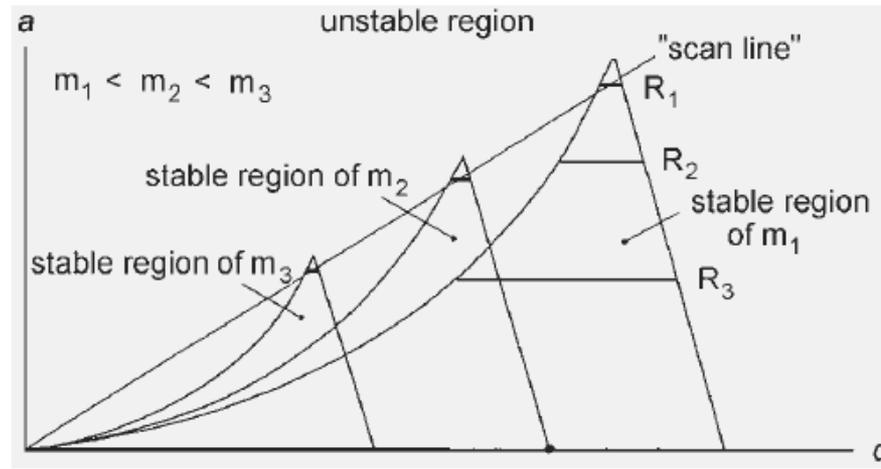
segue →

Se il rapporto a/q è scelto in modo che $2U/V = 0.237/0.706 = 0.336$, la zona di stabilità xy si restringe ad un unico punto, l'apice del diagramma.

Riducendo a e mantenendo q costante, quindi riducendo U relativamente a V , un intervallo sempre più grande di m/z può essere trasmesso contemporaneamente.

Una risoluzione sufficiente è raggiunta solo se un piccolo intervallo di m/z mantiene un cammino stabile lungo il quadrupolo, es. uno specifico $m/z \pm 0.5$ per unità di risoluzione.

Quindi, l'ampiezza Δq della regione di stabilità determina la risoluzione.



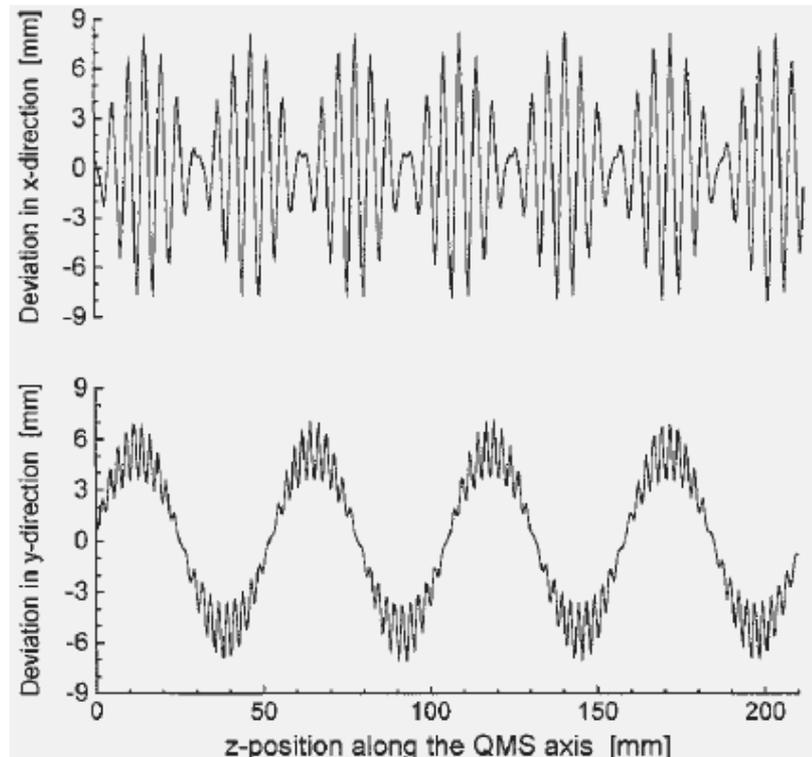
Variando la grandezza di U e V a rapporto costante U/V , si ottiene una scansione a $U/V = \text{cost}$, consentendo a ioni con crescente m/z di attraversare il quadrupolo.

Quindi un analizzatore a quadrupolo agisce da filtro di massa piuttosto che da spettrometro (selettore) di momento (come B) o di energia (come ESA). Infatti questi analizzatori sono comunemente indicati come **filtri di massa a quadrupolo**.

segue →

Le simulazioni di traiettoria di uno ione consentono la visualizzazione dei movimenti dello stesso mentre viaggia all'interno del quadrupolo.

Proiezione di una simulazione di traiettoria 3D stabile di uno ione lungo le coordinate xy.



Il numero ottimale di oscillazioni per raggiungere un certo livello di prestazione possono essere determinate. Inidicativamente le migliori prestazioni si ottengono quando ioni con energia cinetica di circa 10 eV vengono sottoposti a circa 100 oscillazioni durante il passaggio nel quarupolo.

Nota: *i quadrupoli standard hanno barre di circa 10-20 mm di diametro e di circa 15-25 cm di lunghezza.*

La radiofrequenza applicata è dell'ordine di 1-4 MHz e i voltaggi di DC e RF giacciono nell'intervallo 10^2 - 10^3 V.

segue →

IN CONCLUSIONE:

I moderni strumenti a quadrupolo coprono un intervallo di m/z di 2000-4000 con un buon potere risolvente. I vantaggi del quadrupolo sono:

- ❖ *alta trasmissione;*
- ❖ *leggerezza, compattezza e relativo basso costo della strumentazione;*
- ❖ *bassi voltaggi per l'accelerazione degli ioni;*
- ❖ *consentono alte velocità di scansione, poiché la scansione viene realizzata con la sola variazione di potenziali elettrici.*

Conceptual explanation of the way a Quadrupole Mass Filter works.

