

# **CHIMICA ANALITICA II**

**CON LABORATORIO**

**(AA 2021-22)**

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

# La spettrometria di massa organica

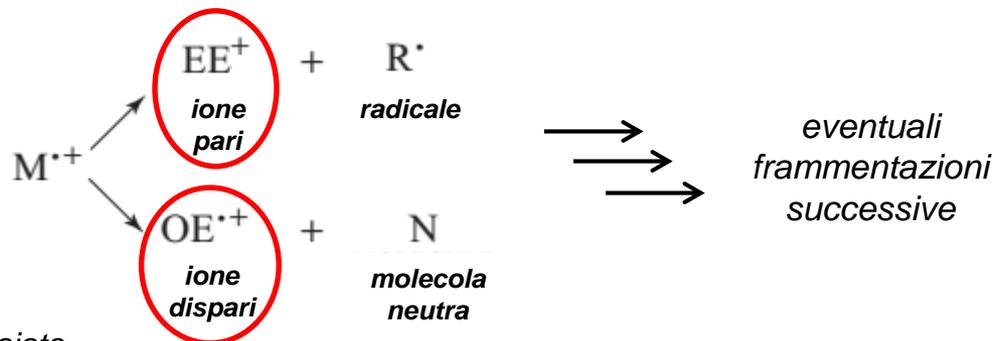
La spettrometria di massa organica consente di identificare e quantificare specie molecolari. Come già anticipato, le molecole vengono portate in fase gassosa e ionizzate, quindi con questa tecnica vengono identificati e quantificati i diversi ioni formati in base al loro rapporto  $m/z$ .

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



La ionizzazione porta alla formazione di un catione radicale  $M^+$  che possiede un certo rapporto  $m/z$ , quindi può essere rivelato dal detector.  $M^+$  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  $M^+$  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:

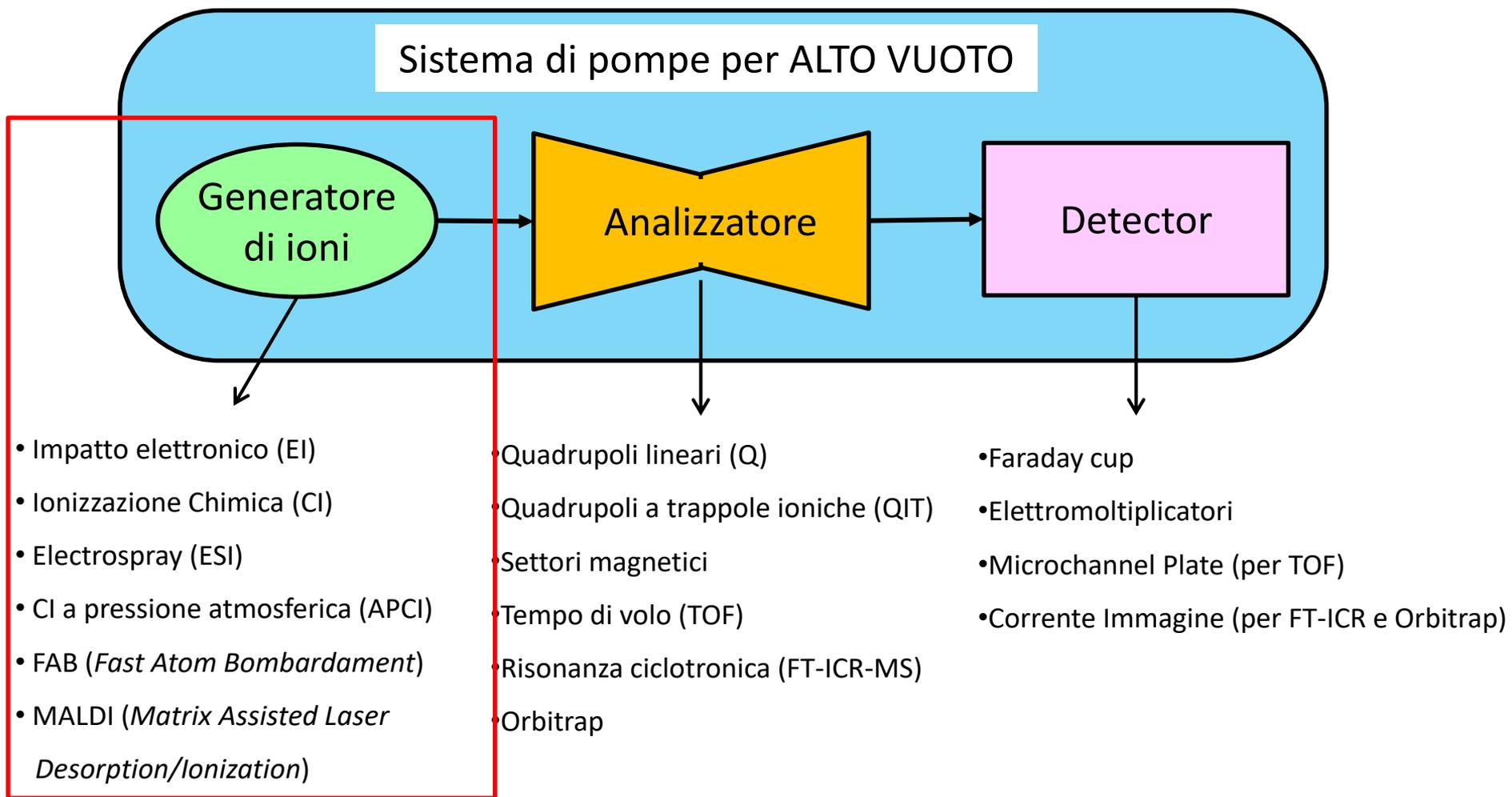
Solo gli ioni vengono rilevati dal detector!!!



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

segue →

## Possibili assetti strumentali di uno spettrometro di massa



## **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

[http://alfresco.ubm-us.net/alfresco\\_images/pharma/2014/08/22/32e51bed-d0db-4d35-a3ef-1a1ab0ff1770/article-358696.pdf](http://alfresco.ubm-us.net/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](https://is.muni.cz/el/1431/podzim2015/F7100/um/um/52107671/gross_mass-spectrometry_second-edition.pdf)

