

CHIMICA ANALITICA II

CON LABORATORIO

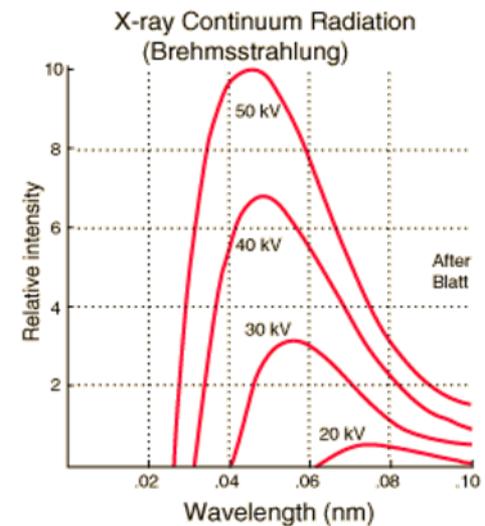
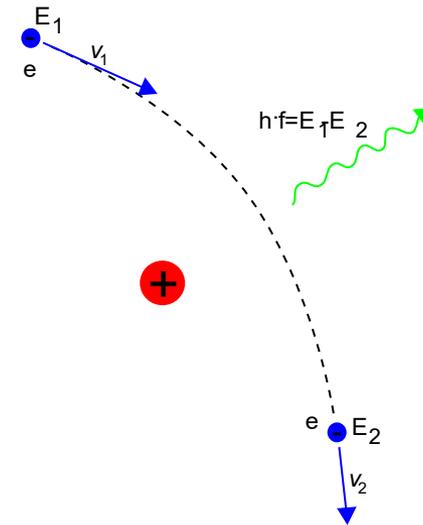
(AA 2021-22)

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

Bremsstrahlung (o radiazione di frenamento)

è una [radiazione elettromagnetica](#) che viene prodotta a causa dell'accelerazione o decelerazione di una particella [carica](#),^[1] tipicamente un [elettrone](#), deviata da un'altra particella carica, tipicamente il [nucleo atomico](#); infatti, supponendo che vi siano particelle cariche in una porzione di materia e che un elettrone ad alta velocità ci passi vicino, la traiettoria di quest'ultimo verrà deviata a causa del campo elettrico attorno al nucleo atomico.^[2]

La particella in moto, quando è deviata, perde energia cinetica e, per soddisfare il principio di conservazione dell'energia, emette una radiazione sotto forma di [fotone](#); la bremsstrahlung è caratterizzata da una distribuzione continua di radiazione che diviene più intensa (e si sposta verso le frequenze maggiori) con l'aumentare dell'energia degli elettroni bombardanti (particelle frenate)

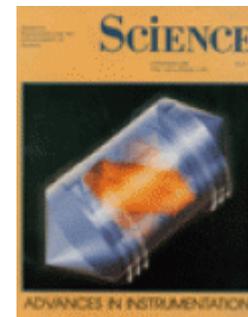


LA SPETTROMETRIA DI MASSA

INTRODUZIONE

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

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

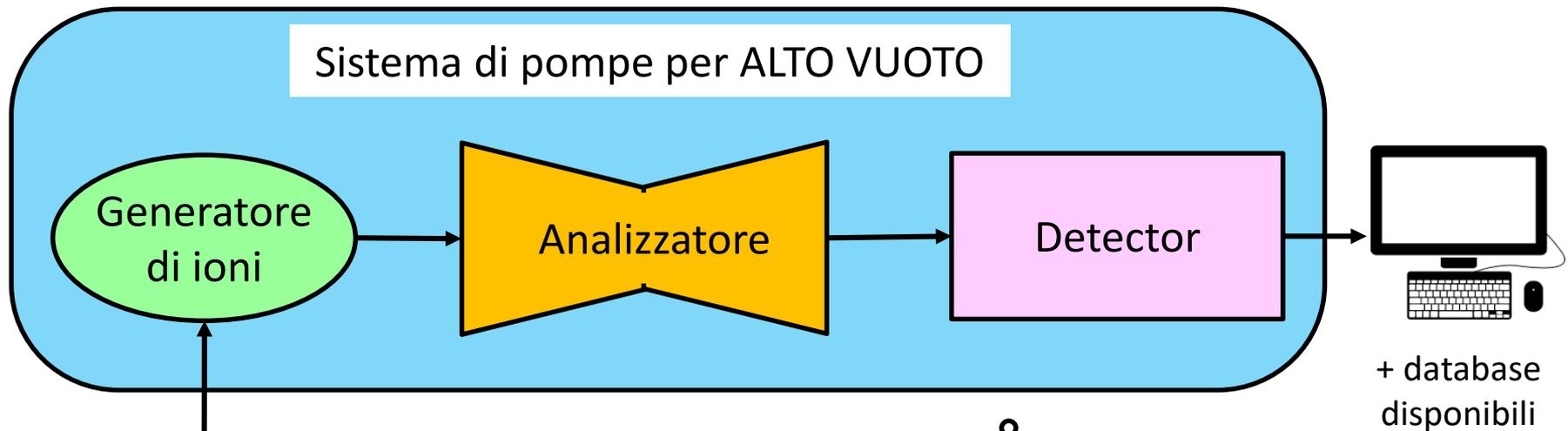


Uno spettrometro di massa è uno strumento che viene utilizzato per:

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

La spettrometria di massa NON è una spettroscopia (da σκοπέω osservo, visivamente), perché NON coinvolge assorbimento o emissione di fotoni

Rappresentazione schematica di uno spettrometro di massa



Sistema di introduzione del campione: introduzione diretta o interfaccia con sistema di separazione cromatografica

L'Analizzatore separa gli ioni in base al loro rapporto massa su carica (m/z)

Perché è necessario il vuoto?

segue →

Il cammino libero degli ioni

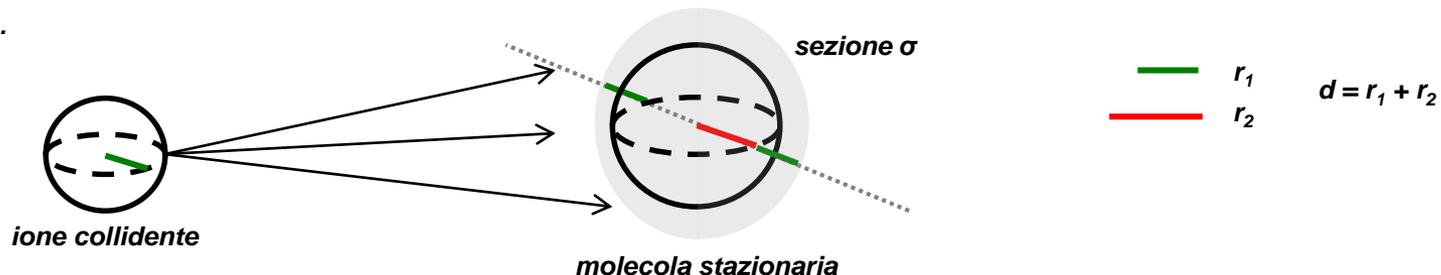
La condizione di **alto vuoto** è necessaria per consentire agli ioni di raggiungere il detector senza incorrere in collisioni con altre molecole gassose, poiché:

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

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

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

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



segue →

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

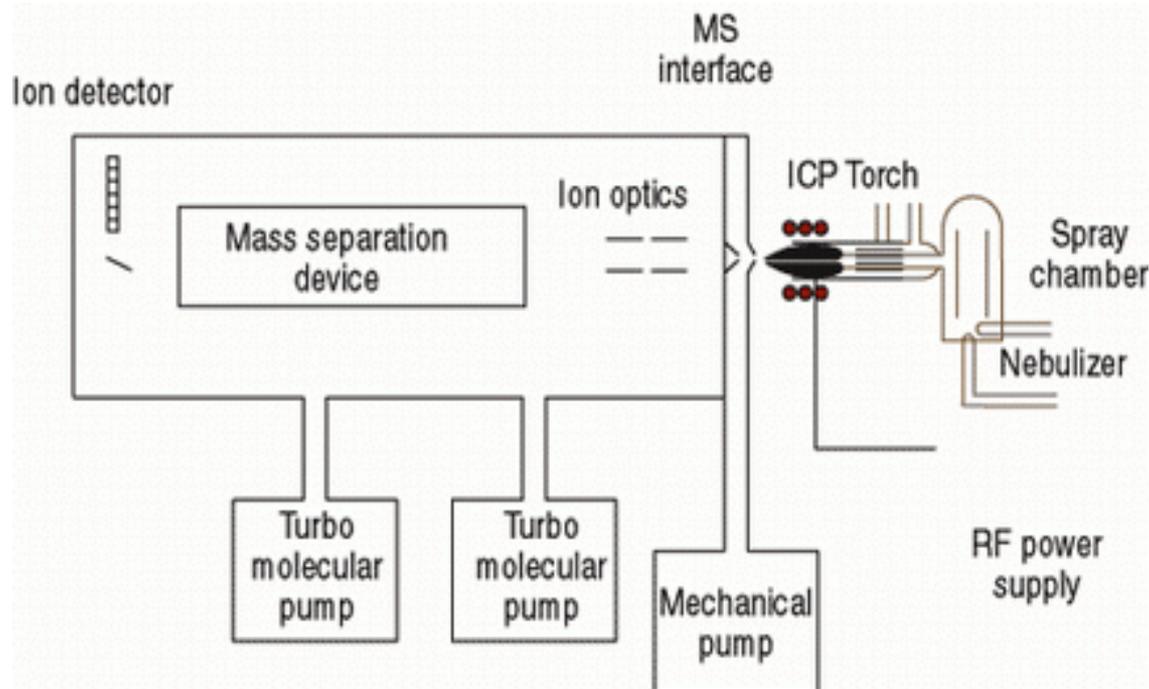


La spettrometria di massa inorganica

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

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

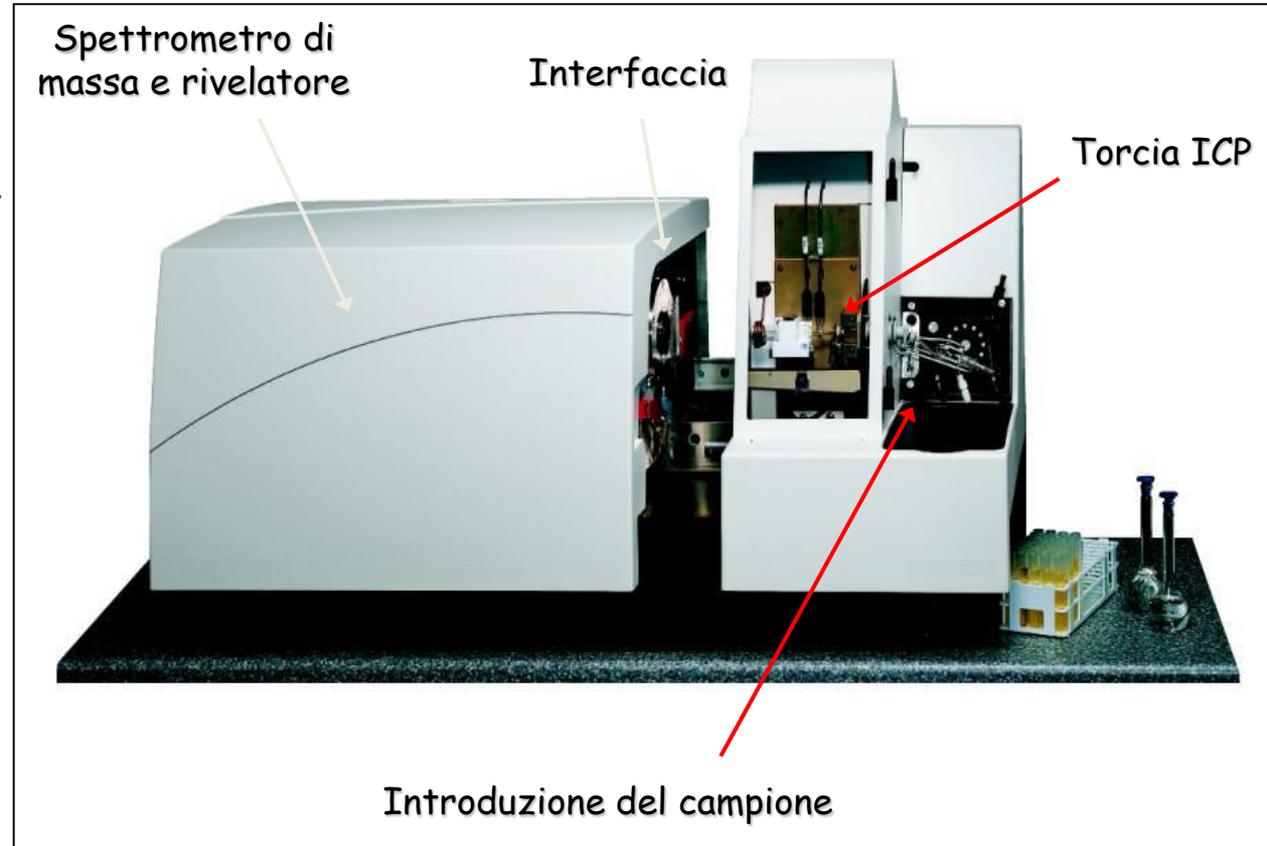
In questo tipo di tecnica il più diffuso dispositivo di GENERAZIONE DI IONI è il Plasma Induttivamente Accoppiato (ICP). In successione è presente un Analizzatore (separatore di ioni in base a m/z) e un Detector. I diversi tipi di Analizzatori e Detector sono comuni con la spettrometria di massa organica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



segue →

Caratteristiche tecniche

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



segue →

Confronto tra tecniche

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

Differenza di sensibilità per le diverse tecniche:

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

segue →

Limiti di rilevabilità

Table 3. Detection limit comparison ($\mu\text{g/L}$)

Element	ICP-MS	ICP-AES	Flame AAS	GFAAS
As	<0.050	<20	<500	<1
Al	<0.010	<3	<50	<0.5
Ba	<0.005	<0.2	<50	<1.5
Be	<0.050	<0.5	<5	<0.05
Bi	<0.005	<20	<100	<1
Cd	<0.010	<3	<5	<0.03
Ce	<0.005	<15	<200000	ND
Co	<0.005	<10	<10	<0.5
Cr	<0.005	<10	<10	<0.15
Cu	<0.010	<5	<5	<0.5
Gd	<0.005	<5	<4000	ND
Ho	<0.005	<1	<80	ND
In	<0.010	<30	<80	<0.5
La	<0.005	<0.05	<4000	ND
Li	<0.020	<1	<5	<0.5
Mn	<0.005	<0.5	<5	<0.06
Ni	<0.005	<10	<20	<0.5
Pb	<0.005	<20	<20	<0.5
Se	<0.10	<50	<1000	<1.0
Tl	<0.010	<30	<40	<1.5
U	<0.010	<30	<100000	ND
Y	<0.005	<0.5	<500	ND
Zn	<0.02	<1.0	<2	<0.01

ICP-MS, ICP-AES, Flame AAS: Detection limits (defined on the basis of 3 standard deviations of the blank)

GFAAS: Sensitivity (0.0044 absorbance) measured with 20 μL of sample

ND: Not determined

La spettrometria di massa organica

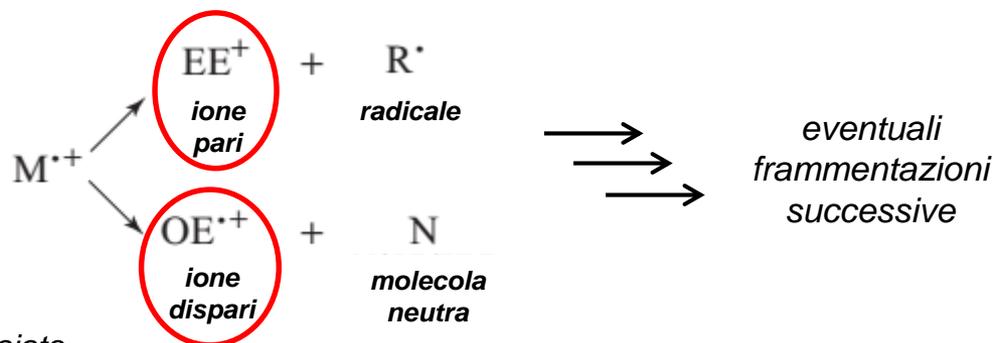
La spettrometria di massa organica consente di identificare e quantificare specie molecolari. Come già anticipato, le molecole vengono ionizzate, quindi con questa tecnica vengono identificati e quantificati i diversi ioni formati in base al loro rapporto m/z .

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



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

Solo gli ioni vengono rilevati dal detector!!!



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

segue →

SULLA IONIZZAZIONE...

Sulle sorgenti di elettroni (per effetto termoionico) nei sistemi di ionizzazione ad impatto elettronico: K. Busch “Electron Ionization Sources: The Basics” Spectroscopy, July 2006 21(7) 14-18

https://alfresco-static-files.s3.amazonaws.com/alfresco_images/pharma/2014/08/22/32e51bed-d0db-4d35-a3ef-1a1ab0ff1770/article-358696.pdf

*“The sensitivity of a mass spectrometer (the source combined with the remainder of the instrument, but sometimes also the source itself) is defined strictly in units of C/g, where C represents the charge in coulombs carried by ions that can be created from 1 g of sample introduced to the source. The sensitivity of any MS measurement is predicated first upon instrument sensitivity (including factors such as **source performance, mass analyzer transmission, and ion detection efficiency**), but also expands to include sample preparation, signal-to-noise discrimination, and matrix effects in real samples. The **central position of source performance** in this scheme should be clear”*

Sulla formazione di cationi a seguito dell’impatto elettronico:

JH Gross «Mass Spectrometry: a textbook» 2 nd edition

https://is.muni.cz/el/1431/podzim2015/F7100/um/um/52107671/gross_mass-spectrometry_second-edition.pdf

2.1.1 Formation of Ions

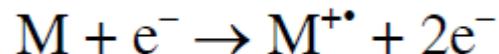
2.1.2 Processes Accompanying Electron Ionization

2.1.3 Ions Generated by Penning Ionization

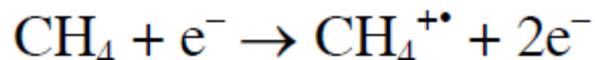
"Teoria del quasi equilibrio QET

- la chimica in uno spettrometro di massa è chimica degli ioni isolati in fase gassosa
- Gli ioni isolati non sono in equilibrio termico con l'ambiente circostante. Invece, per uno ione essere isolato nella fase gassosa significa che può solo ridistribuire energia internamente e che può solo subire reazioni unimolecolari come isomerizzazione o dissociazione. Questo è il motivo per cui la *teoria delle reazioni unimolecolari* gioca un ruolo importante nella spettrometria di massa.
- La costante di velocità, k , di una reazione unimolecolare è fondamentalemente una funzione dell'energia in eccesso, E_{ex} , dei reagenti nello stato di transizione e quindi la $k(E)$ è fortemente influenzata dalla distribuzione di energia interna degli ioni oggetto di studio "

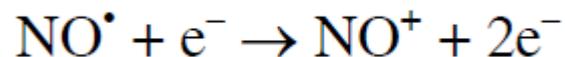
"Se l'elettrone, in termini di trasferimento di energia, collide molto efficacemente con la specie neutra, la quantità di energia trasferita può influenzare la ionizzazione mediante l'espulsione di un elettrone dalla specie neutra, rendendola così un *ione radicale* positivo:



- El crea prevalentemente ioni caricati singolarmente a partire dal precursore neutro. La specie neutra, nella maggior parte dei casi era una molecola caratterizzata da un numero pari di elettroni, cioè una molecola con *elettroni pari (a guscio chiuso)*. Lo ione molecolare formato deve quindi essere un ione radicale o uno ione *con elettroni dispari (a guscio aperto)*. Ad esempio per il metano otteniamo:



Nel raro caso in cui la specie neutra fosse un radicale, lo ione creato dalla ionizzazione elettronica avrebbe numero di elettroni pari, come ad es. l'ossido nitrico:



A seconda dell'analita e dell'energia degli elettroni primari si possono osservare anche ioni con carica duplice e persino tripli. In generale, questi sono poco abbondanti. ”

“Ioni generati da ionizzazione di Penning

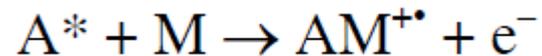
Le interazioni non ionizzanti specie neutra-elettrone creano *specie neutre elettronicamente eccitate*.

Le reazioni di ionizzazione che si verificano quando **specie neutre eccitate elettronicamente**, per esempio atomi di gas nobili A *, **collidono con specie nello stato fondamentale**, ad esempio una molecola M, possono essere divise in due classi.

1) *Ionizzazione di Penning*,



2) *ionizzazione associative* – aka processo Hornbeck-Molnar.»



"La ionizzazione della specie neutra può avvenire solo quando l'energia trasferita dalla collisione tra elettrone e specie neutra è uguale o maggiore dell'energia di ionizzazione (IE) della specie neutra corrispondente.

Definizione: *L'energia di ionizzazione* (IE) è definita come la quantità minima di energia che deve essere assorbita da un atomo o da una molecola nei suoi stati fondamentali elettronici e vibrazionali per formare - tramite espulsione di un elettrone - uno ione che è anche nei suoi stati fondamentali.

Energia di ionizzazione e Localizzazione di carica

La rimozione di un elettrone da una molecola può formalmente essere considerata come avvenuta da un legame σ , da un legame π o una coppia di elettroni solitari, con il legame σ che è la posizione meno favorevole e la coppia di elettroni soliti è la posizione più favorevole per la localizzazione della carica all'interno della molecola. I gas nobili esistono come atomi con gusci di elettroni chiusi.

Nota: le energie di ionizzazione della maggior parte delle molecole sono nell'**intervallo 7-15 eV.**» Vedi tabella nella diapositiva successiva.