<https://www.youtube.com/watch?v=aYOCb6GnXio>

O

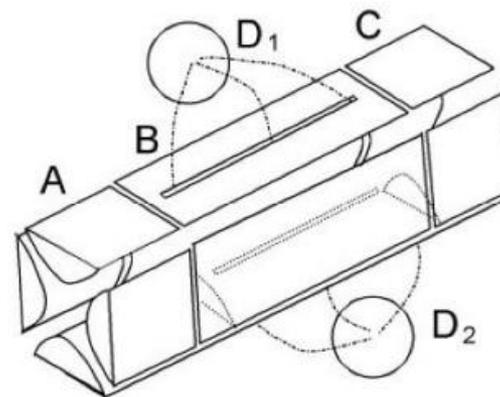
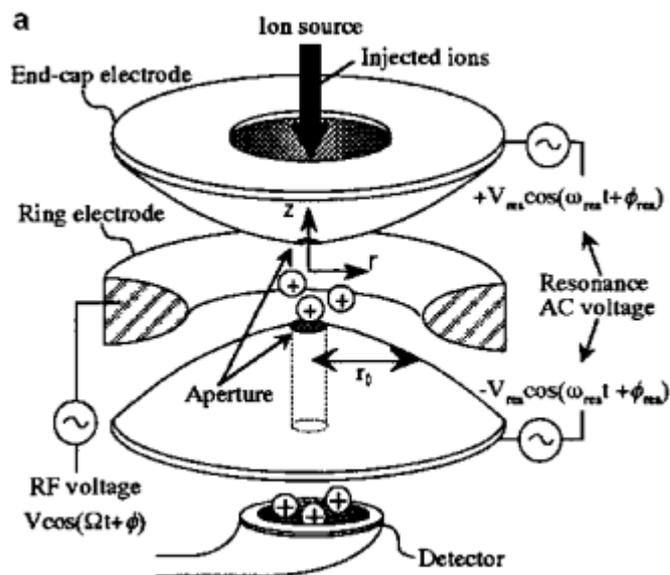
<https://www.youtube.com/watch?v=qxPb9vFWdgo> !!!

Trappole ioniche

Una trappola ionica è un dispositivo che utilizza un campo elettrico oscillante per immagazzinare ioni in uno spazio confinato detto "trappola". Essa utilizza un campo quadrupolare di radiofrequenze per intrappolare gli ioni in due o tre dimensioni.

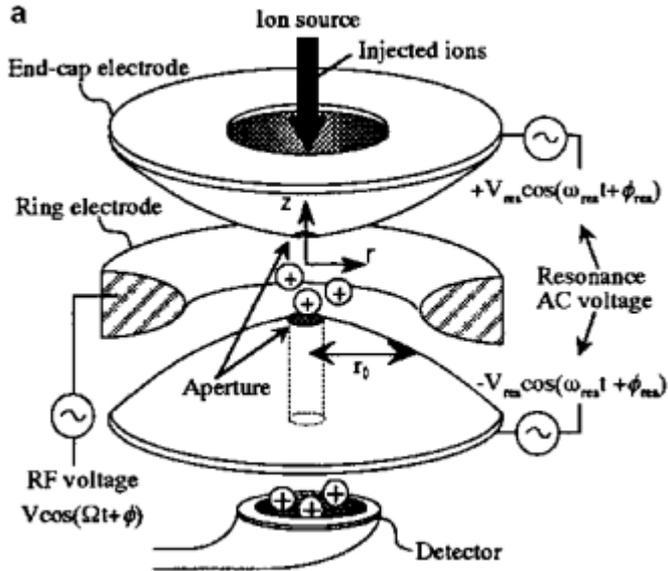
Le trappole in **3D** vengono dette **trappole ioniche quadrupolari (QIT – Quadrupole Ion Trap)**

Le trappole in **2D** vengono dette **trappole ioniche lineari (LIT – Linear Ion Trap)**



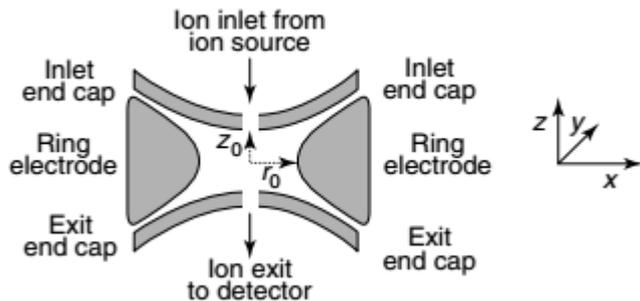
Trappole ioniche quadrupolari (QIT)

La trappola ionica quadrupolare (detta anche trappola ionica di Paul) può essere concettualmente immaginata come un quadrupolo ripiegato su se stesso a formare un anello.



I due elettrodi iperbolici sopra e sotto fungono da tappi (end caps), l'elettrodo centrale ad anello rappresenta la congiunzione circolare degli altri due elettrodi del quadrupolo lineare.

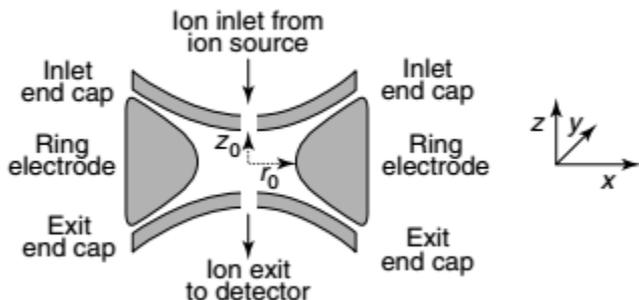
Quindi una sezione di QIT attraverso il piano rz ricorda la sezione del quadrupolo con barre iperboliche.



I due "end caps" sono connessi elettricamente e potenziali DC e RF vengono applicati tra di essi e l'elettrodo circolare.

segue →

Per rimanere all'interno della trappola uno ione deve avere una traiettoria stabile sia nella direzione z che nella direzione r (le particelle ruotano nelle direzione r e oscillano sulla direzione z).



Il QIT intrappola ioni di un determinato intervallo di m/z (in alcuni tipi di dispositivo gli ioni vengono generati direttamente all'interno della trappola)

Aumentando il potenziale con radiofrequenza, le traiettorie degli ioni a m/z successivi sono resi instabili e espulsi dalla trappola, e rilevati dal detector.



L'end-cap superiore è dotato di un foro per l'introduzione di ioni nella trappola, mentre l'end-cap inferiore è dotato di un foro per l'espulsione degli ioni verso il detector.