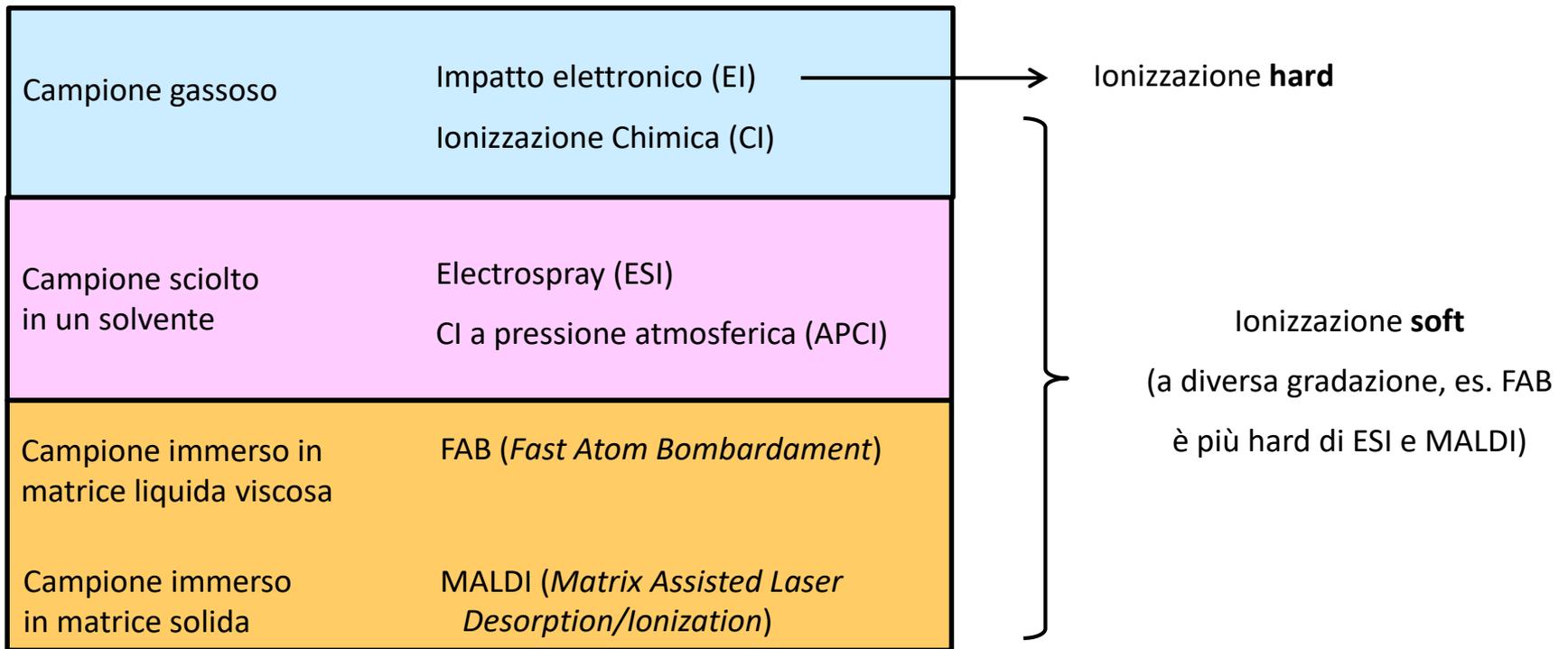
2.1.1 Formation of Ions

2.1.2 Processes Accompanying Electron Ionization

2.1.3 Ions Generated by Penning Ionization

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

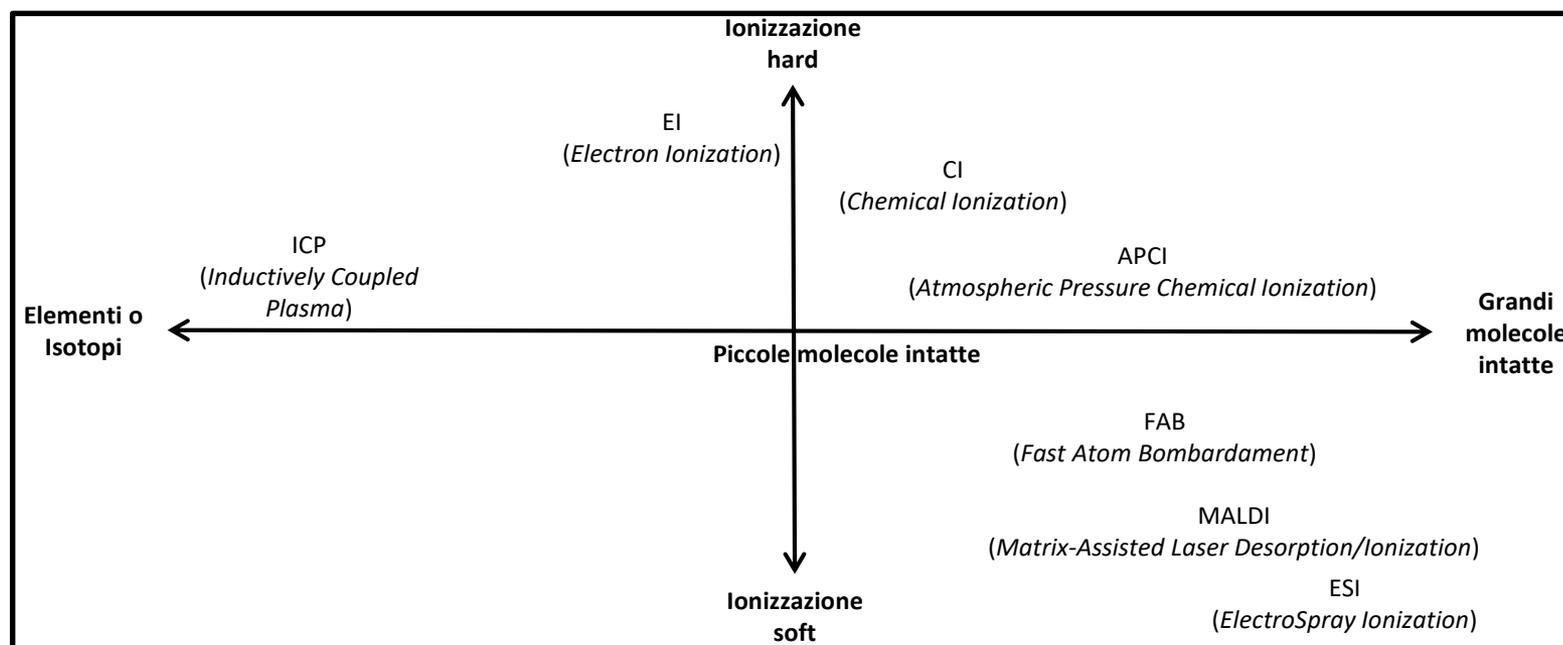
- a seconda **dello stato in cui deve essere il campione** quando viene introdotto nello strumento (gas, sciolto in un solvente, immerso in una matrice);
- a seconda **della quantità di energia di ionizzazione** che viene fornita al campione (molta → "hard ionization", poca → "soft ionization")



segue →

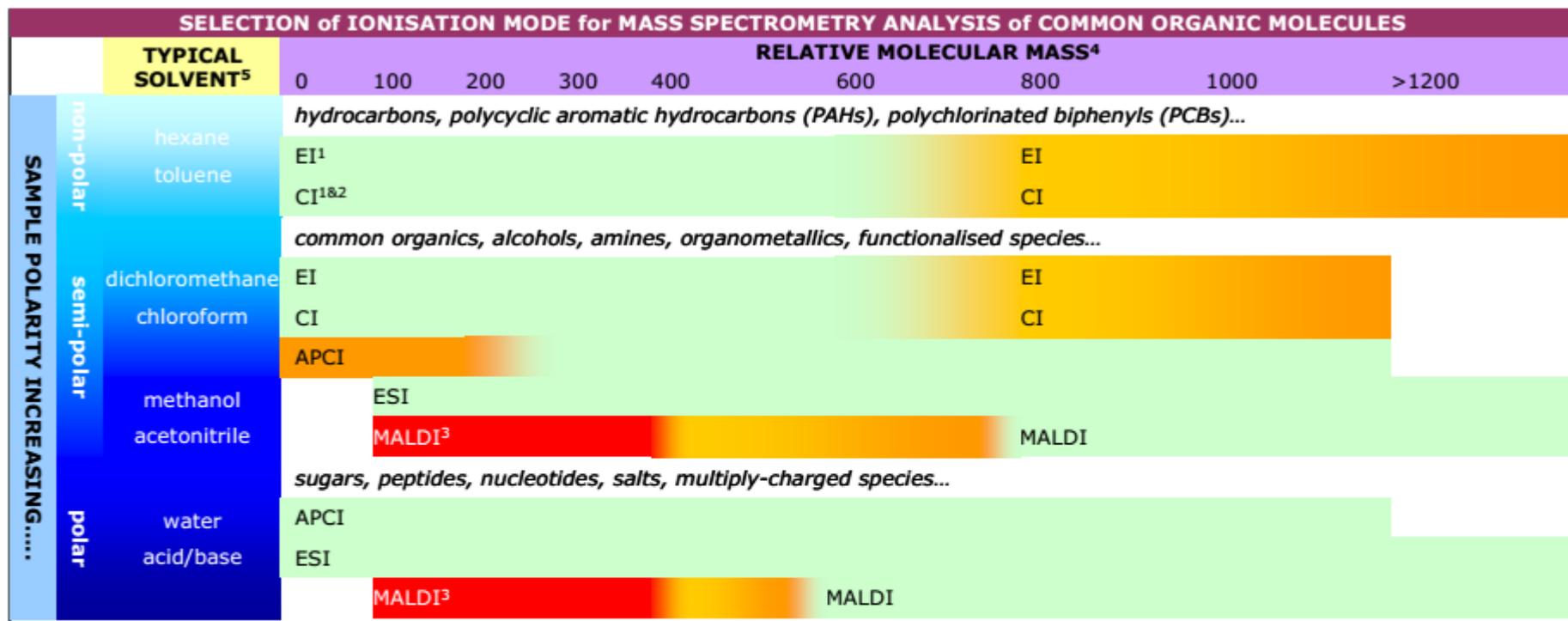
Riassumendo....

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	$2 \times 10^3$	soft method
ESI	$[M + nH]^{n+}, [M - nX]^{n-}$	peptides, proteins nonvolatile	LC or syringe	$2 \times 10^5$	soft method multiply charged ions
FAB	$[M + H]^+, [M - H]^-$	carbohydrates organometallics peptides, nonvolatile	in viscous matrix	$6 \times 10^3$	soft but harder than ESI or MALDI
MALDI	$[M + H]^+, [M + X]^+$	peptides, proteins nucleotides	in solid matrix	$5 \times 10^5$	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.

# GLI ISOTOPI

Gli isotopi sono elementi che contengono lo stesso numero di protoni, quindi hanno stesso numero atomico  $Z$  che determina la loro posizione nella Tavola Periodica, ma differiscono per il numero di neutroni presenti nel nucleo.

Tra gli 83 elementi stabili presenti in natura:

- a) 20 di essi esistono in una unica forma isotopica, cioè sono **mono-isotopici**;
- b) Molti elementi esistono sotto forma di due isotopi, cioè sono **di-isotopici**, in particolare possono essere classificati come  $X+1$  o  $X+2$  o, in rari casi,  $X-1$ ;
- c) La maggior parte degli elementi è definita **poli-isotopica** poiché possiede un numero di isotopi uguale a tre o più.

$X$  = numero di massa (protoni+neutroni) dell'isotopo più abbondante.

segue →

# Esempi:

**a) mono-isotopici:** fluoro ( $^{19}\text{F}$ ), sodio ( $^{23}\text{Na}$ ), fosforo ( $^{31}\text{P}$ ), iodio ( $^{127}\text{I}$ ), berillio ( $^9\text{Be}$ ), alluminio ( $^{27}\text{Al}$ ), manganese ( $^{55}\text{Mn}$ ), cobalto ( $^{59}\text{Co}$ ), arsenico ( $^{75}\text{As}$ ), cesio ( $^{133}\text{Cs}$ ), and oro ( $^{197}\text{Au}$ );(\*)

(\*) N.B.: dall'elenco sono esclusi gli isotopi radioattivi (cioè non stabili), ad es.  $^{131}\text{I}$  e  $^{137}\text{Cs}$

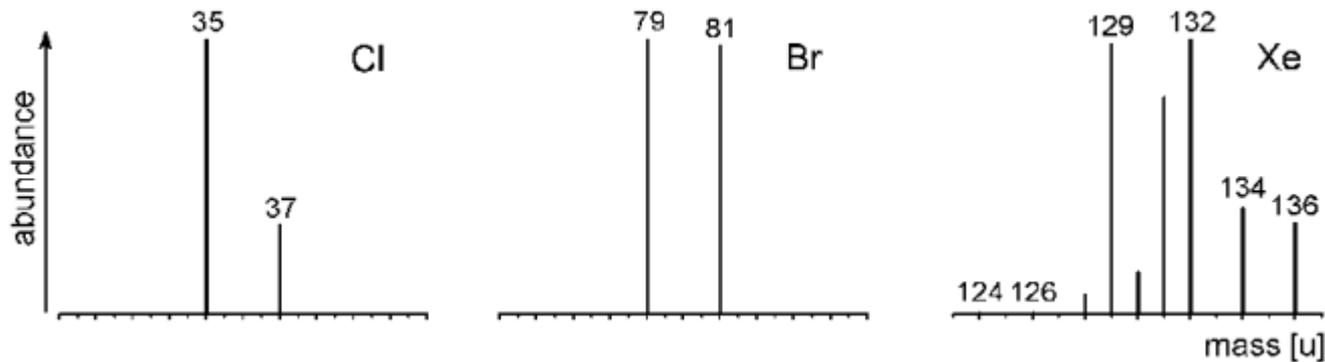
**b) di-isotopici, con numero di neutroni uguale a:**

❖  $X+1$ : idrogeno ( $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H} \equiv \text{D}$ ), carbonio ( $^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ), and azoto ( $^{14}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ );

❖  $X+2$ : cloro ( $^{35}\text{Cl}$ ,  $^{37}\text{Cl}$ ), bromo ( $^{79}\text{Br}$ ,  $^{81}\text{Br}$ ), rame ( $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{65}\text{Cu}$ ), argento ( $^{107}\text{Ag}$ ,  $^{109}\text{Ag}$ );

❖  $X-1$ : litio ( $^6\text{Li}$ ,  $^7\text{Li}$ ), boro ( $^{10}\text{B}$ ,  $^{11}\text{B}$ ), and vanadio ( $^{50}\text{V}$ ,  $^{51}\text{V}$ );

**c) poli-isotopici:** ossigeno ( $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ), zolfo ( $^{32}\text{S}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$ ), xenon ( 9 isotopi).