Table 2.1. Ionization energies of selected compounds^a

Compound	IE ^b [eV]	Compound	IE ^b [eV]
hydrogen, H ₂	15.4	helium, He	24.6
methane, CH ₄	12.6	neon, Ne	21.6
ethane, C ₂ H ₆	11.5	argon, Ar	15.8
propane, n-C ₃ H ₈	10.9	krypton, Kr	14.0
butane, n-C ₄ H ₁₀	10.5	xenon, Xe	12.1
pentane, n-C ₅ H ₁₂	10.3		
hexane, n-C ₆ H ₁₄	10.1	nitrogen, N ₂	15.6
decane, n-C ₁₀ H ₂₂	9.7	oxygen, O ₂	12.1
		carbonmonoxide, CO	14.0
ethene, C ₂ H ₄	10.5	carbondioxide, CO ₂	13.8
propene, C ₃ H ₆	9.7		
(E)-2-butene, C ₄ H ₈	9.1	fluorine, F ₂	15.7
		chlorine, Cl ₂	11.5
benzene, C ₆ H ₆	9.2	bromine, Br ₂	10.5
toluene, C ₆ H ₈	8.8	iodine, I ₂	9.3
indene, C ₉ H ₈	8.6		
naphthalene, C ₁₀ H ₈	8.1	ethanol, C ₂ H ₆ O	10.5
biphenyl, C ₁₂ H ₁₀	8.2	dimethylether, C ₂ H ₆ O	10.0
anthracene, C ₁₄ H ₁₀	7.4	ethanethiol, C ₂ H ₆ S	9.3
aniline, C ₆ H ₇ N	7.7	dimethyldisulfide, C ₂ H ₆ S ₂	8.7
triphenylamine, C ₁₈ H ₁₅ N	6.8	dimethylamine, C ₂ H ₇ N	8.2

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

Es. spettro di massa (con ionizzazione a impatto elettronico) del CH_2Cl_2 , massa nominale = 84 u

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

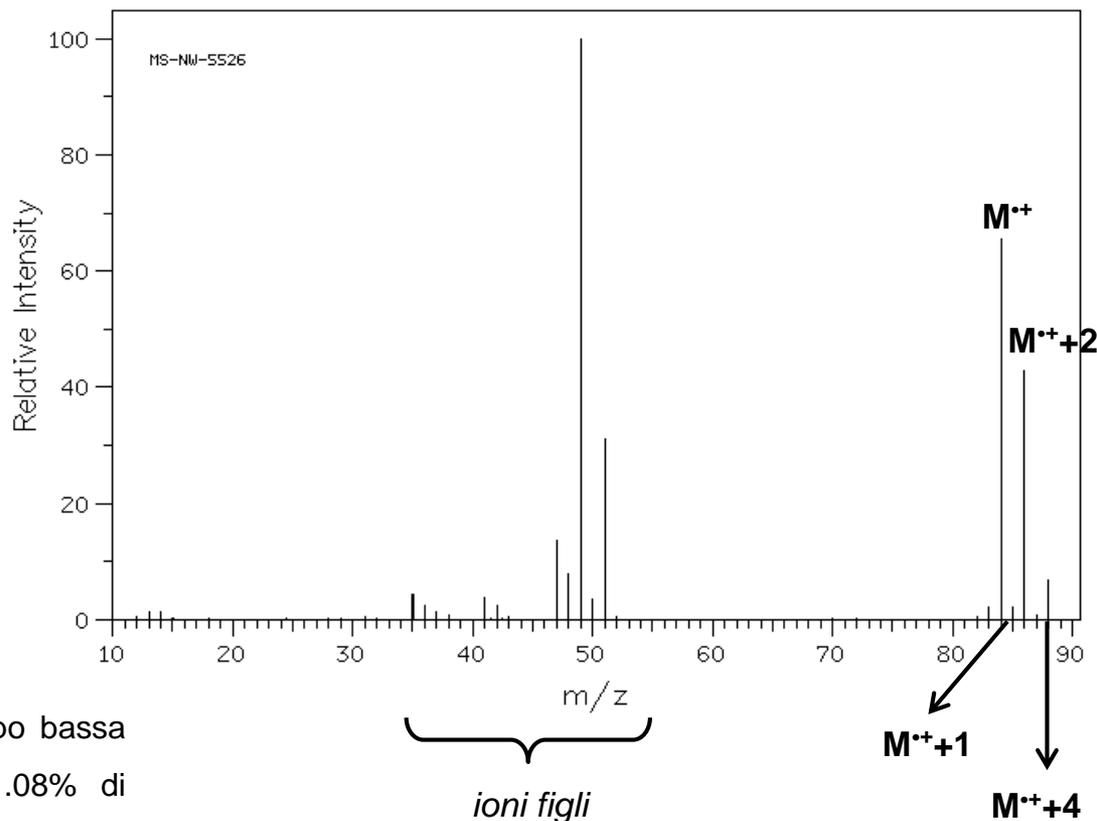
M^{++} contiene 2 atomi di ^{35}Cl e 1 di ^{12}C

$M^{++}+1$ contiene 2 atomi di ^{35}Cl e 1 di ^{13}C

$M^{++}+2$ contiene 1 atomo di ^{35}Cl , 1 di ^{37}Cl e 1 di ^{12}C

$M^{++}+4$ contiene 2 atomi di ^{37}Cl e 1 di ^{12}C

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

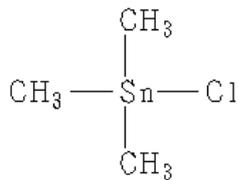


segue →

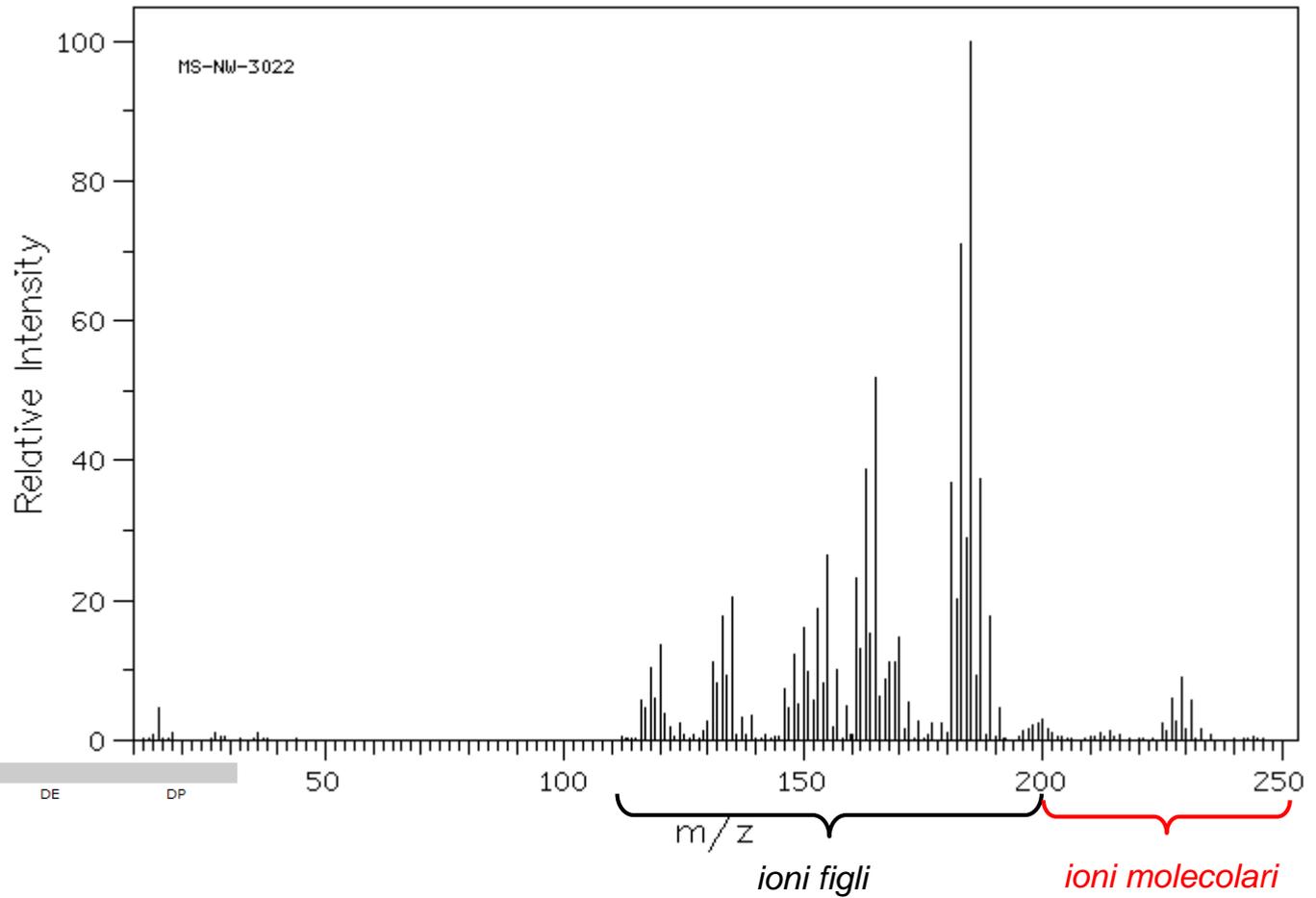
Es. spettro di massa (con ionizzazione a impatto elettronico) del trimetilstagno cloruro ($(\text{CH}_3)_3\text{SnCl}$,

massa nominale = 200 u

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



Lo stagno ha 10 isotopi
stabili conosciuti in natura!



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

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

segue →

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

E per miscele di composti????



Software
per l'interpretazione



Database di
spettri di massa

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

Generatori di ioni (o sistemi di ionizzazione)

La formazione di ioni di campione in fase gassosa è un pre-requisito essenziale per i processi di separazione e di rivelazione tipici in uno spettrometro di massa.

Originariamente gli spettrometri di massa richiedevano il campione in fase gassosa, ma grazie agli sviluppi più recenti, l'applicabilità della spettrometria di massa è stata estesa fino a includere **anche campioni in fase liquida o inglobati in una matrice solida**.

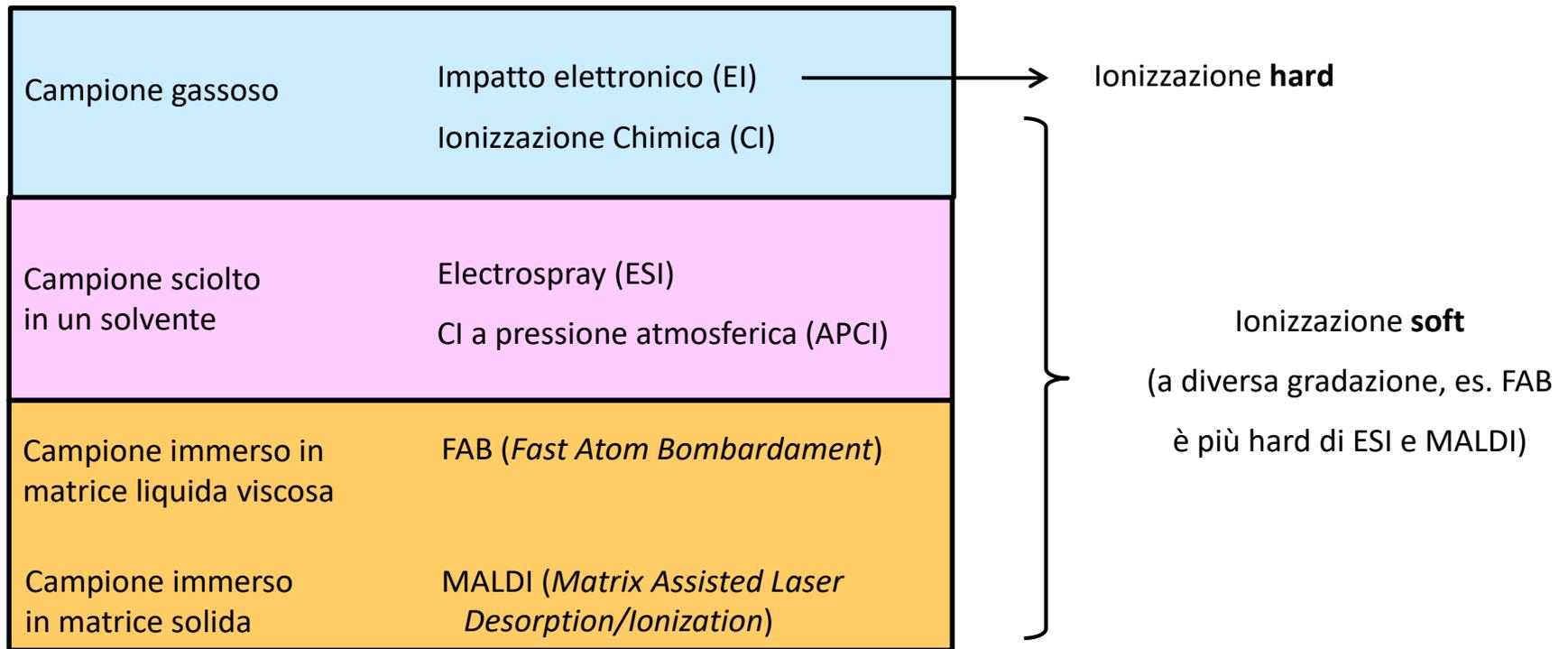
Il campione, che può essere solido, liquido o gassoso, viene introdotto in una camera da vuoto mediante un opportuno sistema di introduzione.