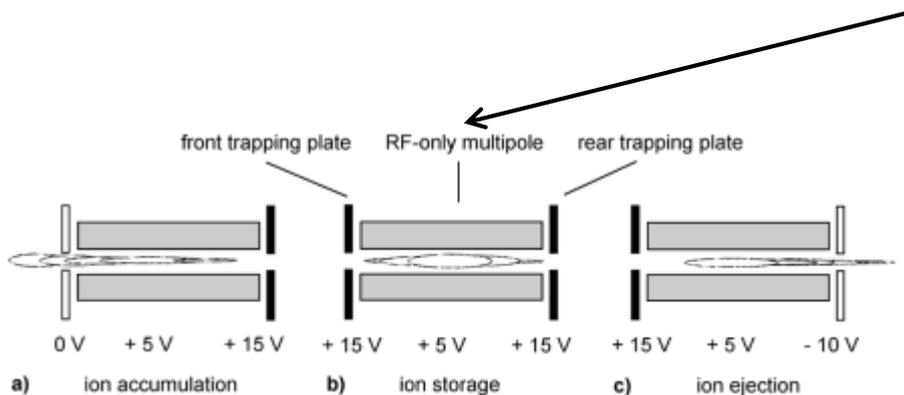
Il QIT è considerato tridimensionale perché il campo elettrico che viene generato all'interno deve essere considerato tridimensionale

I moderni QIT possono coprire un intervallo di m/z di circa 3000 con scansioni veloci alla risoluzione di $1u$ e, in più, consentono di effettuare "zoom scans" su un piccolo intervallo di m/z per ottenere misure ad alta risoluzione.

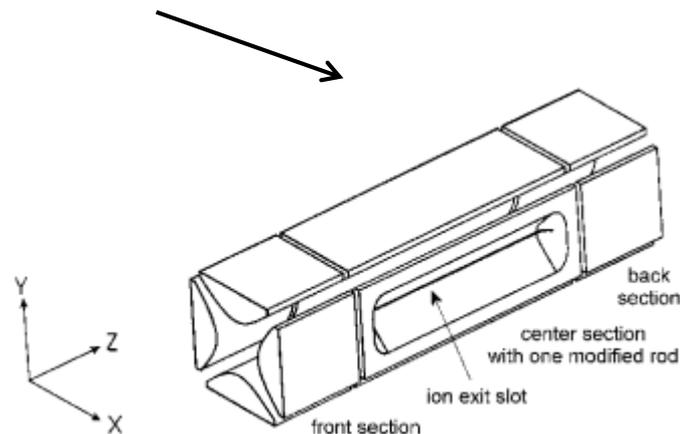
Trappole ioniche lineari (LIT)

La trappola ionica lineare è basata su un quadrupolo che termina ad entrambi i lati con delle lenti che riflettono le particelle avanti e indietro mantenendole al suo interno. Quindi in queste trappole le particelle rimangono confinate lungo la dimensione radiale da un campo quadrupolare e lungo la direzione assiale da un campo elettrico alle due estremità della trappola.

Applicando diversi campi elettrici alle estremità si può confinare la nube di ioni in una certo spazio ristretto all'interno della LIT, ad es. al centro o verso una delle estremità, a seconda del meccanismo di espulsione previsto in base alla progettazione della LIT: **espulsione assiale** o **radiale**.



gli ioni vengono espulsi generando un potenziale attrattivo ad una estremità della LIT



gli ioni vengono espulsi attraverso una fenditura applicando una AC all'elettrodo

segue →

Confronto tra trappole ioniche QIT e LIT

- La trappola LIT ha una capacità di intrappolamento di ioni 10 volte più alta di QIT, anche con 20'000 ioni intrappolati non si verificano fenomeni di "space charge effect" cioè espulsioni di ioni non controllate a causa delle forze di repulsione tra gli ioni stessi. QIT invece non può intrappolare più di 500 ioni circa. (vedasi video a http://www.chromacademy.com/lms/sco36/lcms_C6_037.asp)
- La trappola LIT ha maggiore efficienza di intrappolamento di QIT: iniettando ioni da una sorgente esterna LIT è capace di intrappolarne circa il 50%, invece QIT solo il 5%.

Teoria del tempo di volo di una massa in un TOF

La carica elettrica (q) di uno ione di massa (m_j) 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

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

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

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

cioè la velocità dello ione (v) è inversamente proporzionale alla radice quadrata della massa dello ione (m_j). 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:

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

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 →

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

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

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/z :

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

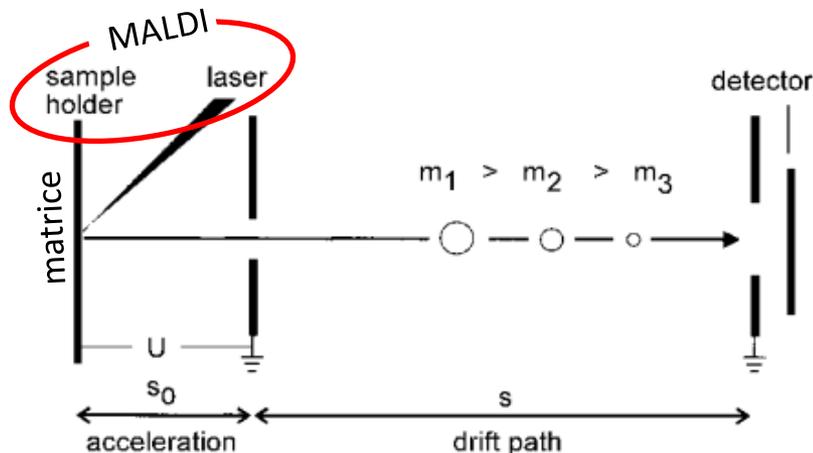
pertanto, l'intervallo di tempo Δt tra i tempi di arrivo di ioni a diverso m/z è proporzionale a $s \cdot (m/z_1^{1/2} - m/z_2^{1/2})$.

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 valore di m/z : alle medesime condizioni, un Δt che corrisponde ad un $\Delta m/z = 1$ 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.

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

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 formati durante l'impulso laser vengono continuamente estratti e accelerati dal momento in cui passano dalla matrice alla fase gas. La trasmittanza di un LTOF si avvicina la 90%.



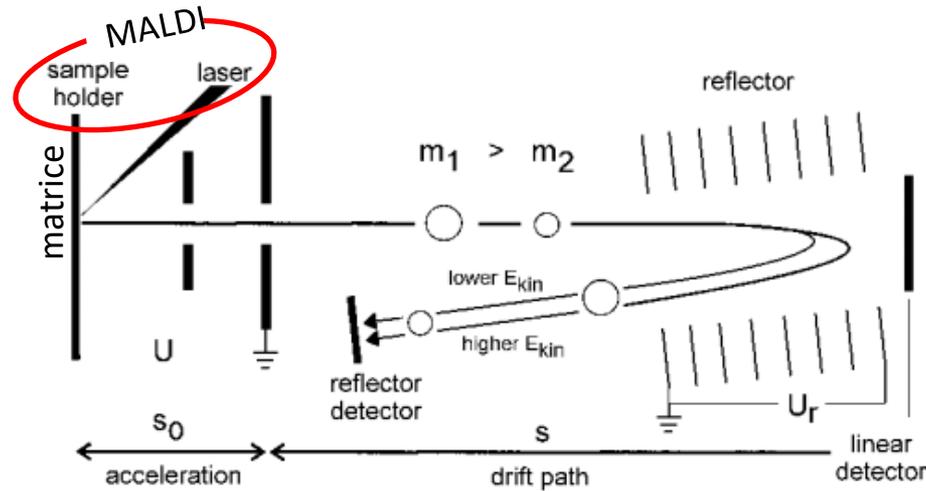
Limiti del LTOF:

- essendo che ad alte m/z una differenza $\Delta m/z = 1$ 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 $R \sim 500$

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.