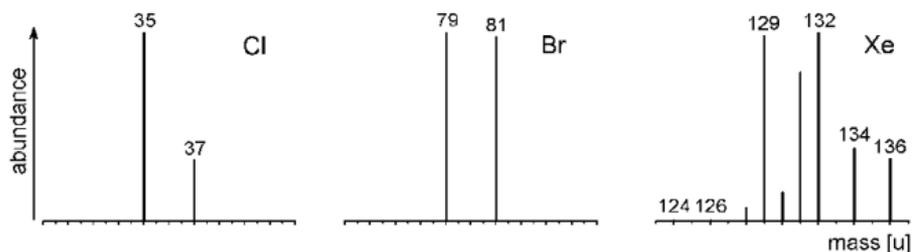
segue →

# L'ABBONDANZA ISOTOPICA

*Le abbondanze isotopiche per un singolo elemento sono riportate*

- o considerando che la somma delle abbondanze di tutti gli isotopi sia = 100%;
- oppure normalizzando rispetto all'isotopo più abbondante che viene posto = 100% quindi gli altri vengono calcolati di conseguenza (vedi tabella)

*Le abbondanze isotopiche vengono usualmente rappresentate utilizzando dei grafici a barre che riportano in ascissa le unità di massa atomica (u) e in ordinata l'Abbondanza %.*



**Table 3.1.** Isotopic classifications and isotopic compositions of some common elements. A complete table is provided in the Appendix. © IUPAC 2001 [7,8]

Classification	Atomic symbol	Atomic number Z	Mass number A	Isotopic composition	Isotopic mass [u]	Relative atomic mass [u]
(X) <sup>a</sup>	H	1	1	100	1.007825	1.00795
			2	0.0115	2.014101	
X	F	9	19	100	18.998403	18.998403
X	Na	11	23	100	22.989769	22.989769
X	P	15	31	100	30.973762	30.973762
X	I	53	127	100	126.904468	126.904468
X+1	C	6	12	100	12.000000 <sup>b</sup>	12.0108
			13	1.08	13.003355	
X+1	N	7	14	100	14.003074	14.00675
			15	0.369	15.000109	
(X+2) <sup>a</sup>	O	8	16	100	15.994915	15.9994
			17	0.038	16.999132	
			18	0.205	17.999116	
(X+2) <sup>a</sup>	Si	14	28	100	27.976927	28.0855
			29	5.0778	28.976495	
			30	3.3473	29.973770	
(X+2) <sup>a</sup>	S	16	32	100	31.972071	32.067
			33	0.80	32.971459	
			34	4.52	33.967867	
			36	0.02	35.967081	
X+2	Cl	17	35	100	34.968853	35.4528
			37	31.96	36.965903	
X+2	Br	35	79	100	78.918338	79.904
			81	97.28	80.916291	
X-1	Li	3	6	8.21	6.015122	6.941
			7	100	7.016004	
X-1	B	5	10	24.8	10.012937	10.812
			11	100	11.009306	
poly	Xe	54	124	0.33	123.905896	131.29
			126	0.33	125.904270	
			128	7.14	127.903530	
			129	98.33	128.904779	
			130	15.17	129.903508	
			131	78.77	130.905082	
			132	100	131.904154	
			134	38.82	133.905395	
			136	32.99	135.907221	

<sup>a</sup> Classification in parentheses = "not in the strict sense". <sup>b</sup> Standard of atomic mass scale.

# LE DIVERSE DEFINIZIONI DI MASSA di UN ELEMENTO

➤ **Massa nominale di un elemento:**

è il numero intero ottenuto per arrotondamento della massa esatta del suo isotopo più abbondante in natura

➤ **Massa isotopica:**

è la massa esatta di un isotopo. E' molto prossima alla massa nominale di un isotopo, ma non uguale. Unica eccezione è il  $^{12}\text{C}$  che ha massa isotopica = 12,000000 u.

➤ **Massa monoisotopica:**

è la massa esatta dell'isotopo più abbondante in natura di un elemento.

➤ **Massa atomica relativa:**

è calcolata come media pesata di tutti gli isotopi presenti in natura di un elemento:

$$M_r = \frac{\sum_{i=1}^i A_i \times m_i}{\sum_{i=1}^i A_i}$$

dove  $A_i$  è l'abbondanza e  $m_i$  la massa isotopica dell' $i$ -esimo isotopo.

segue →

### Esempio: il cloro.

- Massa nominale del cloro = 35;
- Massa isotopica ad es. del  $^{37}\text{Cl}$  = 36.965903 u;
- Massa monoisotopica del cloro = 34.968853 u;
- Massa atomica relativa del cloro = 35.4528 u

Tuttavia non esiste un atomo con questa massa. Invece il cloro è composto da  $^{35}\text{Cl}$  (34.968853 u) e  $^{37}\text{Cl}$  (36.965903 u) al 75.78% e 24.22% dell'abbondanza totale o, in termini di abbondanza relativa (o normalizzata), 100% e 31.96% rispettivamente.

Quindi è possibile calcolare la massa atomica relativa del cloro come segue:

$$M_r = (75.78 \times 34.968853 \text{ u} + 24.22 \times 36.965903 \text{ u}) / (75.78 + 24.22) = 35.4528 \text{ u.}$$

oppure

$$M_r = (100 \times 34.968853 \text{ u} + 31.96 \times 36.965903 \text{ u}) / (100 + 31.96) = 35.4528 \text{ u.}$$

**Table 3.1.** Isotopic classifications and isotopic compositions of some common elements. A complete table is provided in the Appendix. © IUPAC 2001 [7,8]

Classification	Atomic symbol	Atomic number Z	Mass number A	Isotopic composition	Isotopic mass [u]	Relative atomic mass [u]
(X) <sup>a</sup>	H	1	1	100	1.007825	1.00795
			2	0.0115	2.014101	
X	F	9	19	100	18.998403	18.998403
X	Na	11	23	100	22.989769	22.989769
X	P	15	31	100	30.973762	30.973762
X	I	53	127	100	126.904468	126.904468
X+1	C	6	12	100	12.000000 <sup>b</sup>	12.0108
			13	1.08	13.003355	
X+1	N	7	14	100	14.003074	14.00675
			15	0.369	15.000109	
(X+2) <sup>a</sup>	O	8	16	100	15.994915	15.9994
			17	0.038	16.999132	
			18	0.205	17.999116	
(X+2) <sup>a</sup>	Si	14	28	100	27.976927	28.0855
			29	5.0778	28.976495	
			30	3.3473	29.973770	
(X+2) <sup>a</sup>	S	16	32	100	31.972071	32.067
			33	0.80	32.971459	
			34	4.52	33.967867	
			36	0.02	35.967081	
X+2	Cl	17	35	100	34.968853	35.4528
			37	31.96	36.965903	
X+2	Br	35	79	100	78.918338	79.904
			81	97.28	80.916291	
X-1	Li	3	6	8.21	6.015122	6.941
			7	100	7.016004	
X-1	B	5	10	24.8	10.012937	10.812
			11	100	11.009306	
poly	Xe	54	124	0.33	123.905896	131.29
			126	0.33	125.904270	
			128	7.14	127.903530	
			129	98.33	128.904779	
			130	15.17	129.903508	
			131	78.77	130.905082	
			132	100	131.904154	
			134	38.82	133.905395	
			136	32.99	135.907221	

<sup>a</sup> Classification in parentheses = "not in the strict sense". <sup>b</sup> Standard of atomic mass scale.

**N.B.:** l'unità di massa atomica [u] è definita come 1/12 della massa di un atomo dell'isotopo  $^{12}\text{C}$  a cui viene assegnata una massa di esattamente 12 u, con  $1 \text{ u} = 1.660538 \times 10^{-27} \text{ kg}$ .

# LE DIVERSE DEFINIZIONI DI MASSA di UNA MOLECOLA

## ➤ **Massa molecolare nominale:**

la massa nominale di una molecola è uguale alla somma delle masse nominali degli elementi che la costituiscono.

Esempio 1:

$$\text{Massa nominale CO}_2 = 12 \text{ u} + 16 \text{ u} \times 2 = 44 \text{ u}$$

Esempio 2:

$$\text{Massa nominale SnCl}_2 = 120 \text{ u} + 35 \text{ u} \times 2 = 190 \text{ u}$$

N.B.: In questo caso mentre l'isotopo  $^{35}\text{Cl}$  è sia l'isotopo più abbondante per il cloro che quello a massa minore, per lo stagno l'isotopo più abbondante è  $^{120}\text{Sn}$  (e l'isotopo a massa minore è  $^{112}\text{Sn}$ ).

## ➤ **Massa molecolare monoisotopica:**

è calcolata come somma di tutte le masse atomiche monoisotopiche degli elementi che sono presenti nella sua formula empirica.

Esempio:

$$\text{Massa molecolare monoisotopica CO}_2 = 12.000000 \text{ u} + 15.994915 \text{ u} \times 2 = 43.989830 \text{ u}$$

## ➤ **Massa molecolare relativa:**

è calcolata come somma di tutte le masse atomiche relative degli elementi che sono presenti nella sua formula empirica. E' la massa comunemente utilizzata nei calcoli stechiometrici.