In dipendenza del tipo di sistema di introduzione e della tecnica di ionizzazione utilizzata, il **campione può già esistere in forma ionica in soluzione, oppure esso può essere ionizzato di concerto con la sua volatilizzazione** o mediante altri metodi nella sorgente ionica.

segue →

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

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



segue →

Ionizzazione elettronica (EI)

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

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

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

La sorgente consiste in un filamento riscaldato che emette elettroni.

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

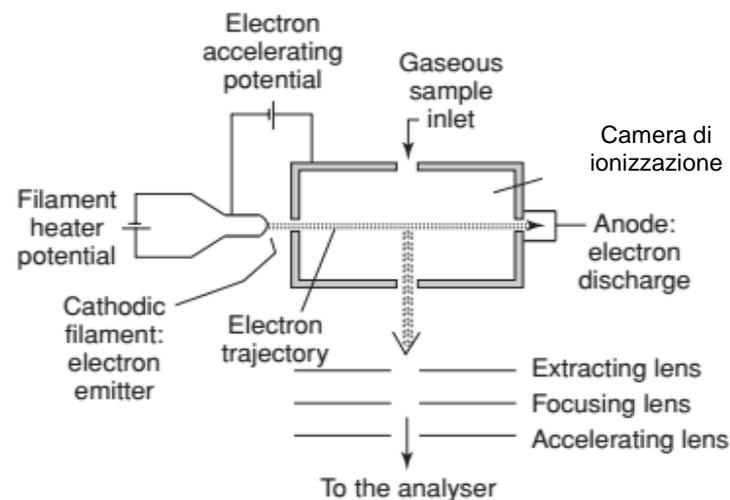
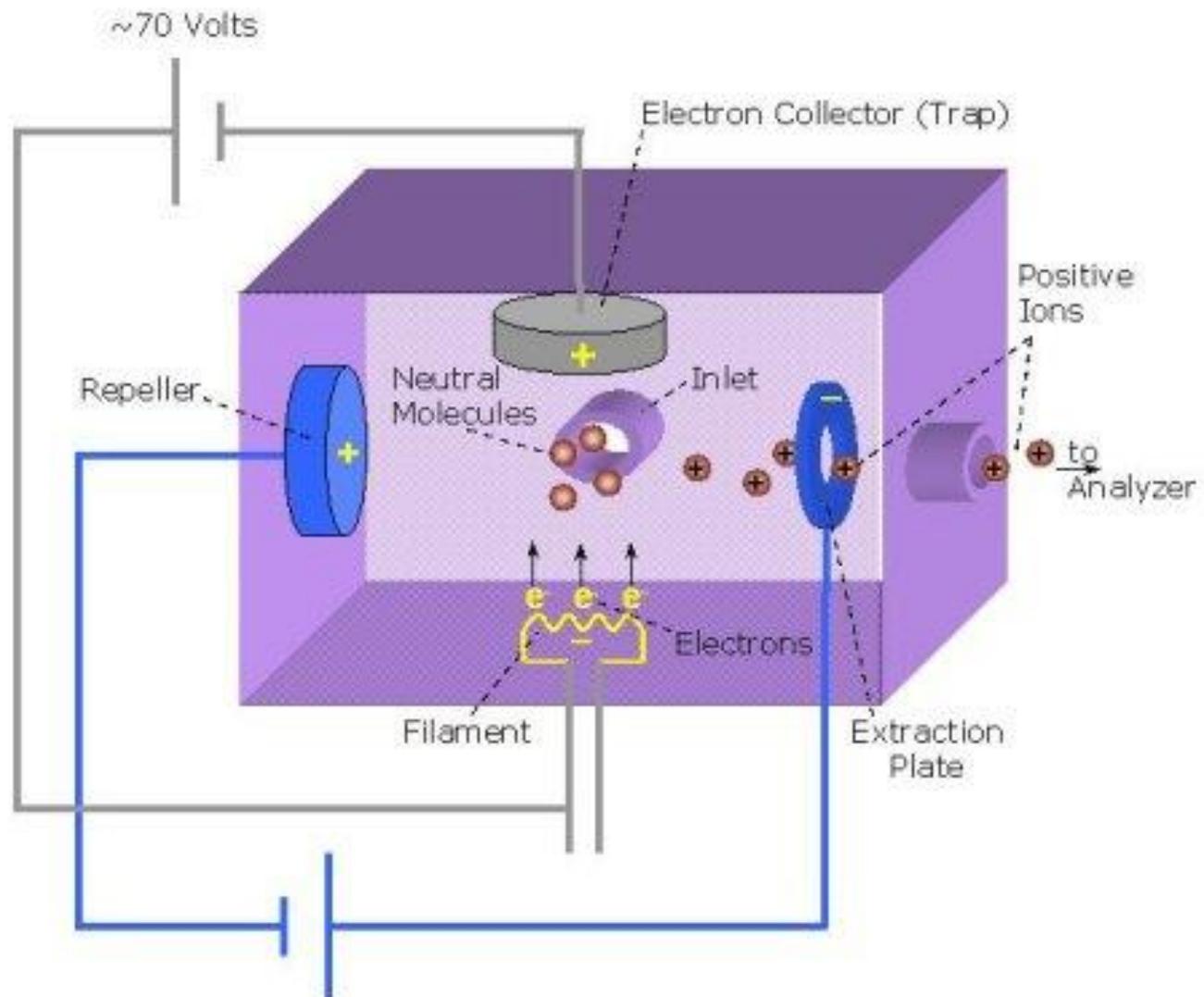


Figure 1.1
Diagram of an electron ionization source.

Electron Impact Ionization Source



Ionizzazione chimica (CI)

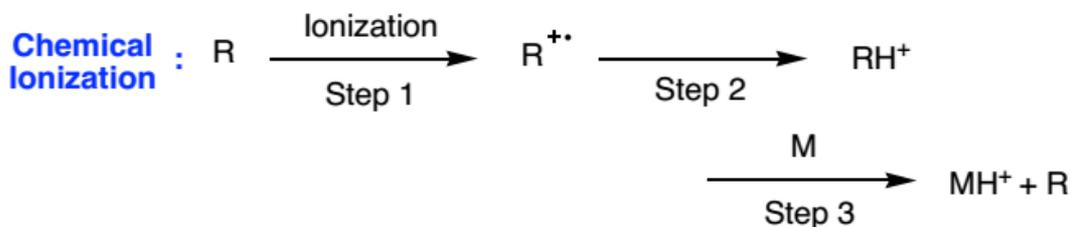
Gli analiti sono ionizzati da reazioni ione-molecola in fase gassosa.

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

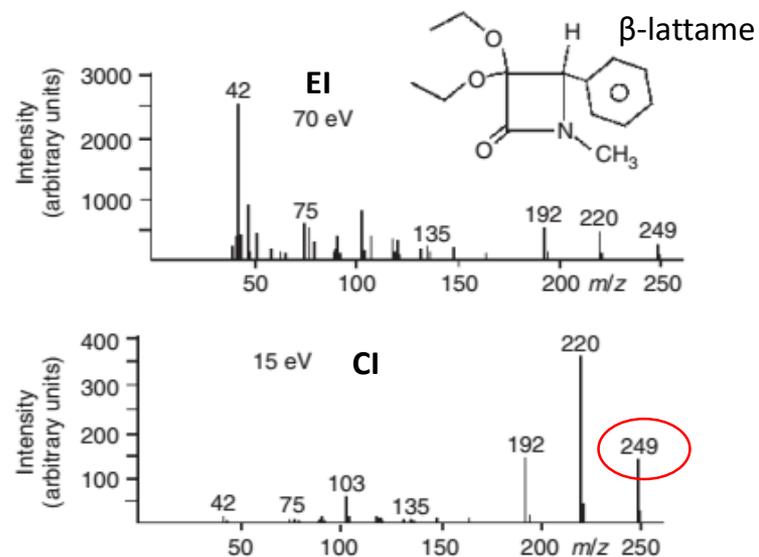
Le molecole di analita sono ionizzate indirettamente attraverso una serie di reazioni con il gas reagente, attraverso il quale solo un piccolo quantitativo di energia è trasferito alle molecole tramite collisioni.

Questa ionizzazione soft genera una minore frammentazione e quindi un maggior quantitativo di ione molecolare rispetto all'EI, ma anche una minor informazione strutturale.

La dipendenza degli spettri CI dalle condizioni sperimentali (es. pressione della sorgente ionica) rende difficile comparare spettri tratti da strumenti diversi o con database.