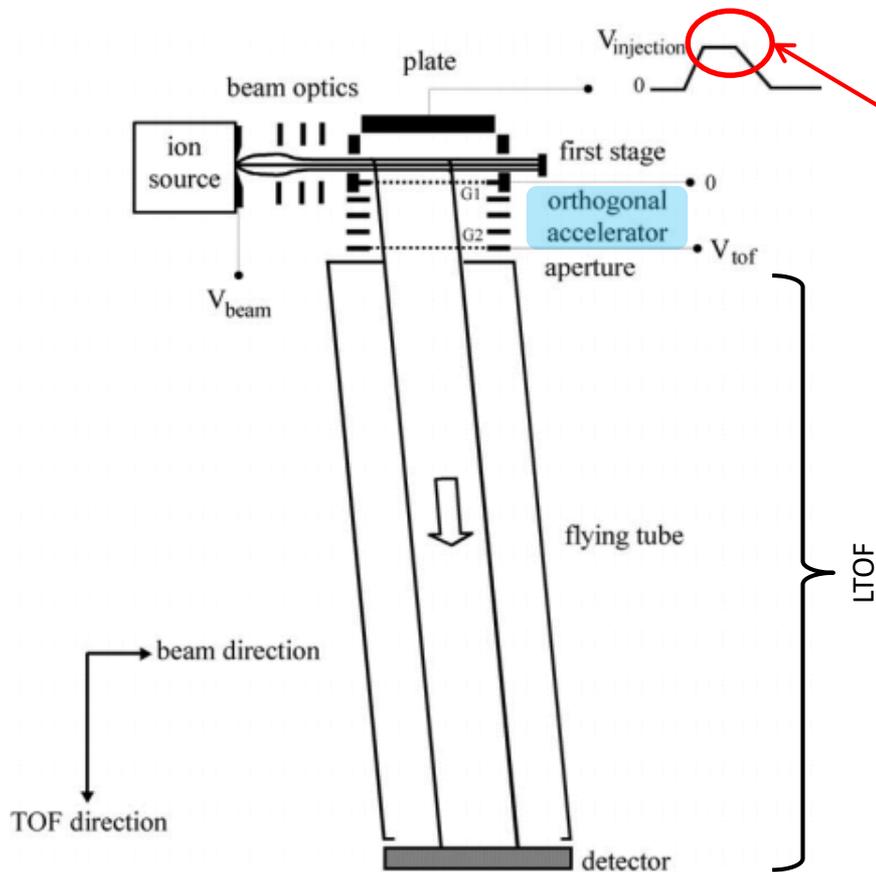
Il riflettore è capace di riallineare (nel tempo) ioni con stesso m/z ma diversa energia cinetica E_{kin} . Gli ioni con E_{kin} più alta penetreranno all'interno del riflettore più a fondo rispetto a ioni con E_{kin} minore, con il risultato che poi tutti gli ioni con stesso m/z usciranno nello stesso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

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

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). In linea di principio oaTOF può essere accoppiato con qualsiasi sistema di ionizzazione.

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.



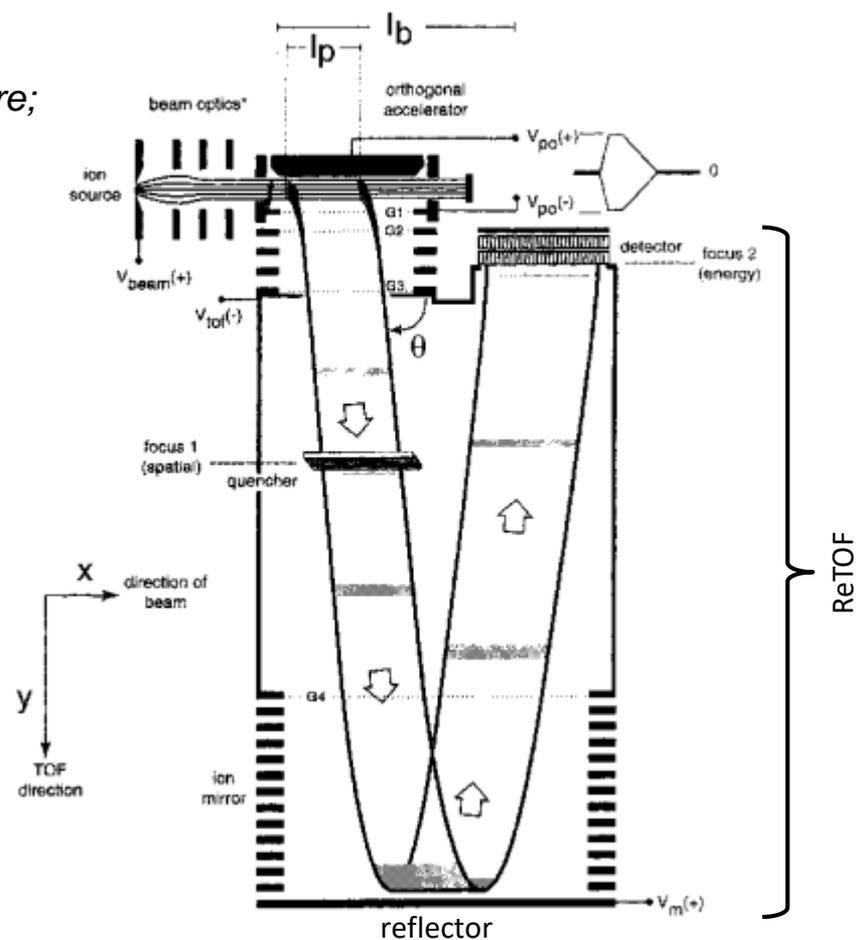
- i) Gli ioni focalizzati in uscita dallo ionizzatore flussano in modo continuo nello spazio tra il "plate" (inizialmente a voltaggio $V_{injection} = 0$) e la griglia G1.
- ii) Poi viene applicato un potenziale $V_{injection}$ che genera un campo elettrico tra il "plate" e G1 in direzione perpendicolare 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 →

I vantaggi dell'oa TOF sono:

- alta trasmissione (quindi alta sensibilità);
- alta velocità di scansione;
- alto potere risolvete;
- **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



MicroToF-Q Schematic

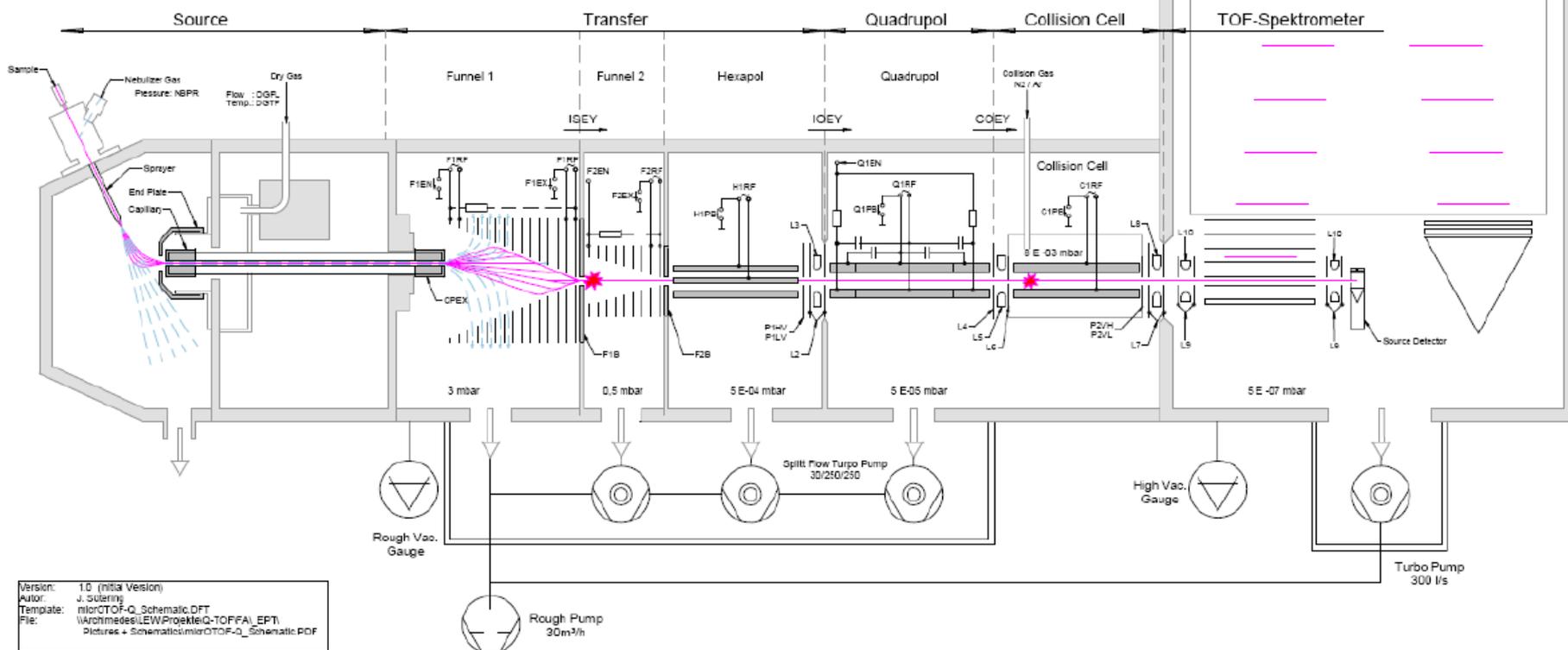
Set-Values									Set-Values										
Group	Description GUI	Unit	Min	Max	MPC555-Com.	I/M	P	Plug	Assembly	Group	Description GUI	Unit	Min	Max	MPC555-Com.	I/M	P	Plug	Assembly
Source									Quadrupole										
End Plate Offset	V	-6000	0	ESL_SFSU	I	P	J20 P4	Deso-Stufe	Ion Energy	eV/z	-200	+200	IFOC:IOEY	M	P				
Capillary	V	0	6000	ESL_CAPU	I	P	J20 P5	Deso-Stufe	Blas Rampe	V	-300	+300	IFOC:Q1EN	I	P	J589 Pin 1	Plat. Durchf.		
Nebulizer	bar	0	9	ESL_NBPR	I			Deso-Stufe	Blas Filter	V	-200	+200	IFOC:Q1PB	I	P		Quad-RF	Setstck. Quad Gen.	
Dry Gas	l/min	0	12	ESL_DGFL	I			Deso-Stufe	Quad RF	Vpp	0	+3000	IFOC:Q1RF	M			Quad-RF	Setstck. Quad Gen.	
Dry Temp	°C	0	353	ESL_DSTP	I			Deso-Stufe	Isolation Mass	m/z	0	+3000	IFOC:Q1M	M			Quad-RF	Setstck. Quad Gen.	
									Isolation Width	m/z	0	+100	IFOC:Q1W	M			Quad-RF	Setstck. Quad Gen.	
Transfer									Collision Cell										
ISCID-Energy	eV/z	-200	+200	IFOC:ISEY	M	P			Collision Energy	eV/z	-200	+200	IFOC:COEY	M	P				
Capillary Exit	V	-300	+500	IFOC:CPEX	I	P	J20 P1	HV Source Cabl	Lens4	V	-300	+300	IFOC:L4	I	P	J589 Pin 3	Plat. Durchf.		
Funnel 1 In	V	-500	+500	IFOC:F1EN	I	P	J585 Pin4	Funnel 1 Gen.	Lens5	V	-300	+300	IFOC:L5	I	P	J589 Pin 4	Plat. Durchf.		
Funnel 1 out	V	-500	+500	IFOC:F1EX	I	P	J585 Pin5	Funnel 1 Gen.	Collision Cell Bias	V	-100	+100	IFOC:C1PB	I	P	J588 Pin 2	CC-Gen		
Funnel 1 RF	Vpp	0	+400	IFOC:F1RF	M		J590 Pin1-4	Sebstk. F1	Collision Cell RF	Vpp	0	+3800	IFOC:C1RF	M			CC-RF	Setstck. CC-Gen.	
Funnel 1 Base	V	-300	+300	IFOC:F1B	I	P	J580 Pin1	Sebstk. Hex.	Collision Storage	V	-300	+300	IFOC:P2VH	I	P	J681 (BNC)	Plat. Durchf.		
Funnel 2 In	V	-300	+300	IFOC:F2EN	I	P	J580 Pin4	Sebstk. Hex.	Collision Extraction	V	-300	+300	IFOC:P2VL	I	P	J681 (BNC)	Plat. Durchf.		
Funnel 2 out	V	-300	+300	IFOC:F2EX	I	P	J587 Pin4	Funnel 2 Gen.	Transfer Time	µs	0	3000	IFOC:P2TH	M		J681 (BNC)	Plat. Durchf.		
Funnel 2 RF	Vpp	0	+600	IFOC:F2RF	M		J582 Pin 3/4	Sebstk. Hex.	PrePulse StorageTime	µs	0	3000	IFOC:P2TL	M		J681 (BNC)	Plat. Durchf.		
Funnel 2 Base	V	-300	+300	IFOC:F2B	I	P	J580 Pin 5	Sebstk. Hex.	Lens7	V	-100	+100	IFOC:L7	I	P	J589 Pin 9	Plat. Durchf.		
Hexapole Bias	V	-300	+300	IFOC:H1PB	I	P	J586 Pin 1	Hex. Gen.	Lens8	V	-100	+100	IFOC:L8	I	P	J589 Pin 8	Plat. Durchf.		
Hexapole RF	Vpp	0	+800	IFOC:H1RF	M		J582 Pin 1/2	Sebstk. Hex.	Lens9	V	-100	+100	IFOC:L9	I	P	J581 Pin 1-4	Pave /TPP		
Hexapole Storage	V	-300	+300	IFOC:H1VH	I	P	J680 (BNC)	Sebstk. Hex.	Lens10	V	-100	+100	IFOC:L10	I	P	J501 Pin 67	Pave /TPP		
Hexapole Extraction	V	-300	+300	IFOC:H1VH	I	P	J680 (BNC)	Sebstk. Hex.	Collision Gas checkbox	on/off	0	+1	CGAS:FLWE	I			Coll. Gas	Stoßzellen-Gasv.	
Lens 2	V	-300	+300	IFOC:L2	I	P	J580 Pin 5	Sebstk. Hex.	Flow Rate	%	5	+100	CGAS:FLOW	I			Coll. Gas	Stoßzellen-Gasv.	
Lens 3	V	-300	+300	IFOC:L3	I	P	J580 Pin 2	Sebstk. Hex.											