Esempio:

$$\text{Massa molecolare relativa CO}_2 = 12.0108 \text{ u} + 15.9994 \text{ u} \times 2 = 44.0096 \text{ u}$$

# LE DIVERSE DEFINIZIONI DI MASSA di UNO IONE

- *Massa nominale, Massa isotopica, Massa monoisotopica, Massa relativa*  
*= alle definizioni per le molecole*

- **Massa esatta:**

- ❖ *per gli ioni POSITIVI che si formano per rimozione di uno o più elettroni da una molecola è uguale a:*

$$\text{Massa Molecolare Monoisotopica} - n_e \times m_e$$

dove  $n_e$  = numero degli elettroni sottratti e  $m_e$  = massa dell'elettrone (0.000548 u)

- ❖ *per gli ioni NEGATIVI che si formano per acquisizione di uno o più elettroni da parte di una molecola è uguale a:*

$$\text{Massa Molecolare Monoisotopica} + n_e \times m_e$$

dove  $n_e$  = numero degli elettroni sottratti e  $m_e$  = massa dell'elettrone (0.000548 u)

*Esempio:*

$$\text{Massa esatta } \text{CO}_2^{+\bullet} \text{ (catione radicale)} = 12.000000 \text{ u} + 15.994915 \text{ u} \times 2 - 0.000548 \text{ u} = 43.989282 \text{ u}$$

segue →

## ***E' necessario considerare la massa dell'elettrone?***

*Questa considerazione è stata dibattuta a livello teorico finché non sono stati realizzati strumenti in grado di misurare masse con accuratezza  $< 0.001$  u.*

*Questi strumenti sono principalmente il FT-ICR (Analizzatore a risonanza ionica ciclotronica a trasformata di Fourier), l'OrbiTrap (un sofisticato Analizzatore a Trappola Ionica) e l'oaTOF (Analizzatore a tempo di volo ad accelerazione ortogonale).*

*In questo caso non considerando le masse degli elettroni si commettono degli errori sistematici che portano ad ottenere delle misure errate.*

**Quindi, cosa misuriamo?**



➤ **Massa accurata:**

*è la massa di uno ione misurata sperimentalmente, quindi è l'approssimazione sperimentale della massa esatta (che è un concetto teorico). Al progredire della tecnica in campo strumentale si continuano ad aggiungere cifre decimali ai valori ottenuti con strumentazione già in uso.*

# LA RISOLUZIONE IN SPETTROMETRIA DI MASSA

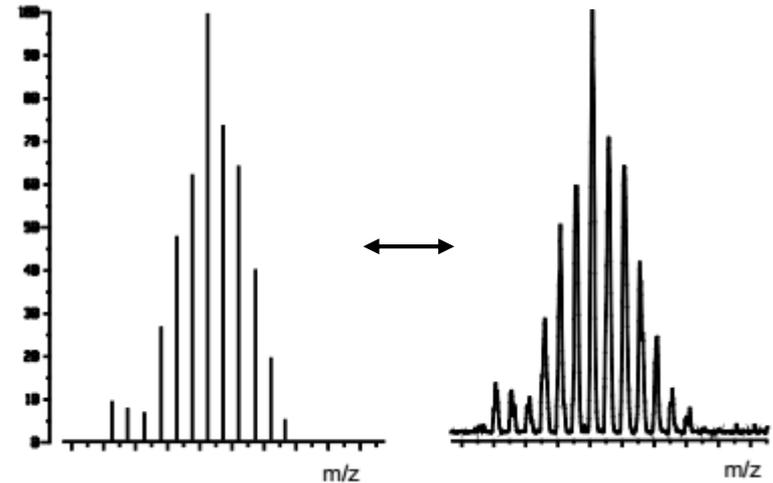
La **RISOLUZIONE** è la capacità dello strumento di distinguere ioni con rapporto  $m/z$  (massa/carica) quasi uguale (o molto prossimo).

In altre parole è la minima differenza  $\Delta m/z$  apprezzabile dallo strumento rispetto ad un valore  $m/z$ :

$$R = \frac{m/z}{\Delta m/z}$$

è un numero adimensionale, viene detta anche **potere risolvente**.

Uno **spettro di massa** è un grafico in cui in ascissa è riportato il rapporto  $m/z$  e in ordinata l'abbondanza relativa %. Viene visualizzato usualmente come grafico a barre, ma in realtà le barre rappresentano dei picchi molto stretti, tanto più stretti quanto più alta è la risoluzione dello strumento.

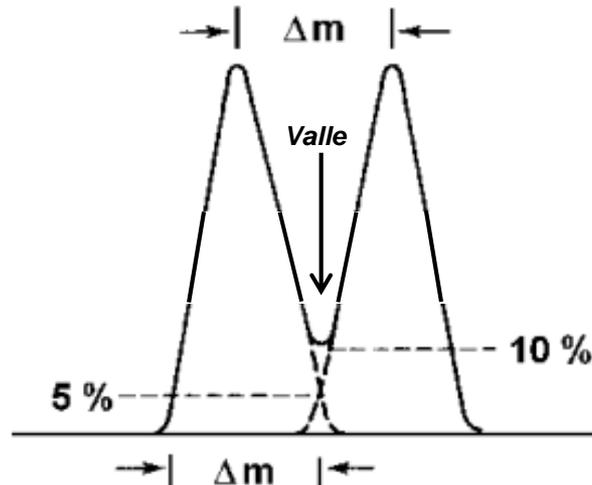


segue →

Esistono due definizioni per indicare la risoluzione di uno spettrometro di massa, una più datata ed una più recente dovuta al progresso nella realizzazione della strumentazione.

**a)  $R_{10\%}$  o risoluzione di valle al 10% (anche denotata dal solo simbolo R):**

Due picchi sono da intendersi risolti se la valle che separa i due massimi di picco ha un valore massimo del 10% rispetto all'intensità dei picchi. Questa condizione è soddisfatta se la larghezza del picco, posto a  $m/z$  minore, all'altezza del 5% è (maggiore o) uguale alla differenza di massa dei due ioni la cui  $m/z$  è rappresentata dai due picchi consecutivi. Il valore di 10% della definizione si ottiene poiché ogni picco contribuisce per il 5% al valore dell'ordinata che corrisponde all'ascissa  $m/z$  di intersezione tra i due picchi ( $5\%+5\% = 10\%$ ).

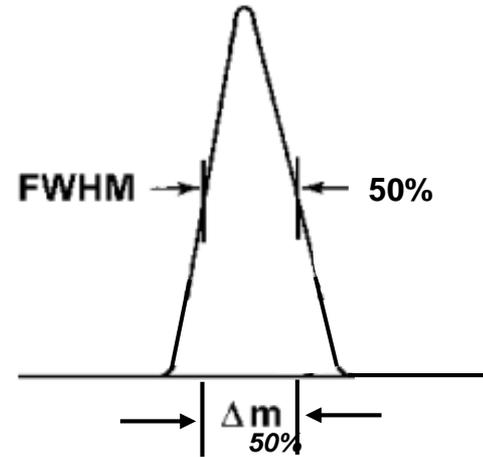


segue →

**b)  $R_{FWHM}$  o ampiezza di picco a mezza altezza (Full Width Half Maximum):**

Il potere risolvete può anche essere determinato su un picco isolato. Il potere risolvete a mezza altezza (cioè al 50%) è uguale a:

$$R_{FWHM} = \frac{m/z}{(\Delta m/z)_{50\%}}$$

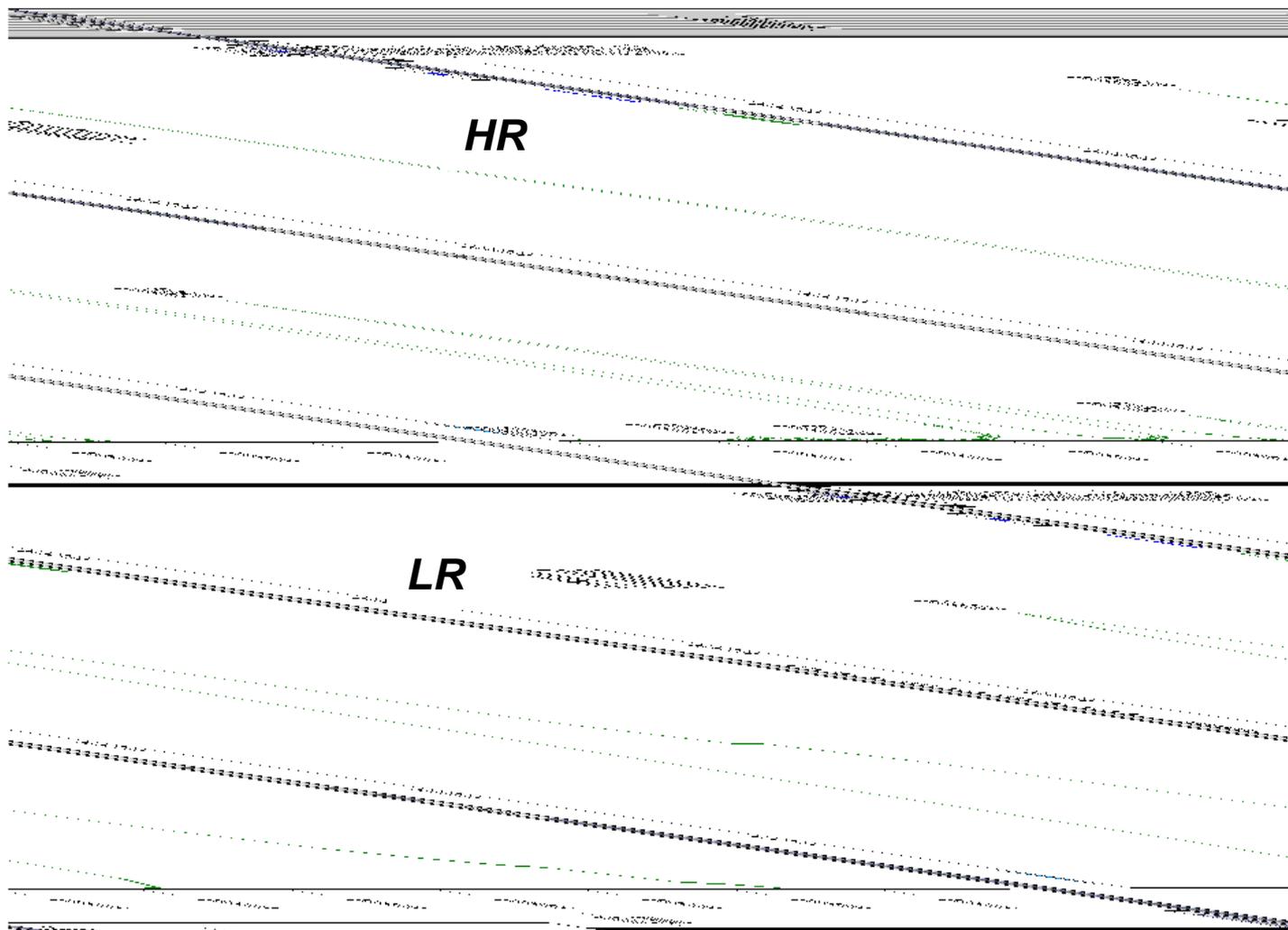


Per picchi di forma gaussiana la relazione tra le due definizioni di risoluzione è:

$$R_{FWHM} \sim 1.8 \cdot R_{10\%}$$

segue →

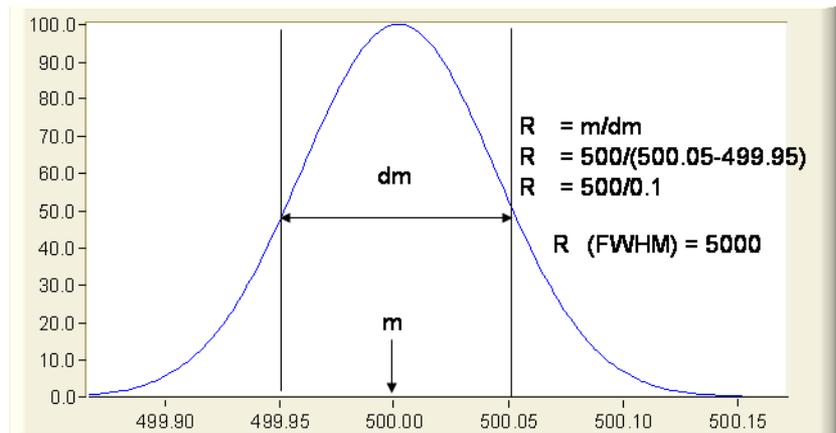
In genere si attribuisce la categoria di "**bassa risoluzione**" (**LR** – low resolution) a strumenti con  $R = 500-2000$  e "**alta risoluzione**" (**HR** – high resolution) a strumenti con  $R > 5000$