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



El e CI sono tecniche che danno informazioni complementari



The Nobel Prize in Chemistry 2002

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

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

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



John B. Fenn

🕒 1/4 of the prize

USA

Virginia Commonwealth University



Koichi Tanaka

🕒 1/4 of the prize

Japan

Shimadzu Corp. Kyoto, Japan



Kurt Wüthrich

🕒 1/2 of the prize

Switzerland

Eidgenössische Technische Universität Zürich

The Nobel Prize in Chemistry 2002

Press Release

Advanced Information

Information for the Public

Presentation Speech

Illustrated Presentation

John B. Fenn

Nobel Lecture

Banquet Speech

Nobel Diploma

Prize Award Photo

Other Resources

Koichi Tanaka

Nobel Lecture

Interview

Nobel Diploma

Prize Award Photo

Other Resources

Kurt Wüthrich

Nobel Lecture

Interview

Nobel Diploma

Prize Award Photo

Educational

Other Resources

📅 2001

The 2002 Prize in:

Physics

Chemistry

Physiology or Medicine

Literature

ElectroSpray Ionization (ESI)

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

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

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

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



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

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

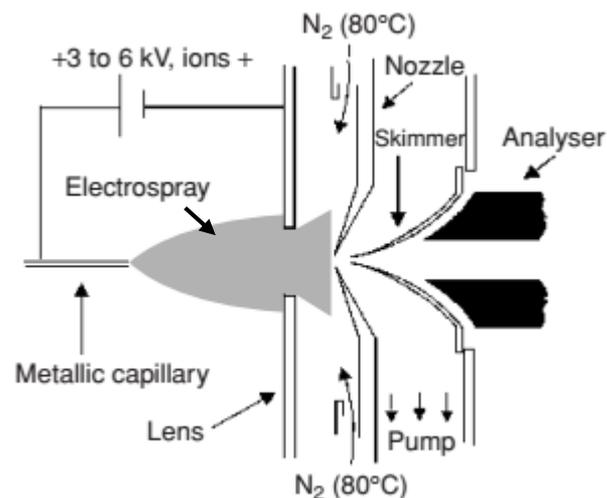


Diagramma della sorgente electro-spray, che usa dei restringimenti (*skimmer*) per la focalizzazione degli ioni e un flusso laminare di azoto riscaldato per la desolvatazione.

segue →

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

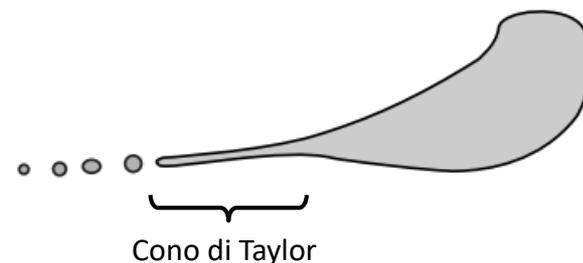
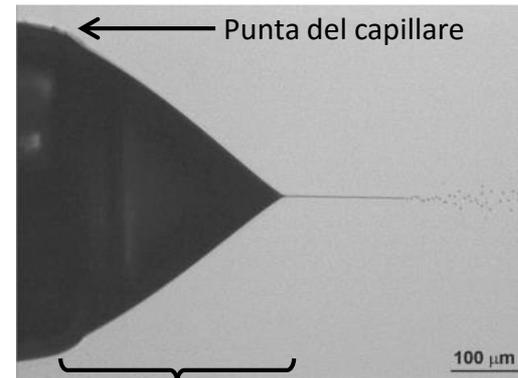
- i) generazione di un spray caricato elettricamente;
- ii) drastica riduzione della grandezza delle gocce per desolvatazione;
- iii) liberazione degli ioni dalla superficie delle gocce.

1) **Una goccia staccatasi dalla punta del capillare**, cioè dal così detto "cono di Taylor", che si forma a causa della presenza del campo elettrico, è detta di **"prima generazione"** e ha un diametro di circa **1.5 μm** e porta circa **50'000 cariche**.

2) A causa della presenza del campo elettrico le cariche all'interno della goccia si spostano deformando la goccia stessa, fino a formare un cono di Taylor sulla goccia, da cui si staccano delle **"gocce figlie" di circa 0.1 μm** di diametro e che portano circa **300-400 cariche**, con un fattore moltiplicativo di densità di carica di circa 7.

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

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

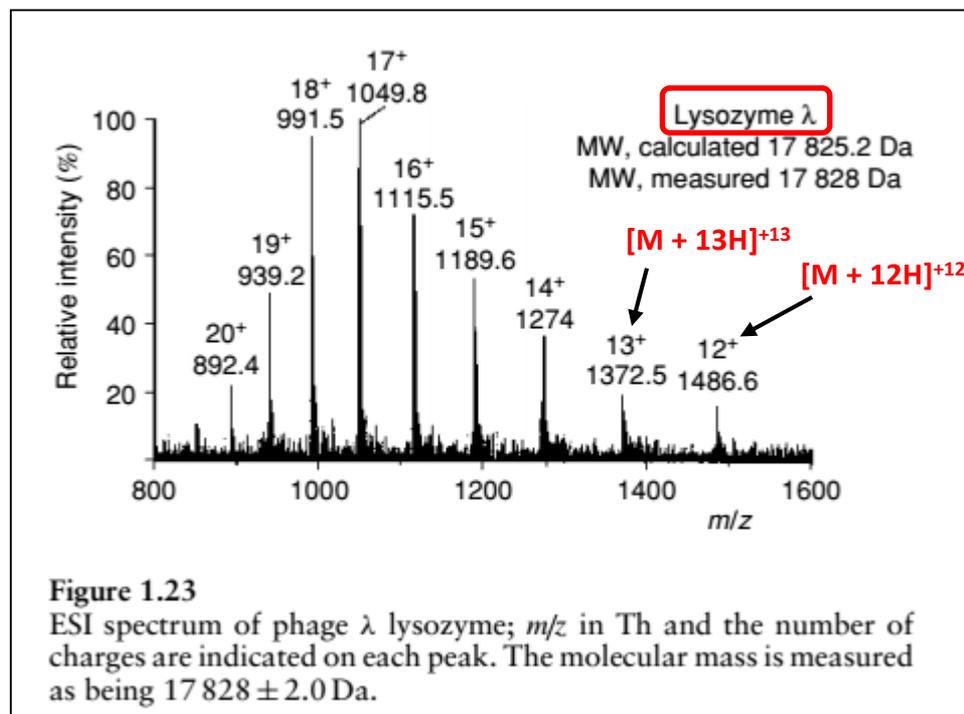
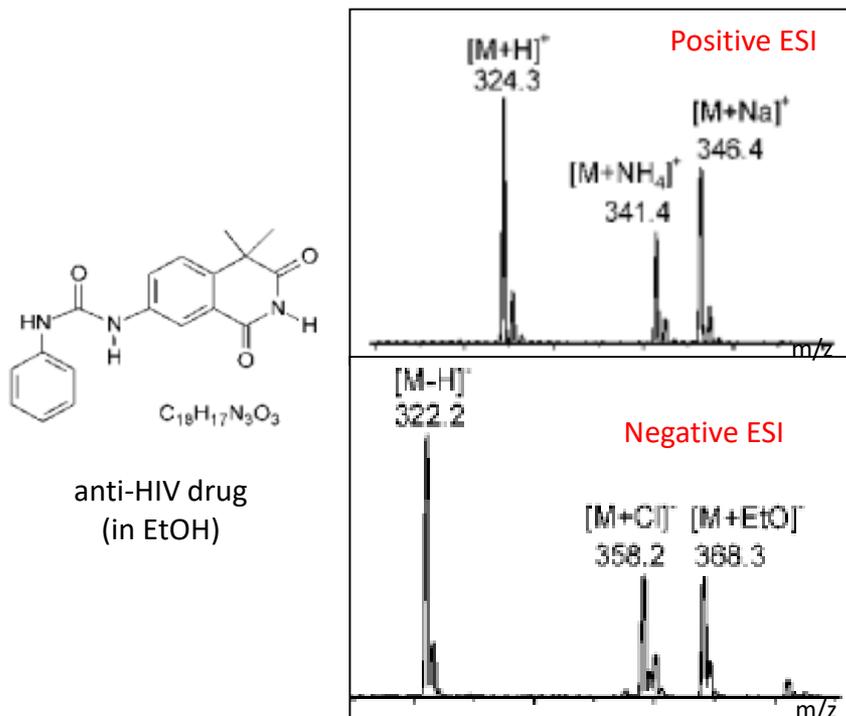


segue →

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

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

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



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

Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)

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

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

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

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

Tipicamente la scarica elettrica per effetto corona genera ioni $\text{N}_2^+ \cdot$ o $\text{O}_2^+ \cdot$. Questi reagiscono con il solvente allo stato gassoso, il quale forma ioni di gas reagente che ionizzano gli analiti presenti.

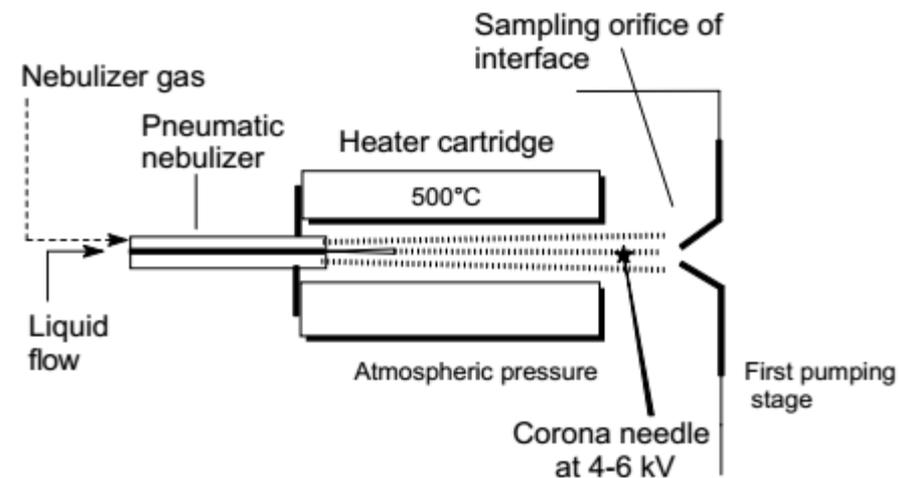


Diagramma della sorgente APCI. Il flusso di liquido viene spruzzato pneumaticamente in un vaporizzatore riscaldato, dove la ionizzazione viene iniziata per effetto corona a pressione atmosferica.

Fast Atom Bombardment (FAB)

L'analita viene immerso in una matrice liquida a bassa volatilità (tipicamente glicerolo) e viene bombardato da un fascio accelerato di molecole neutre. Le molecole neutre che vengono accelerate sono di solito di un gas inerte (Ar o Xe).

L'impatto del fascio con la superficie provoca una ondata di collisioni a cascata che provocano l'espulsione delle molecole dalla superficie e la formazione di ioni.

Questo tipo di tecnica produce ioni molecolari e pochi frammenti strutturalmente significativi. Viene utilizzata molto per analisi di composti organometallici e composti ionici.

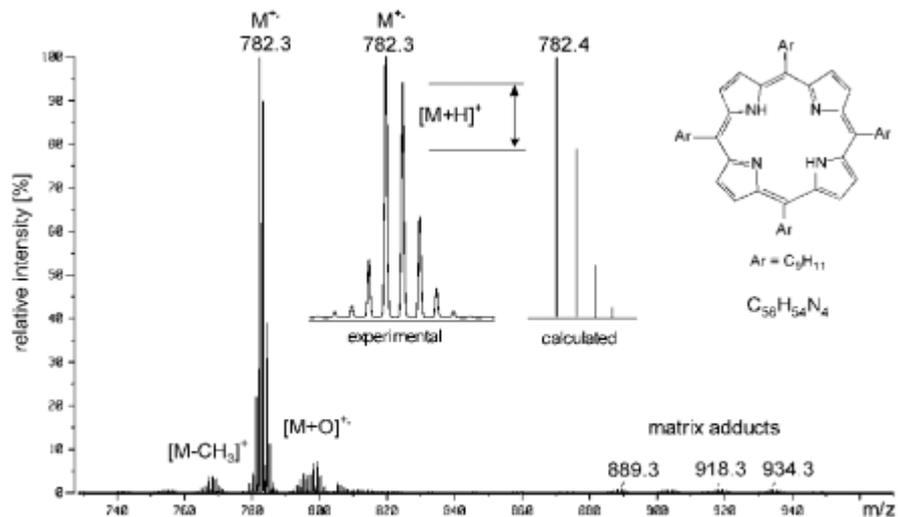


Fig. 10.8. Partial positive-ion FAB spectrum of a tetramesitylporphyrin in NBA matrix. Comparison of the experimental and calculated isotopic patterns reveals the presence of M^+ and $[M+H]^+$ ions. Adapted from Ref. [94] by permission. © IM Publications, 1997.