I = Instrument- M = Method-Parameter

P = Polarity Switch for pos./neg. ions

TOF

same as MicroToF



Version: 1.0 (initial Version)
 Autor: J. Suberth
 Template: microTOF-Q_Schematic.DFT
 (\\archimedee\LEW\Projekte\TOFQA_EPT)
 Pictures + Schematics\microTOF-Q_Schematic.PDF

Vantaggi TOF

I principali vantaggi di strumenti TOF sono:

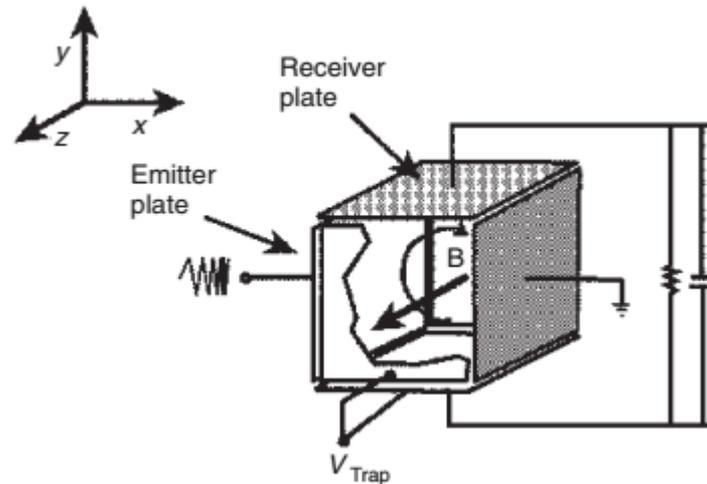
- i. in linea di principio, l'intervallo m/z è illimitato;
- ii. Da ogni evento ionizzanti, ad esempio, un solo colpo laser MALDI, si ottiene uno spettro di massa completa in qualche decina di microsecondi;
- iii. La trasmissione di un analizzatore TOF è molto alta, dando origine ad alta sensibilità;
- 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 risolvete 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 risolvete 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 risolvete può arrivare fino a $R = 45'000$.

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 Forza
centripeta centrifuga

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

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

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

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.

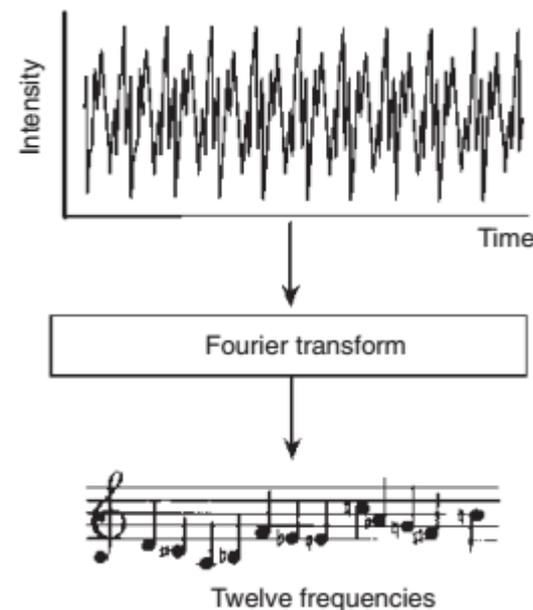
La relazione tra la frequenza e la massa mostra che in questo caso la determinazione della massa si effettua misurando una frequenza.

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 da una rapida scansione di un largo intervallo di frequenze (con una corrente alternata AC in radiofrequenza – RF – a voltaggio V_0) nel tempo di circa $1\mu s$. Gli ioni, eccitati da questa scansione, dispongono la loro traiettoria tutti lungo lo stesso raggio, che dipende da:

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

→ tempo di eccitazione
→ campo magnetico

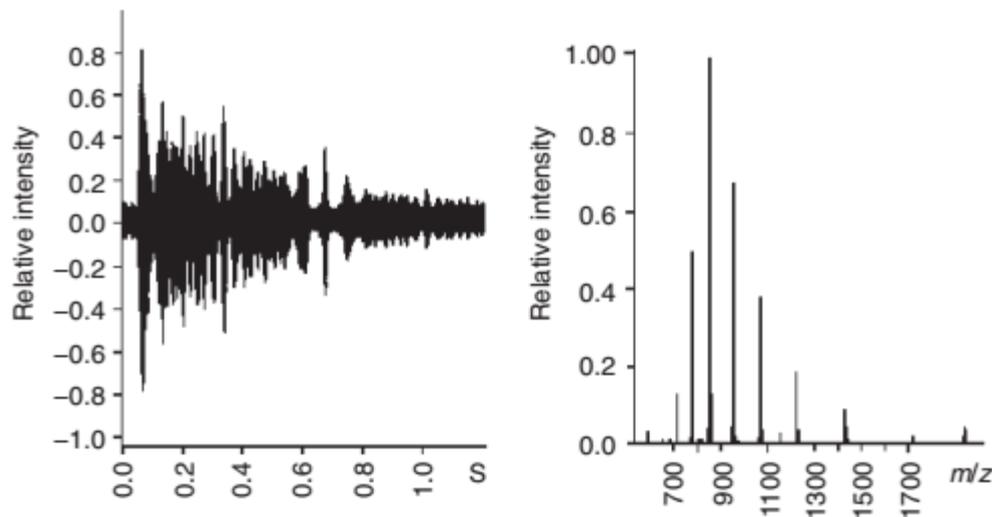
Il raggio è indipendente da m/z , invece la frequenza a cui "risuonano" gli ioni nel ciclotrone dipende da m/z .

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

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

segue →

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 risolvete $R = 10^5$ - 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:

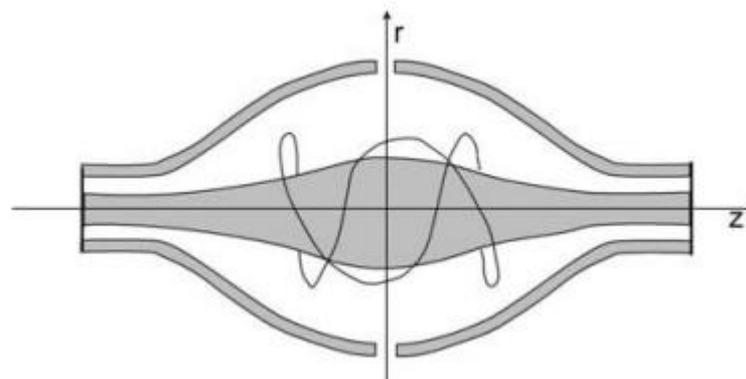
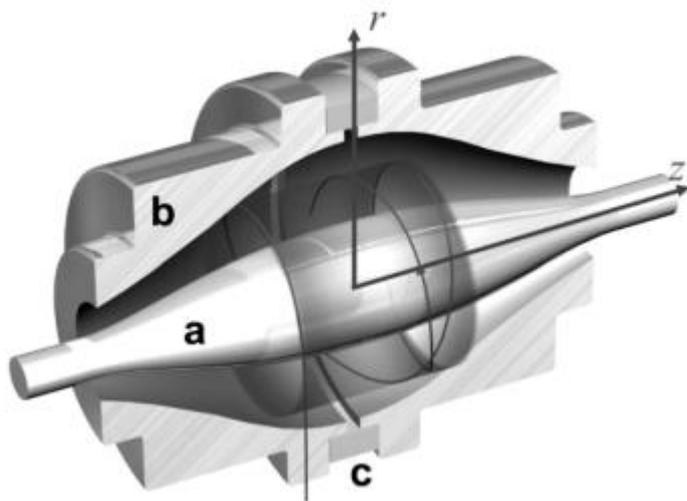
- *necessità di magneti superconduttori per ottenere l'intensità di campo magnetico necessaria (quindi necessità di utilizzo di gas criogenici);*
- *necessità di un alto vuoto perfettamente controllato (per evitare collisioni "indesiderate" degli ioni con molecole presenti che possono defasare la frequenza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

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.

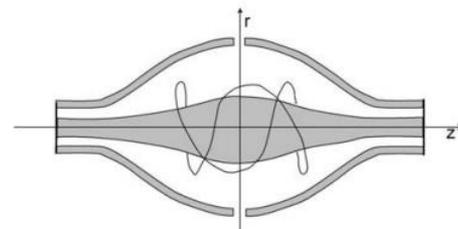


segue →

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

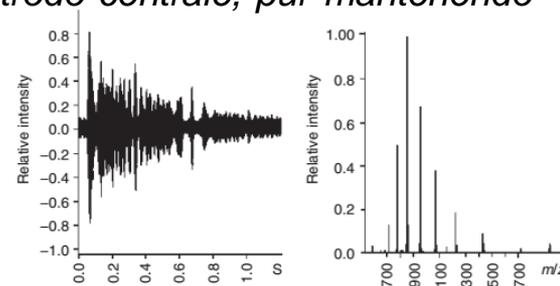
Si può dimostrare che la frequenza di oscillazione assiale è data da:

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



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 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).

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)

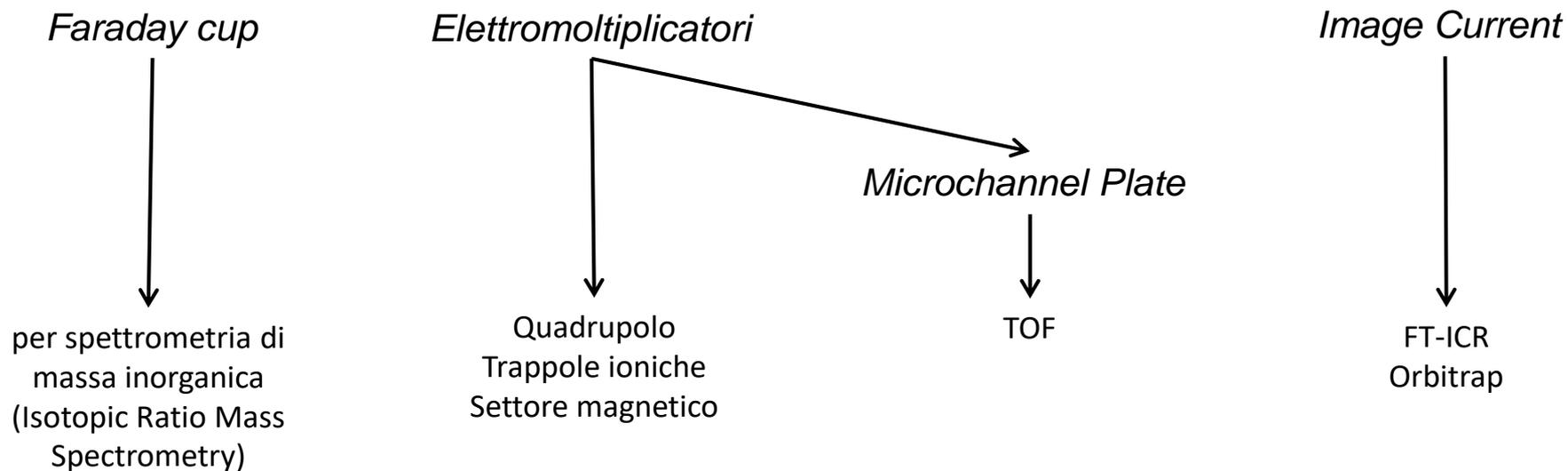
Table 4.1. Common mass analyzers

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

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.