# Risoluzione (Resolution) FWHM

<https://goldbook.iupac.org/terms/view/R05318>

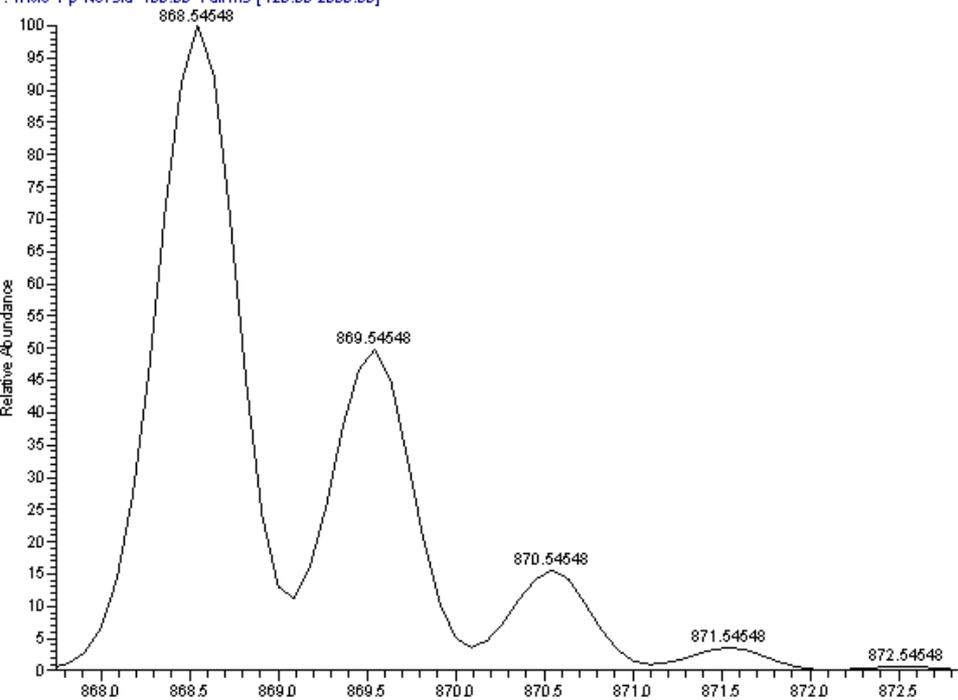
<https://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/seven-golden-rules/mass-resolution>



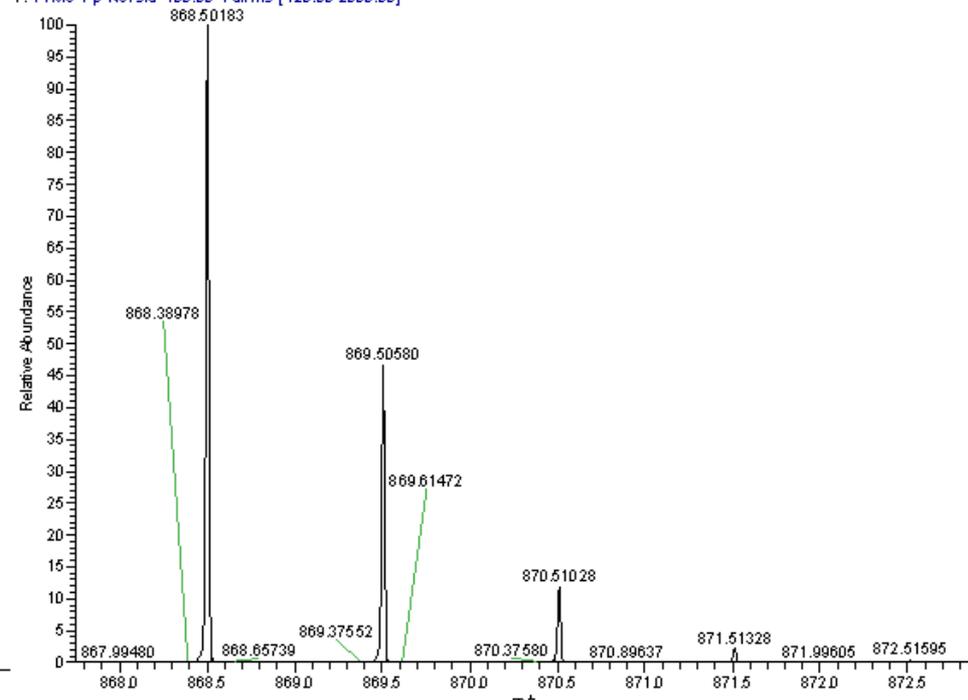
Type	Resolution_ (FWHM)
FT-ICR-MS	1,000,000
FT-Orbitrap	100,000
High-Res-TOF	60,000
TOF	10,000
Quadrupole / IonTrap in UltraZoom mode	10,000
Quadrupole / Iontrap	1,000

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

5-3-solanin-LTQ-pos-100v#31-258 RT: 0.10-0.87 AV: 228 NL: 2.11E4  
: ITMS + p NSI sid=100.00 Full ms [120.00-2000.00]



25-3-solanin-LTQFT-pos-100v#5-49 RT: 0.08-0.89 AV: 46 NL: 4.74E5  
T: FTMS + p NSI sid=100.00 Full ms [120.00-2000.00]



**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  $\pm 0.1$  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

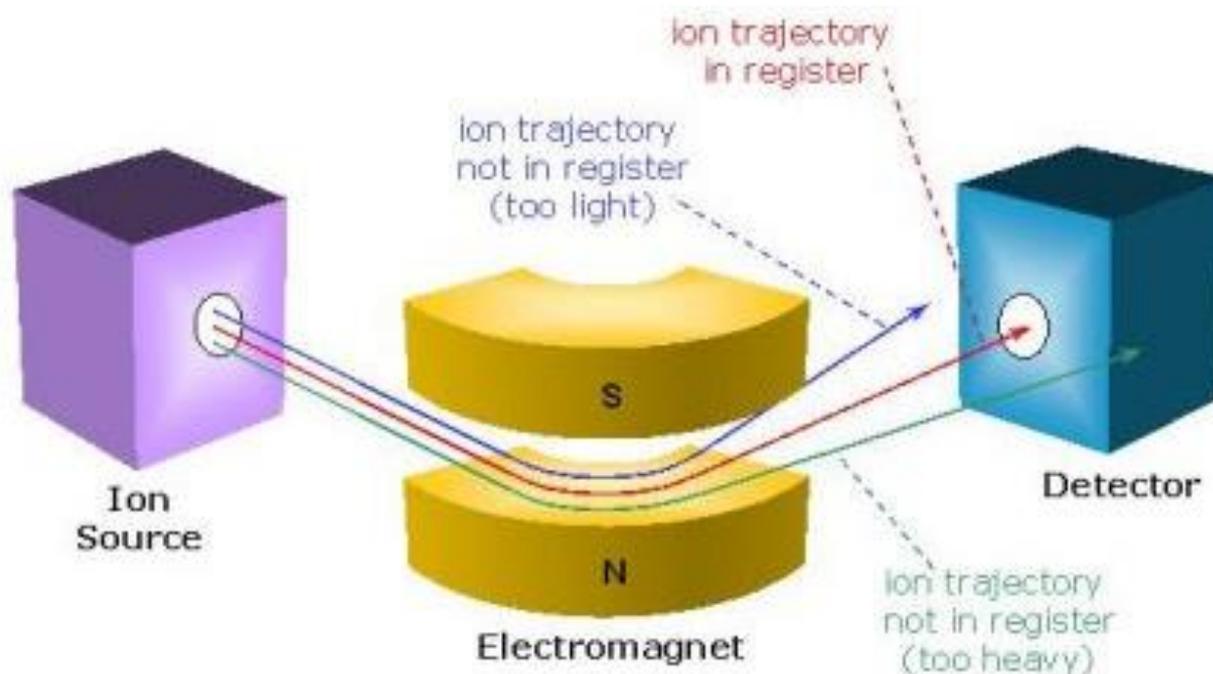
$$\frac{(\text{accurate mass} - \text{exact mass})}{(\text{exact mass})} \times 10^6$$

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 (resolving power) ovvero il più piccolo  $\Delta m/z$  che l'analizzatore riesce a discriminare (<https://goldbook.iupac.org/terms/view/R05321>).***

## 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:

$$F_L = qvB$$

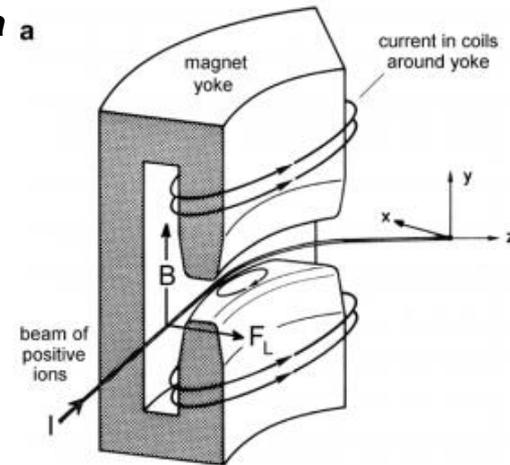
Questa espressione è valida se la velocità ( $v$ ) e il campo magnetico ( $B$ ) sono perpendicolari tra di loro.