NBA = 3-nitrobenzilcol

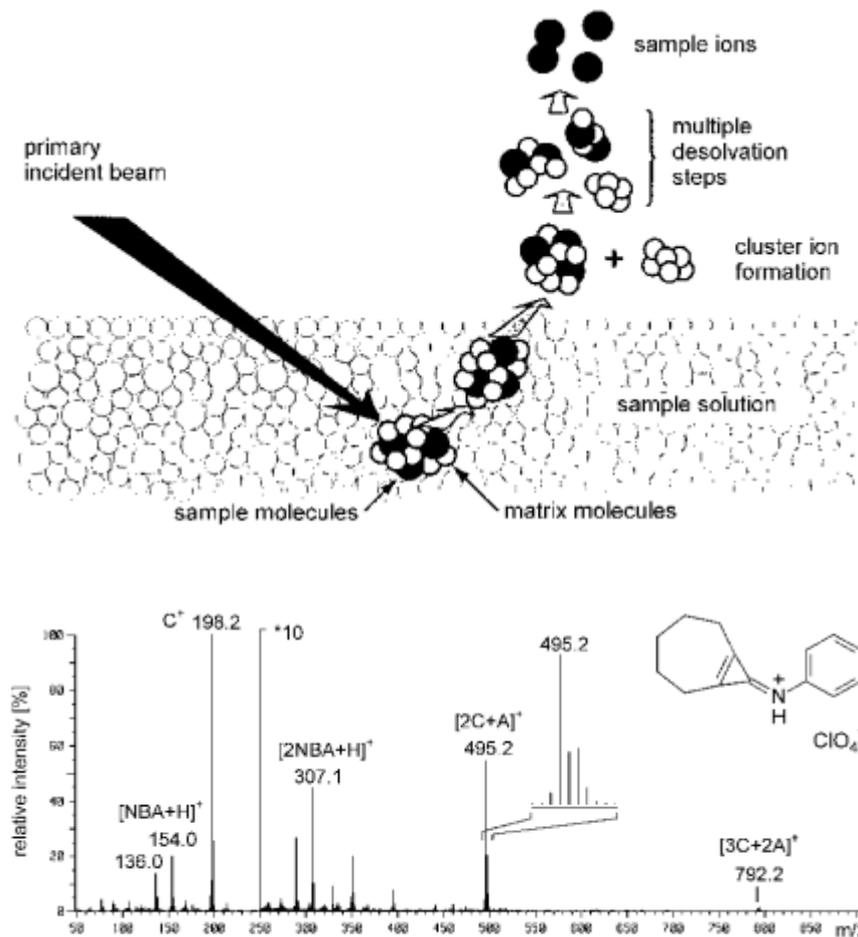


Fig. 10.10. Positive-ion FAB spectrum of an immonium salt [95]. The perchlorate counterion can well be identified from the first and second cluster ion. By courtesy of H. Irrgarter, Heidelberg University.

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)

Questo metodo di ionizzazione deriva dalla ricerca di una tecnica per **ionizzare composti non volatili e termicamente labili quali proteine, oligonucleotidi, polimeri sintetici e composti inorganici ad alta massa**.

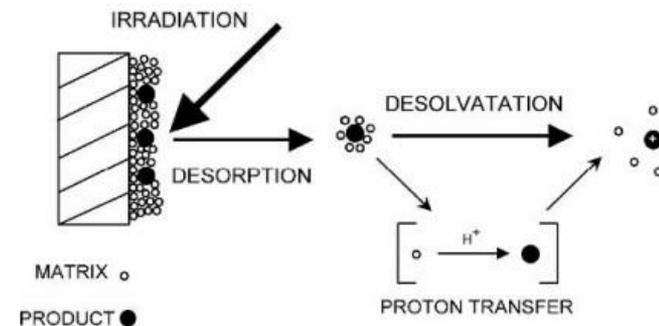
MALDI opera in due stadi:

(i) **il campione da analizzare viene sciolto in un solvente che contiene anche piccole molecole organiche, che formeranno la matrice.**

- Queste **molecole devono avere un forte assorbimento alla lunghezza d'onda del laser utilizzato** (tipicamente nell'UV). Il solvente viene rimosso dalla miscela, il risultato è l'ottenimento di una "soluzione solida" (cristalli) contenenti il campione immerso nella matrice.
- I cristalli sono tali che gli analiti sono immersi in tutta la matrice e la "diluizione" è tale che le molecole di analita sono isolate l'una dall'altra.

(ii) **attraverso intensi impulsi laser di breve durata si opera l'ablazione (cioè la rimozione superficiale) del cristallo. Questo stadio avviene nel vuoto.**

- L'irradiazione laser induce un rapido riscaldamento dei cristalli a causa dell'accumulo di una grande quantità di energia attraverso l'eccitazione delle molecole della matrice.
- Questo rapido riscaldamento causa la sublimazione localizzata della matrice che si espande nella fase gassosa con la conseguente diffusione degli analiti in essa contenuti.
- Gli analiti vengono successivamente ionizzati con meccanismi ancora non del tutto noti.



segue →

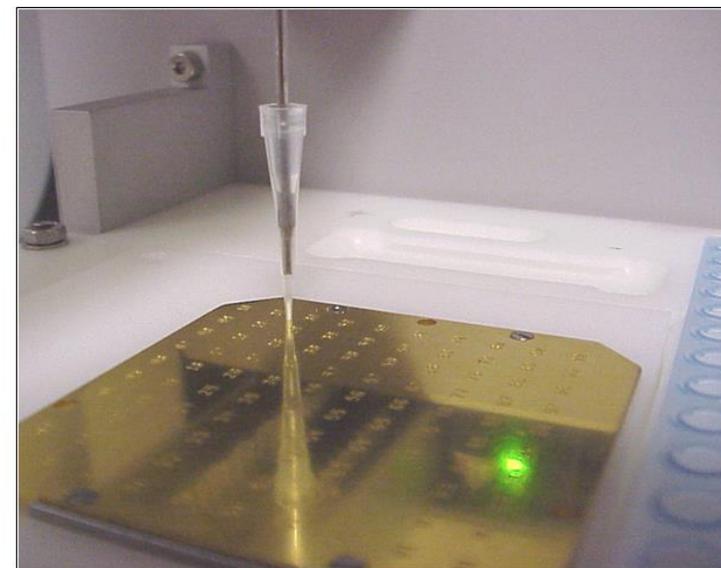
Per operare il MALDI con successo è necessario scegliere accuratamente l'accoppiata matrice-lunghezza del laser, in base al campione da analizzare.

Table 1.1 Some common lasers used for MALDI.

Laser	Wavelength	Energy (eV)	Pulse width
Nitrogen	337 nm	3.68	< 1 ns to a few ns
Nd:YAG μ 3	355 nm	3.49	5 ns
Nd:YAG μ 4	266 nm	4.66	5 ns
Er:YAG	2.94 μ m	0.42	85 ns
CO ₂	10.6 μ m	0.12	100 ns + 1 μ s tail

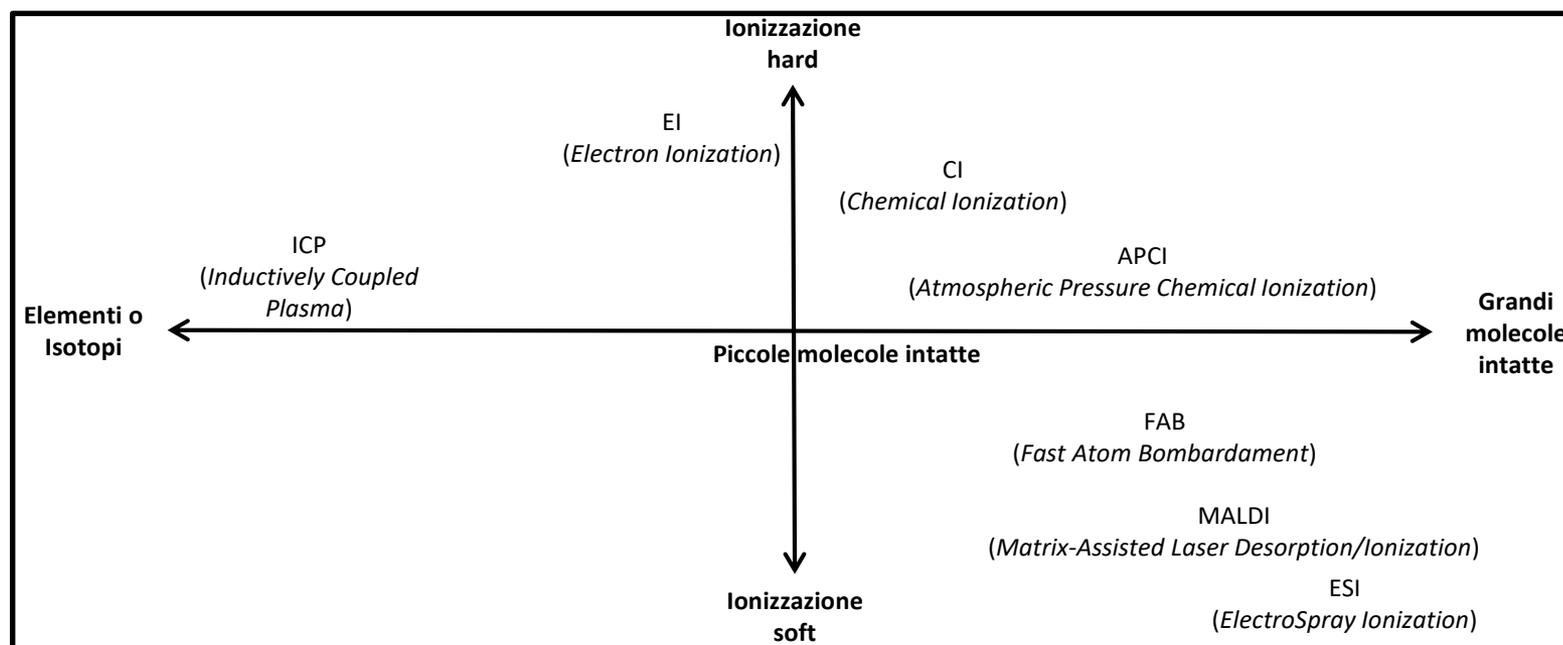
Table 1.2 Some common UV-MALDI matrices.