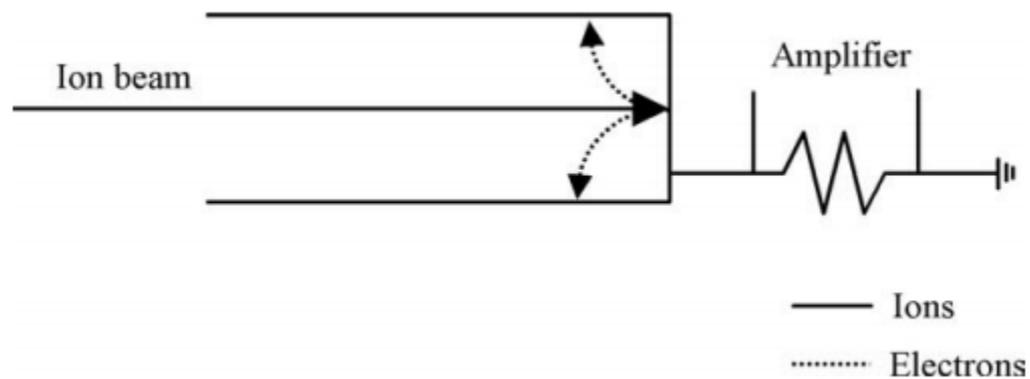
Esistono diversi tipi di detector, tutti sono basati sulla rivelazione della massa e/o della carica e/o della velocità degli ioni. Il detector, in genere, viene scelto in base alle caratteristiche dell'analizzatore presente nello strumento o comunque in base all'assetto strumentale complessivo. Sotto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



Faraday cup

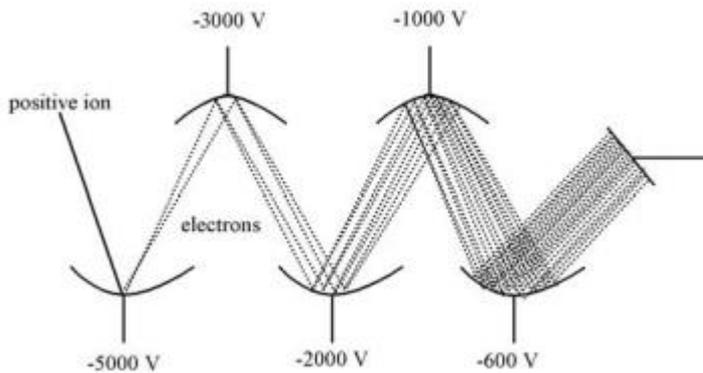
La coppa di Faraday è il primo e più semplice detector applicato agli spettrometri di massa. E' formata da una coppa o un cilindro di metallo con un piccolo orifizio per l'ingresso degli ioni. Gli ioni che entrano nella coppa vengono neutralizzati quando collidono con le pareti donando o acquisendo un 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. $^{12}\text{C}/^{14}\text{C}$)

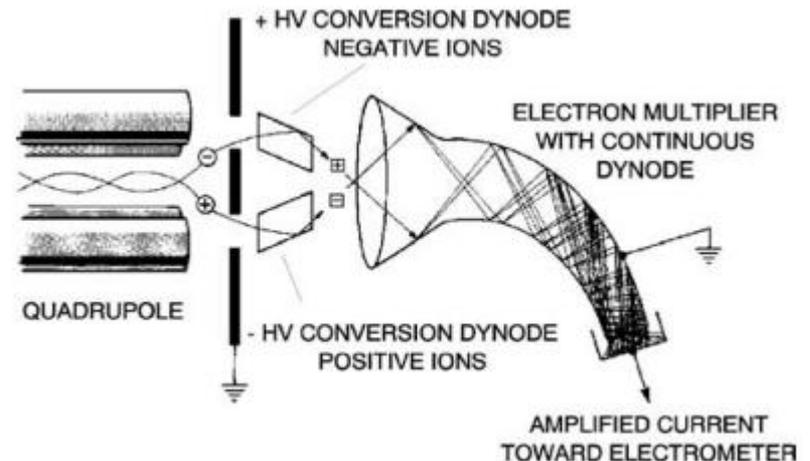


Elettromoltiplicatori (EM)

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



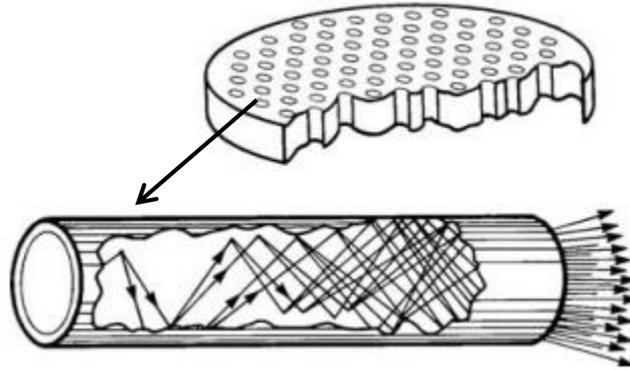
EM a dinodo continuo ricurvo

segue →

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 .

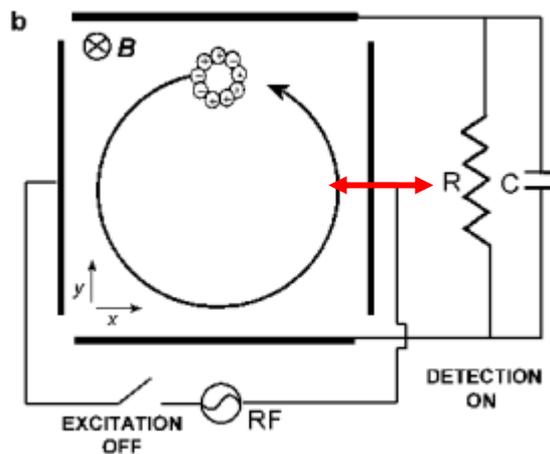


Questo detector è caratterizzato da una risposta molto veloce poiché il percorso degli elettroni nei canali è molto breve (la lunghezza di ogni microcanale è di pochi millimetri). Quindi è ottimale per essere accoppiato con analizzatori TOF in cui gli ioni arrivano al detector con intervalli temporali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

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