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 descritta come  $F_L$  e 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:

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



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 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:

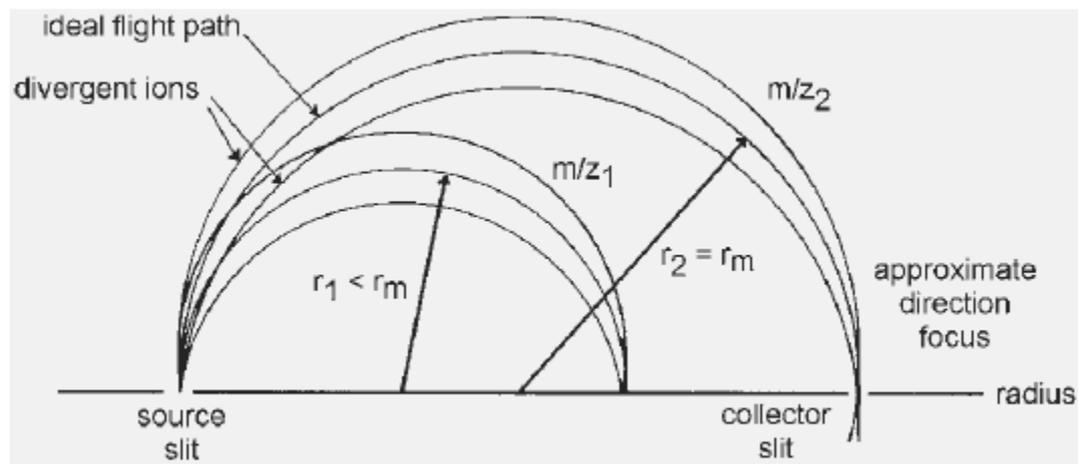
$$\frac{m_i}{q} = \frac{r_m B}{\sqrt{\frac{2qU}{m_i}}} \Rightarrow \frac{m_i}{q} = \frac{r_m^2 B^2}{2U}$$

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  $180^\circ$ .



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

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

**Ioni con differente  $m/z$  viaggiano lungo un'orbita 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  $180^\circ$  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/fa arrivare al detector uno ione di  $m/z = 500$  e energia di  $3000\text{eV}$ , farà passare allo stesso modo anche uno ione di  $m/z = 501$  con energia  $= 2994\text{eV}$  o  $m/z = 499$  con energia  $3006\text{eV}$ .

**Questo è il motivo per cui per ottenere una alta risoluzione la distribuzione di energie cinetiche degli ioni caratterizzati da  $m/z$  deve stare in un intervallo molto stretto.**

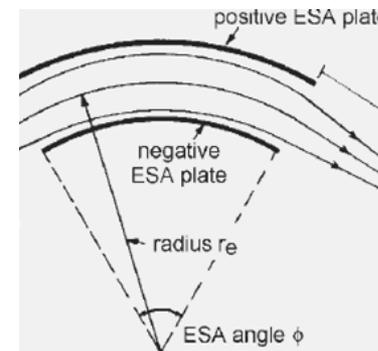
**Questa necessità ha portato alla progettazione di strumenti a DOPPIA FOCALIZZAZIONE.**

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 ( $\Phi$ ). 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.

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

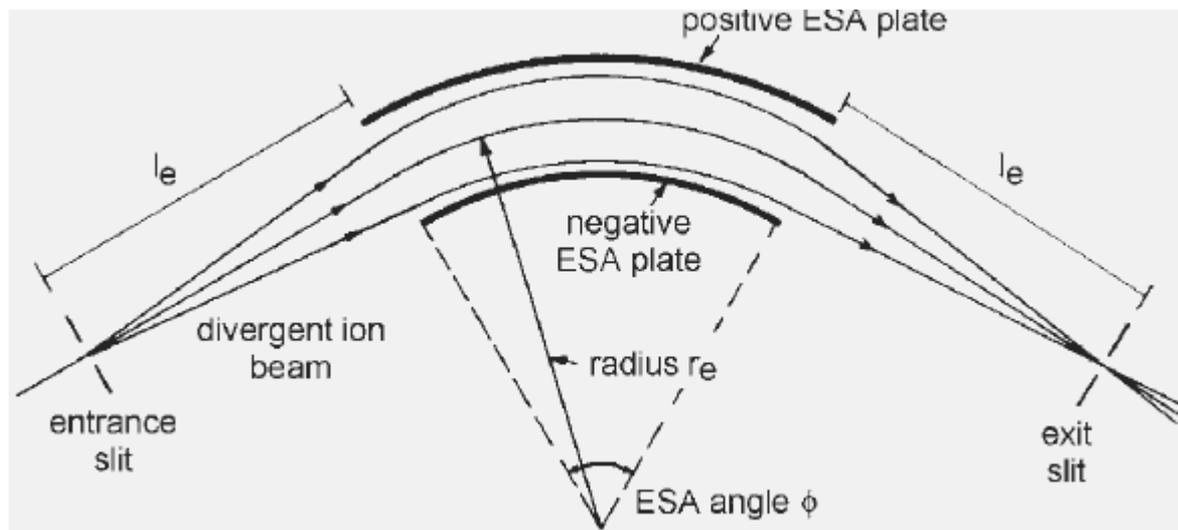
segue →

*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  $l_e$ .***

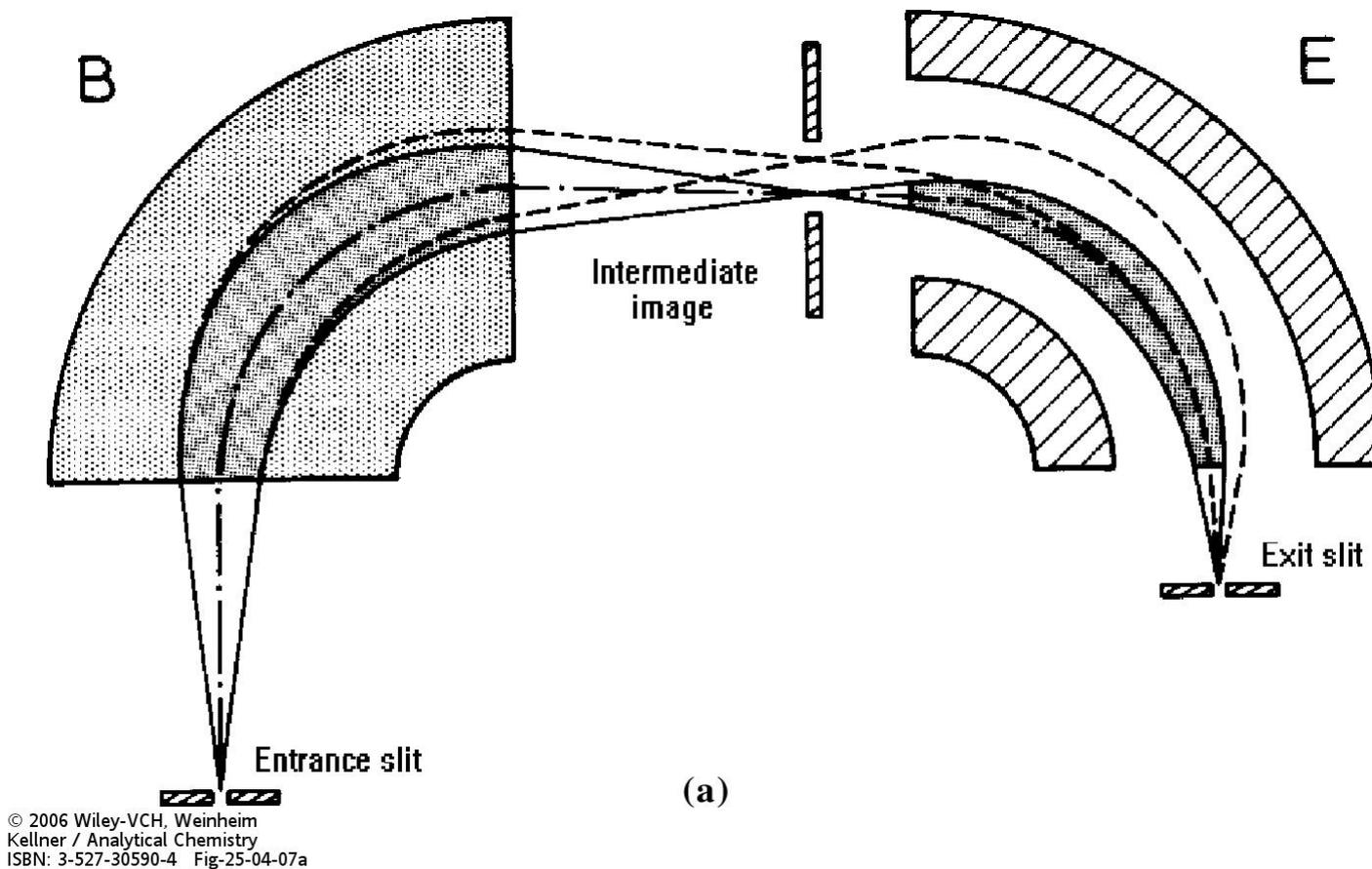
*Allo stesso modo, **uno ione che si avvicina all'inner plate** viene accelerato dalla forza attrattiva.*