Analyte	Matrix	Abbreviation
Peptides/proteins	α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid	CHCA
	2,5-Dihydroxybenzoic acid (gentisic)	DHB
	3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (sinapic)	SA
Oligonucleotides	Trihydroxyacetophenone	THAP
	3-Hydroxypicolinic acid	HPA
Carbohydrates	2,5-Dihydroxybenzoic acid	DHB
	α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid	CHCA
	Trihydroxyacetophenone	THAP
Synthetic polymers	Trans-3-indoleacrylic acid	IAA
	Dithranol	DIT
	2,5-Dihydroxybenzoic acid	DHB
Organic molecules	2,5-Dihydroxybenzoic acid	DHB
Inorganic molecules	Trans-2-(3-(4-tert-Butylphenyl)-2methyl-2-propenyliedene)malononitrile	DCTB
Lipids	Dithranol	DIT



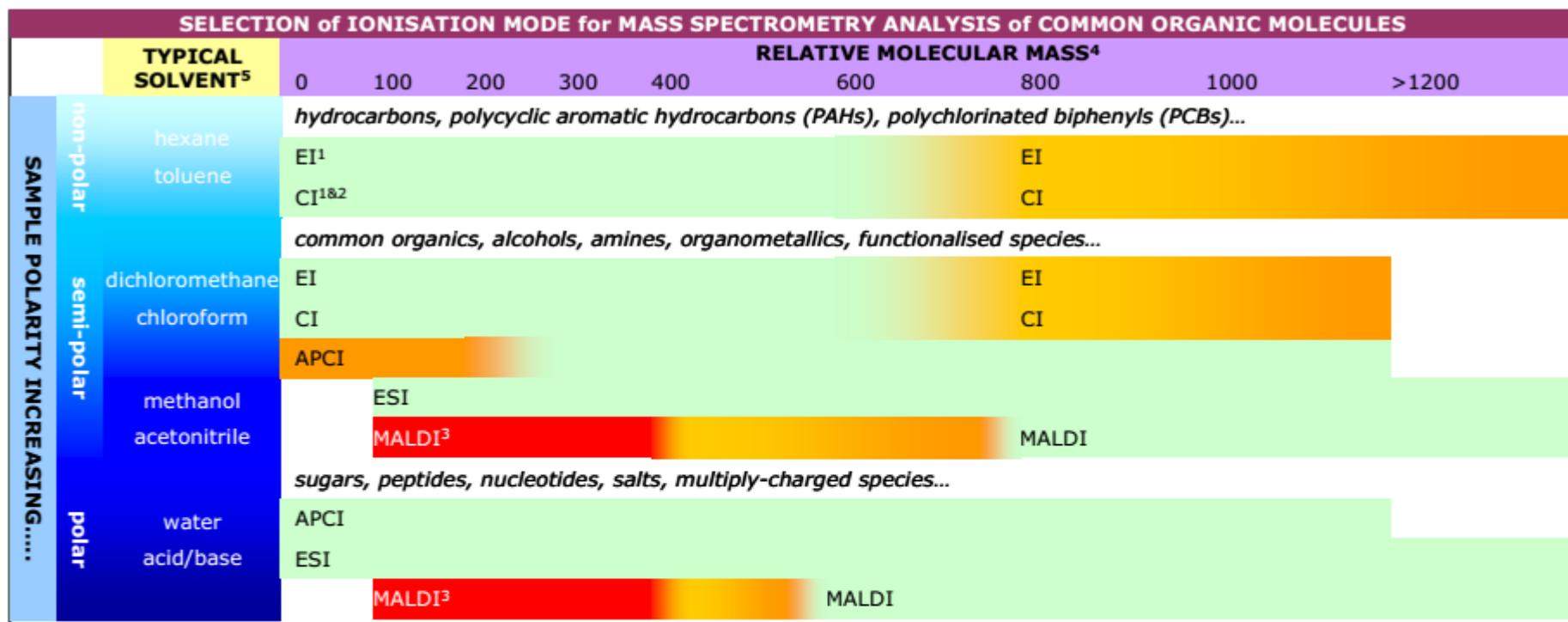
Riassumendo....

ionization method	type of ion formed	analytes	sample intro	mass limits	method type
EI	$M^+, (M^-)$	small volatiles	GC, liquid or solid probe	10^3	hard method structural info
CI	$[M + H]^+, [M + X]^+$	small volatiles	GC, liquid or solid probe	10^3	soft method
APCI	$[M + H]^+, [M + X]^+, [M - H]^-$	small volatiles (less polar species)	LC or syringe	2×10^3	soft method
ESI	$[M + nH]^{n+}, [M - nX]^{n-}$	peptides, proteins nonvolatile	LC or syringe	2×10^5	soft method multiply charged ions
FAB	$[M + H]^+, [M - H]^-$	carbohydrates organometallics peptides, nonvolatile	in viscous matrix	6×10^3	soft but harder than ESI or MALDI
MALDI	$[M + H]^+, [M + X]^+$	peptides, proteins nucleotides	in solid matrix	5×10^5	soft



segue →

Figure 2: Chart to assist with ionisation mode selection (reproduced from EPSRC National Mass Spectrometry Service Centre Summer School, B K Stein, 2006, with permission from EPSRC National Mass Spectrometry Service Centre)



KEY: Examples of compounds of differing polarity are shown in italics

- Primary technique (most likely to work well)
- Secondary technique (should work and will give complementary information to the primary technique)
- Tertiary technique (try it if you have no choice)

- NOTES:**
- 1 For all EI and CI a suitable inlet will also be required to match sample volatility (e.g. GC or solids probe or desorption probe).
 - 2 CI suitability will depend on gas selection (e.g. ammonia is unsuitable for hydrocarbons which will need, e.g. methane).
 - 3 MALDI matrix ions cause interference at lower m/z [so MALDI without matrix (LDI) or surface assisted (SALDI) can be used more readily at lower mass].
 - 4 Mass range also depends on mass analyser and m/z of ion produced.
 - 5 The polarity of the sample material can be assessed by investigating which solvents it will dissolve in (e.g. a material that dissolves in hexane but not in water is non-polar). The solvents listed are for assessment of sample polarity only – they are not suggested solvents for dissolution of the sample for analysis by mass spectrometry.

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.*

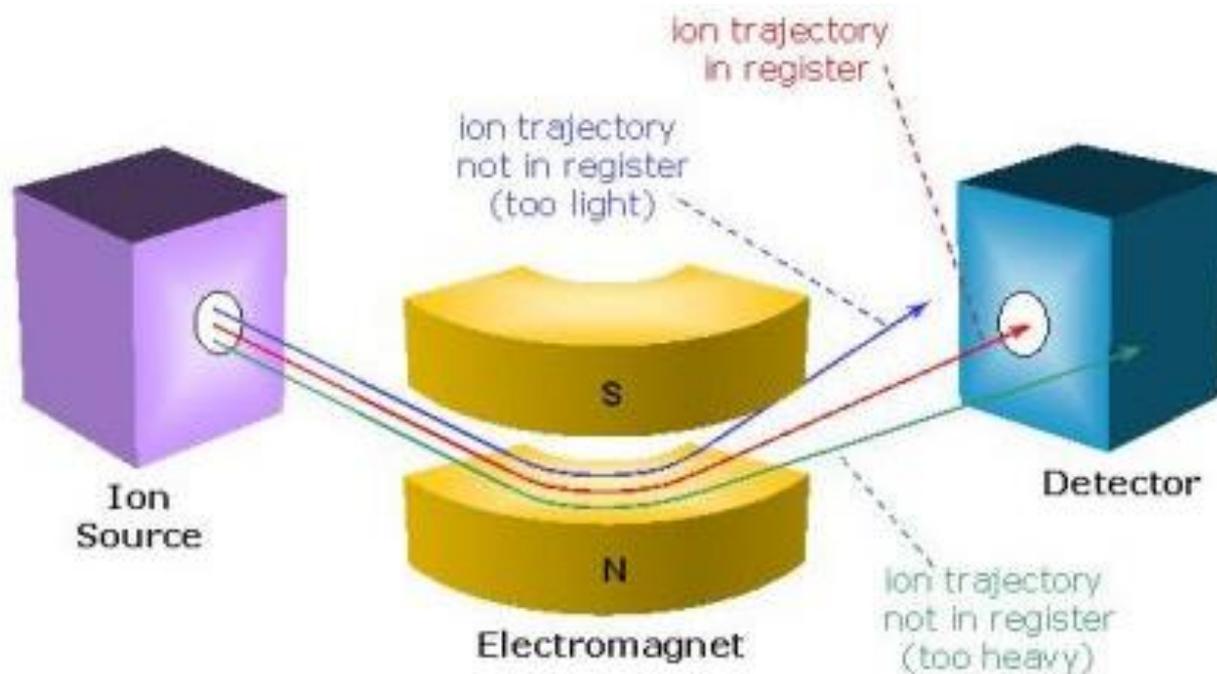
segue →

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

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 uguali).



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:

$$F_L = qvB$$

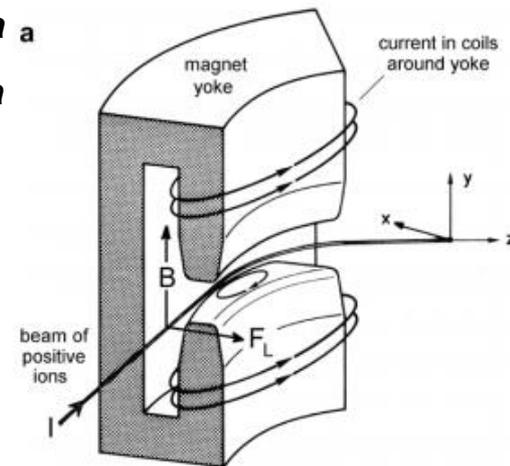
Questa espressione è valida se la velocità (v) e il campo magnetico (B) sono perpendicolari tra di loro.

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

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



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 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:

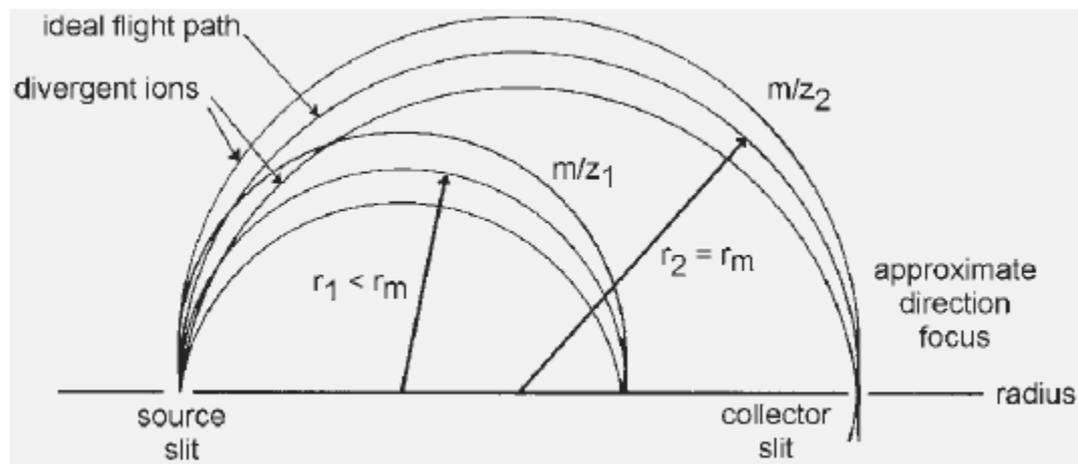
$$\frac{m_i}{q} = \frac{r_m B}{\sqrt{\frac{2qU}{m_i}}} \Rightarrow \frac{m_i}{q} = \frac{r_m^2 B^2}{2U}$$

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 deve essere 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 →

Energia cinetica

Lavoro di estrazione

$$e\Delta V = \frac{1}{2}mv^2$$

Forza centrifuga

Forza di Lorentz

$$ma = \frac{mv^2}{R} = qvB$$

$$\frac{m}{e} = \frac{B^2 R^2}{2\Delta V}$$

Per un certo valore della coppia B e V , esisterà un solo valore di massa m per cui il raggio di deflessione r coincide con il raggio di curvatura del tubo R .

Di conseguenza gli ioni che hanno questo valore di massa escono dal tubo, gli altri no.

Operando a potenziale V costante e facendo una scansione di campo B è possibile fare uscire dal tubo gli ioni a diversa massa in tempi diversi.

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.

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.

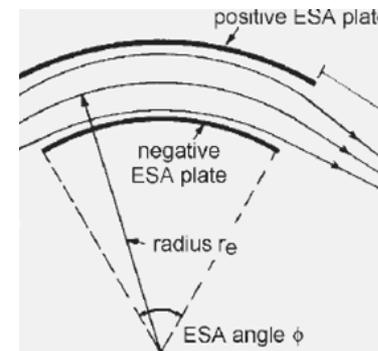
Questa necessità ha portato alla progettazione di strumenti a DOPPIA FOCALIZZAZIONE.

segue →

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.

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

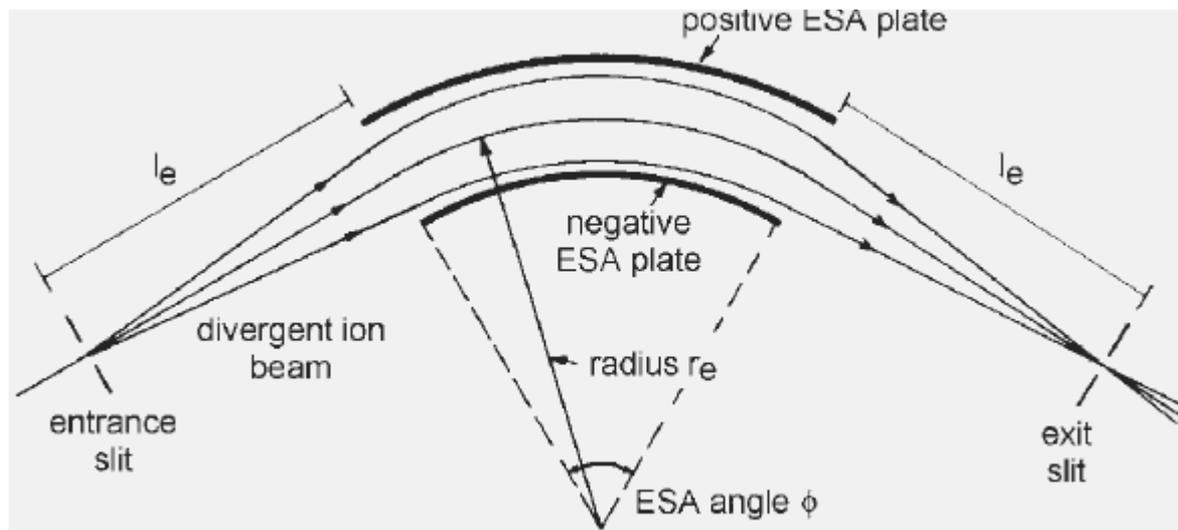
segue →

*Si immagini uno **ione 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 .***

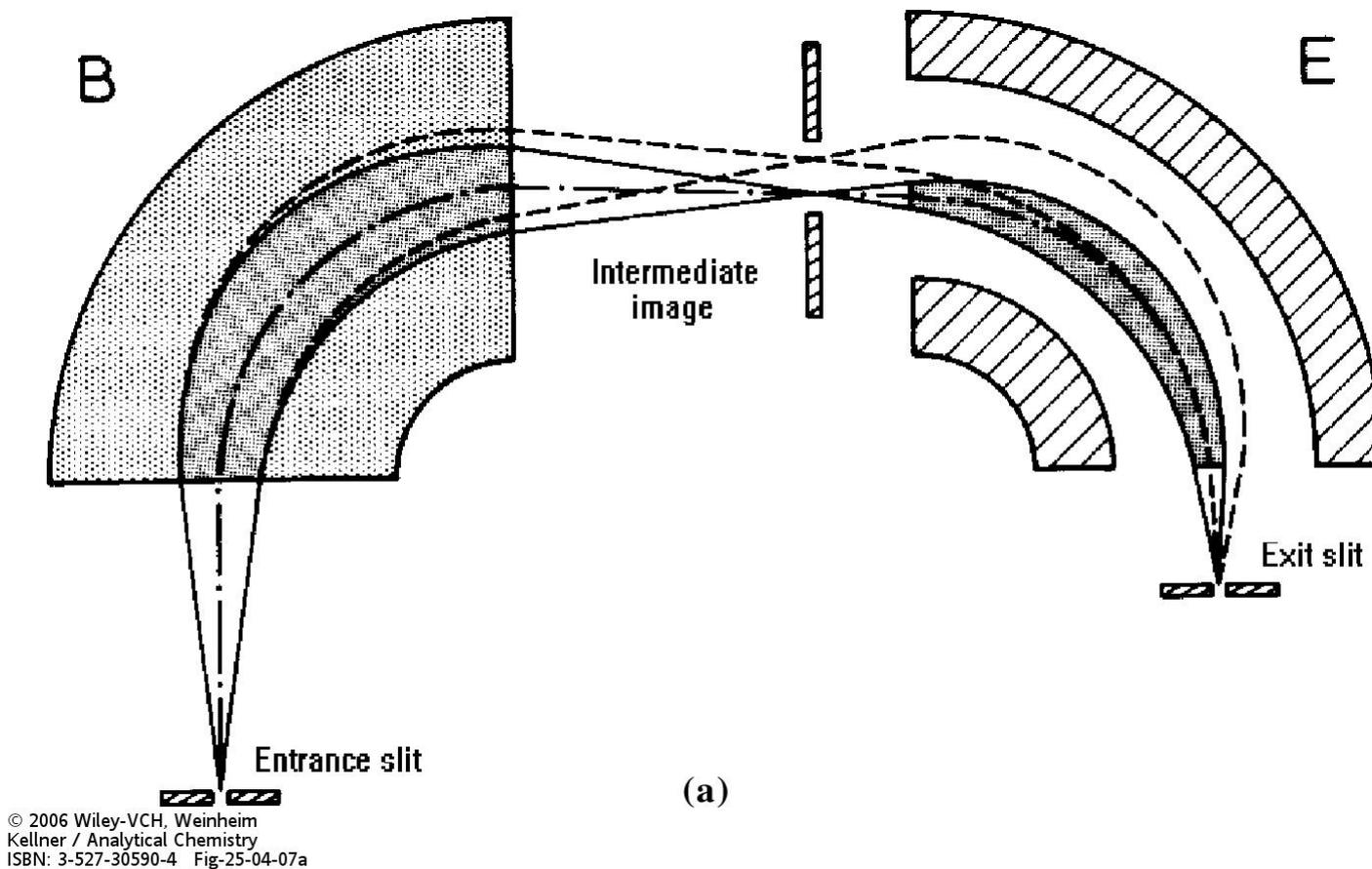
*Allo stesso modo, **uno ione che si avvicina all'inner plate** viene accelerato dalla forza attrattiva.*

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

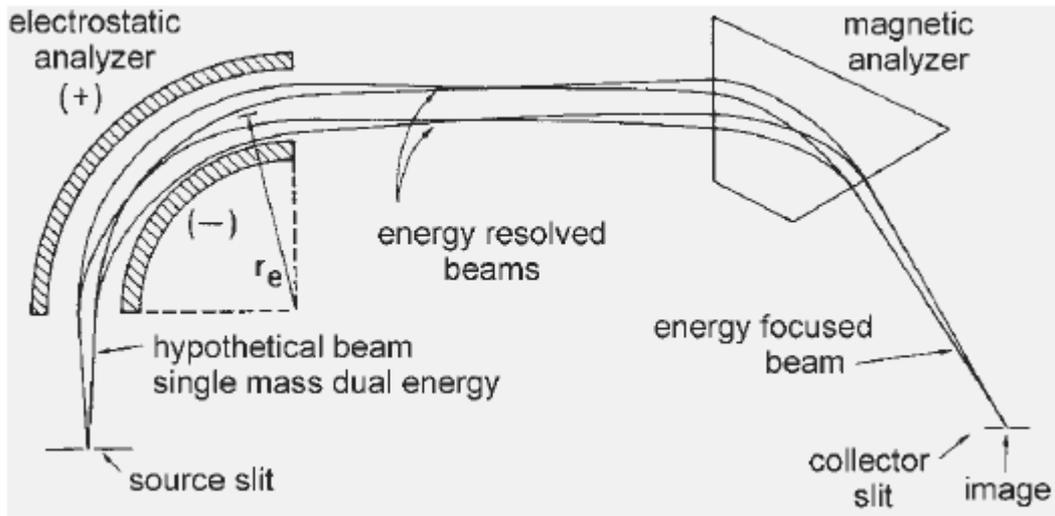


segue →

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

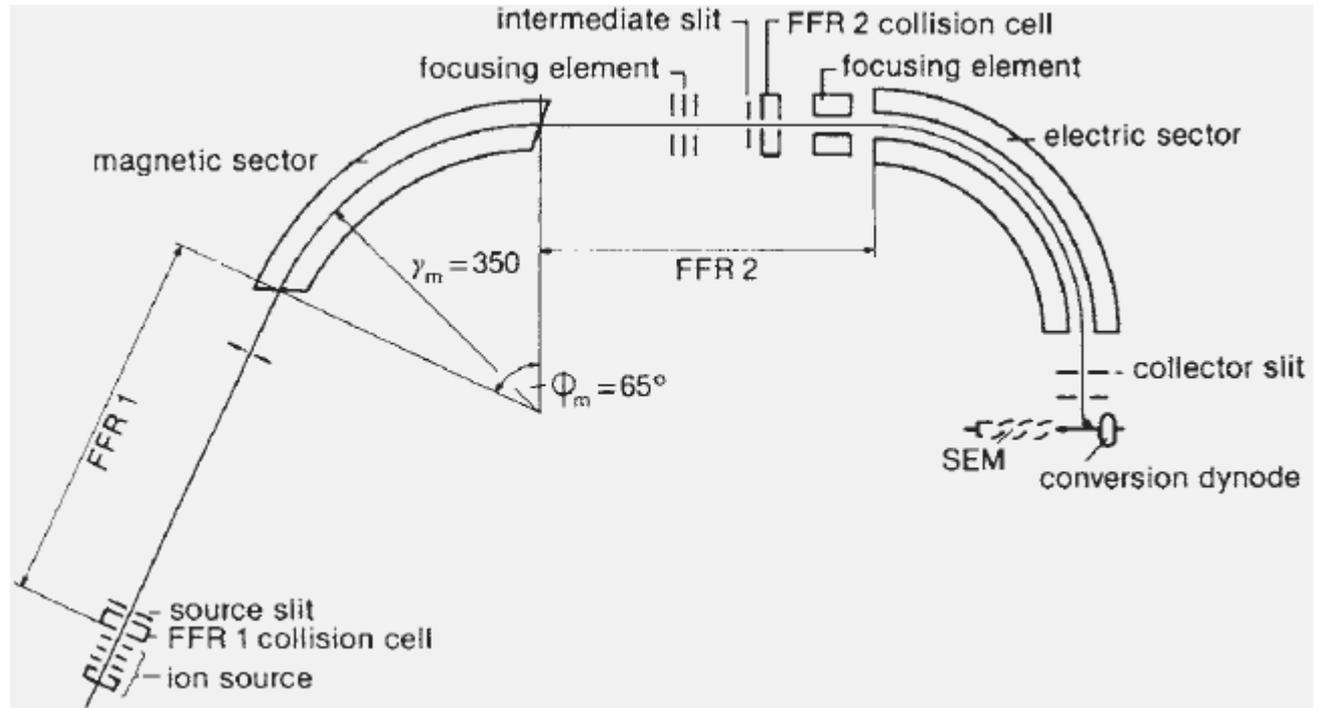


segue →



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.*