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

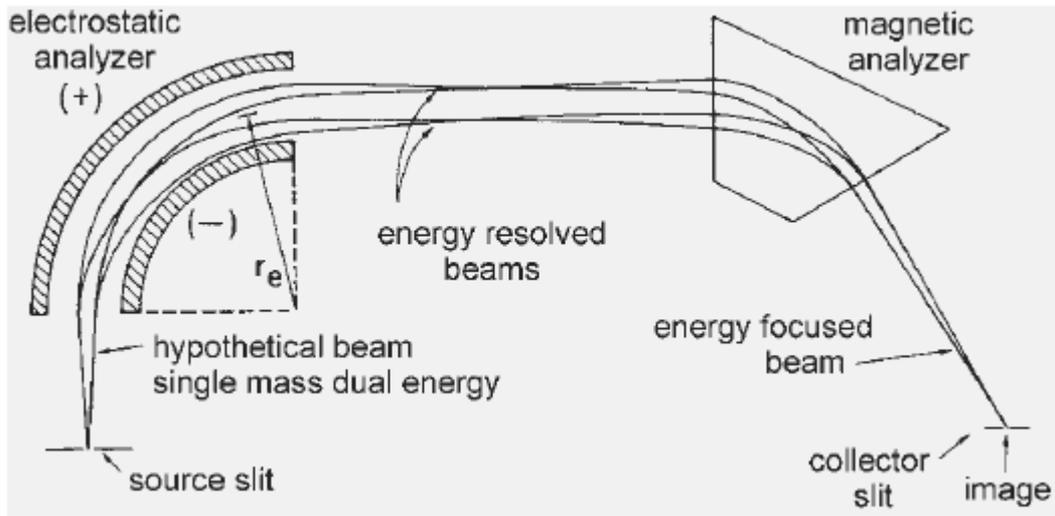


segue →

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

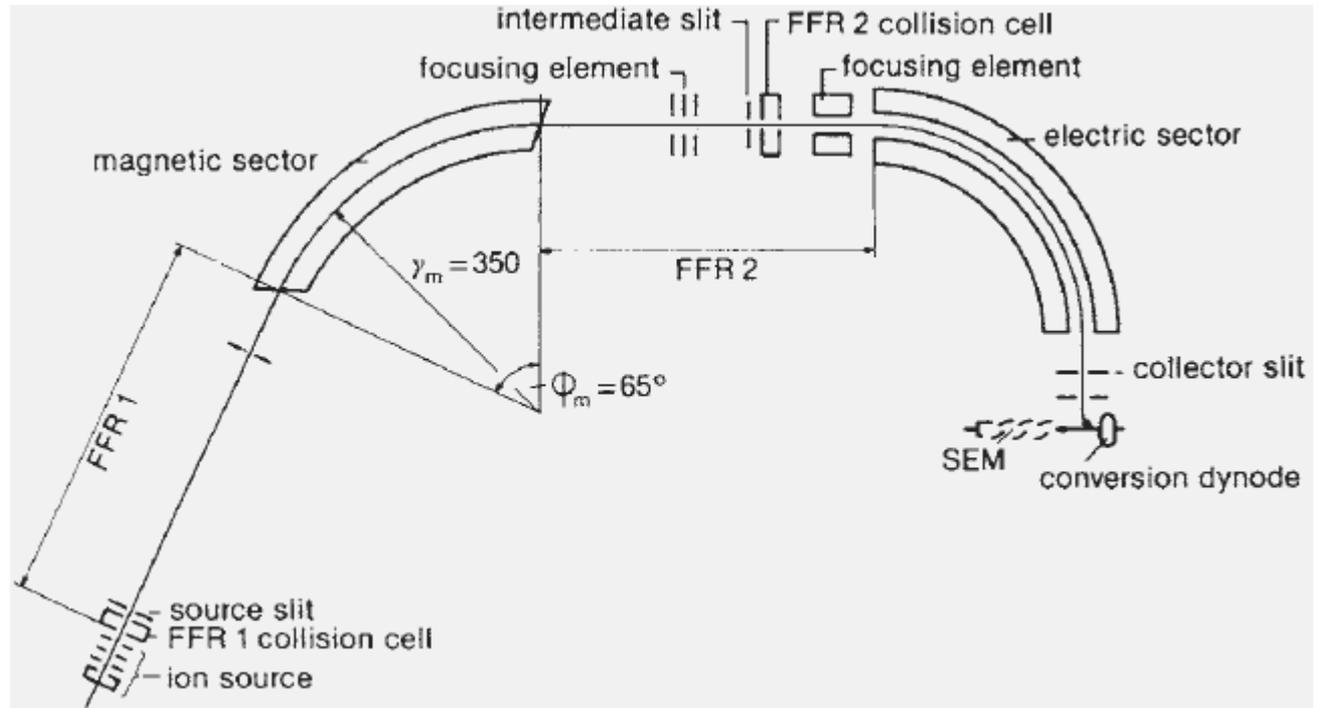


segue →



Configurazione diretta EB  
**R>10000**

Configurazione  
 Inversa BE  
**R>70000**



segue →

## **IN CONCLUSIONE:**

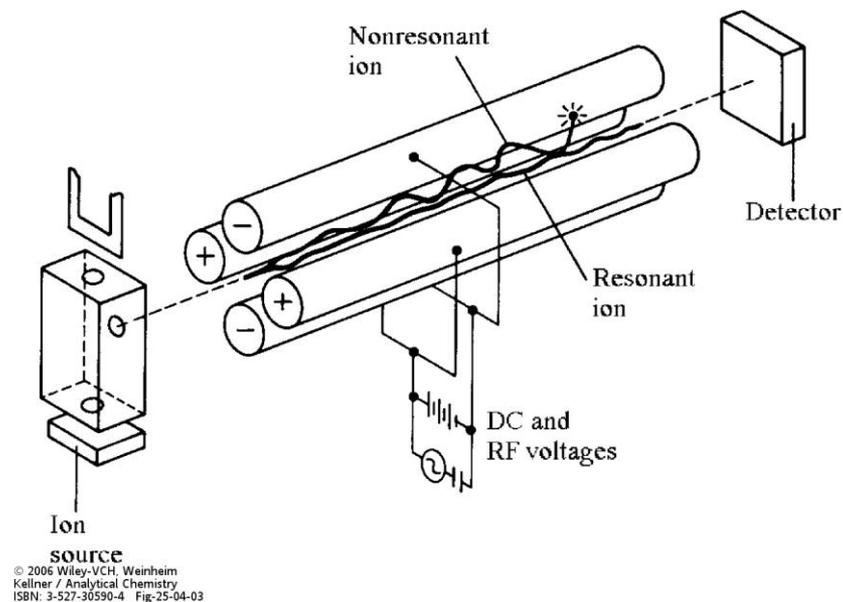
*La separazione di ioni con diverso rapporto  $m/z$  si può conseguire con:*

- ❖ 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.*

# L'analizzatore a quadrupolo

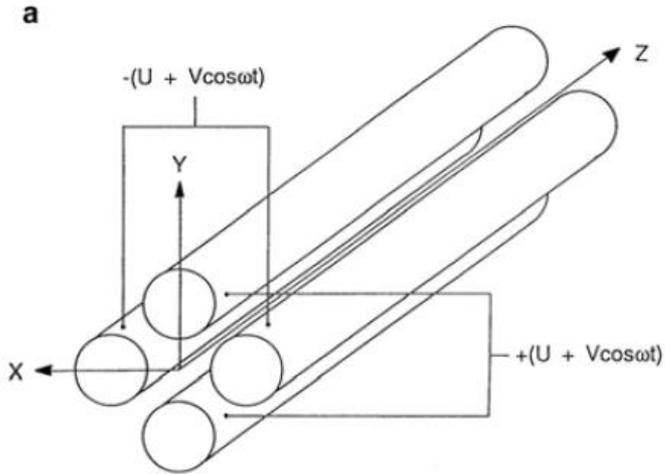
Ioni generati dalla sorgente ionica sono estratti elettrostaticamente e introdotti in un analizzatore di massa (filtro) a quadrupolo.

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

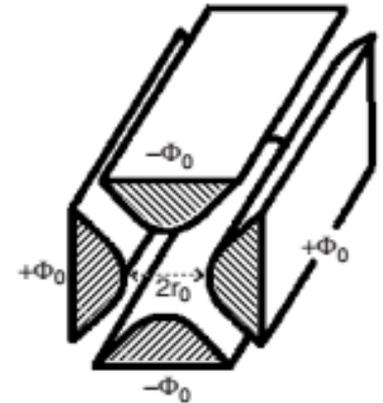


segue →

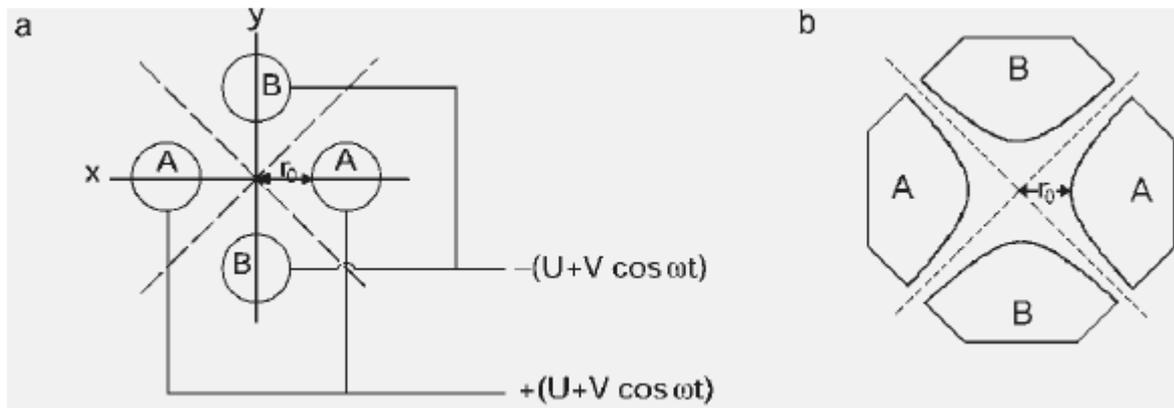
Un quadrupolo lineare consiste in quattro barre (elettrodi) a forma cilindrica o iperbolica **che si estendono nella direzione z e sono montate in configurazione perpendicolare (rispetto alle direzioni x e y)**



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  $\omega$  che funge da corrente alternata (AC), **il potenziale totale  $\Phi_0$**  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:

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

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

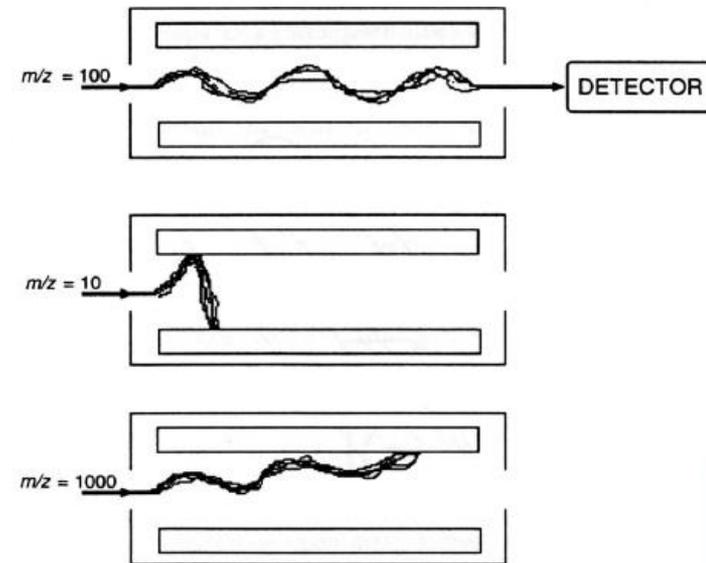
In cui i parametri  $a$  e  $q$  sono:

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

**Per una data combinazione di  $U$ ,  $V$  e  $\omega$  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  $U/V$ .



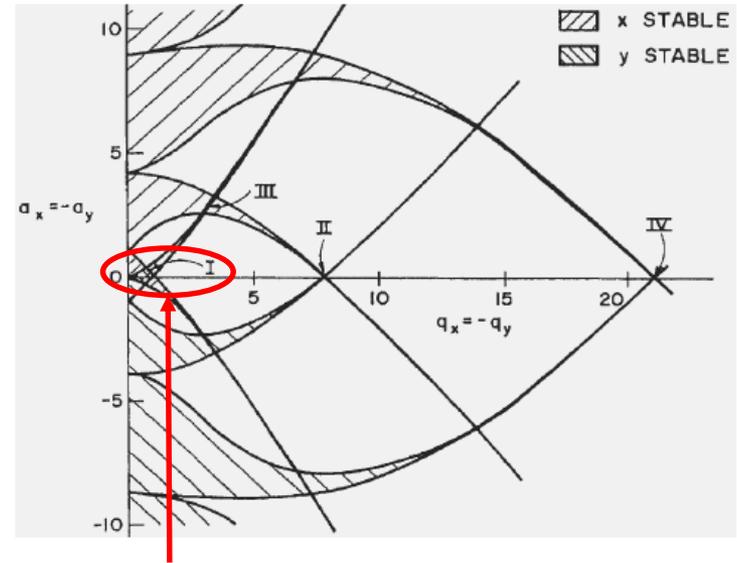
segue →

[http://it.wikipedia.org/wiki/Funzioni\\_di\\_Mathieu](http://it.wikipedia.org/wiki/Funzioni_di_Mathieu)

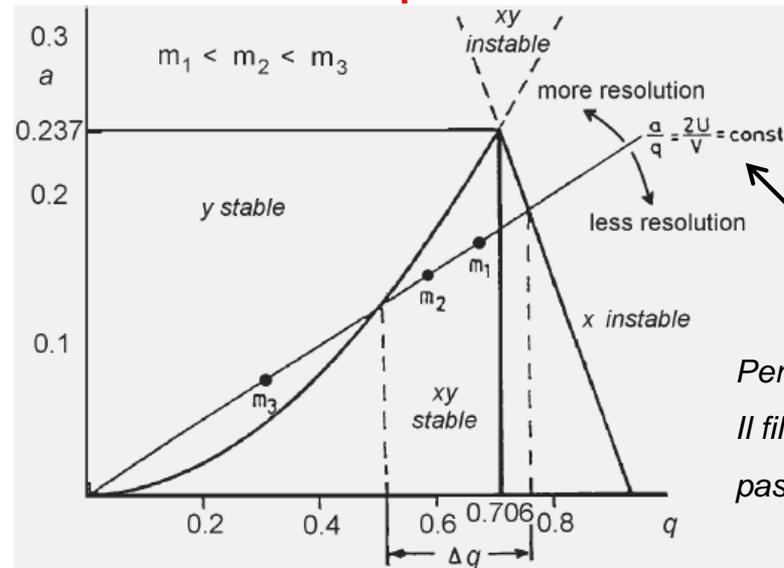
Riportando in grafico il parametro  $a$  (in ordinata, campo che non varia nel tempo) contro  $q$  (in ascissa, campo che varia nel tempo) si ottiene il **diagramma di stabilità di un campo quadrupolare a due dimensioni**.

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  $m_2$

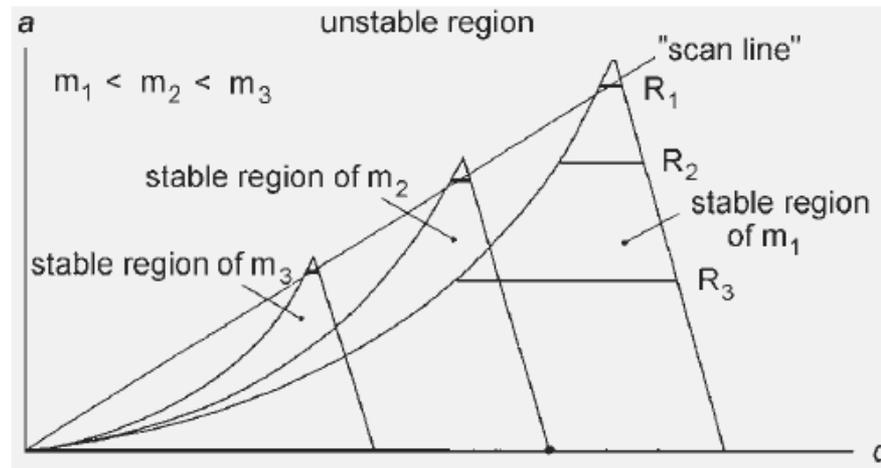
segue →

**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  $\Delta q$  della regione di stabilità determina la risoluzione.



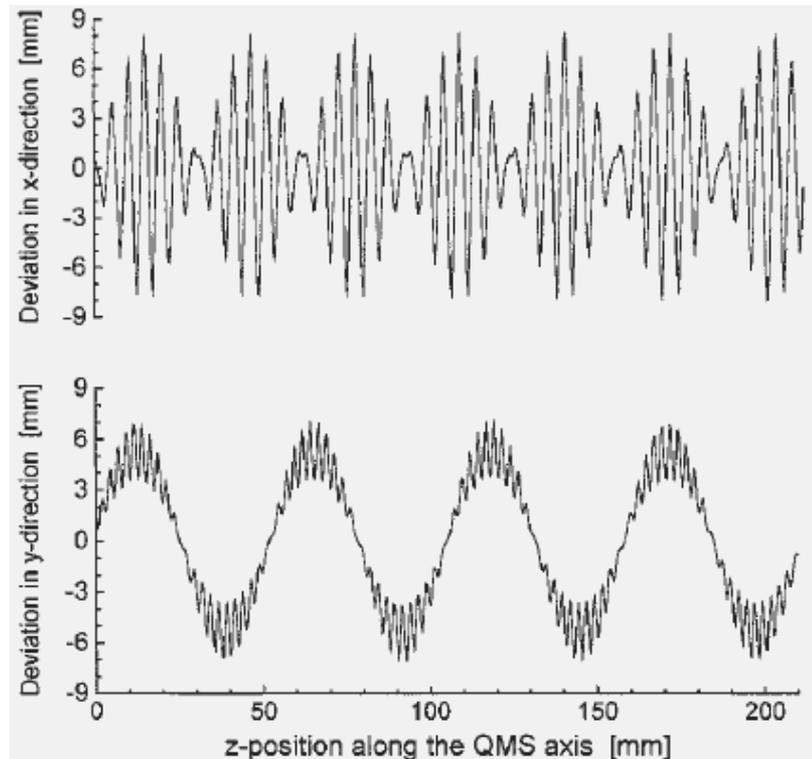
Variando la grandezza di  $U$  e  $V$  a rapporto costante  $U/V$ , si ottiene una scansione a  $U/V = \text{cost}$ , consentendo a ioni con crescente  $m/z$  di attraversare il quadrupolo.

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 risolvete. 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

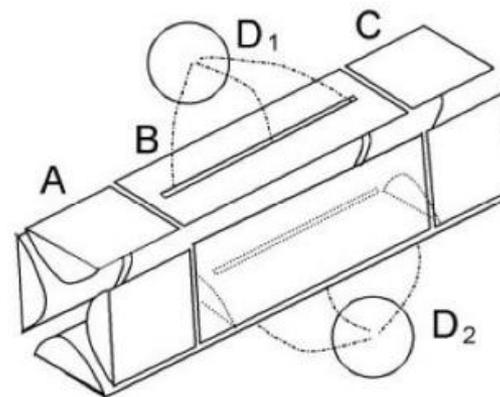
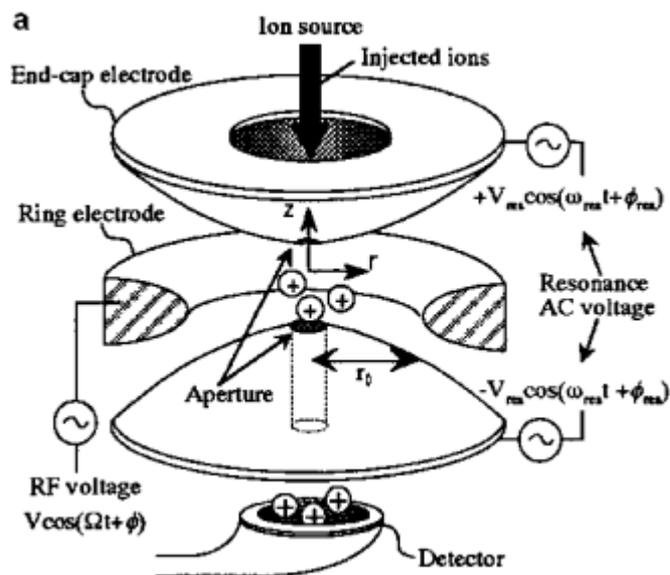
<https://www.youtube.com/watch?v=qxPb9vFWdgo> !!!

# 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.

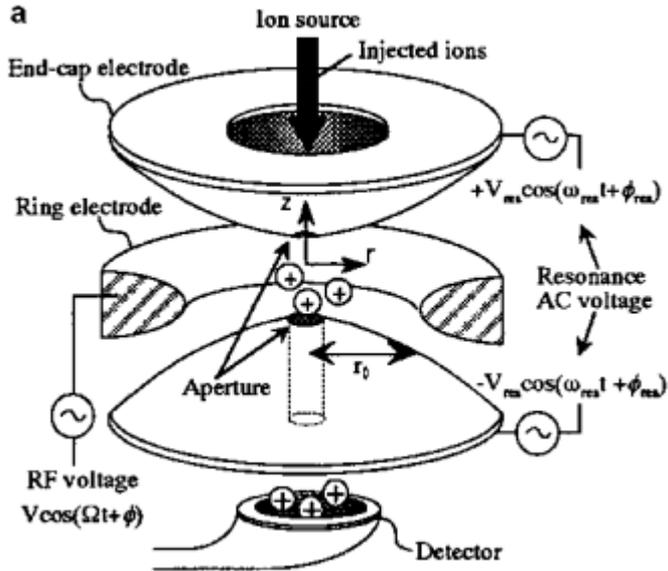
Le trappole in **3D** vengono dette **trappole ioniche quadrupolari** (**QIT** – Quadrupole Ion Trap)

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



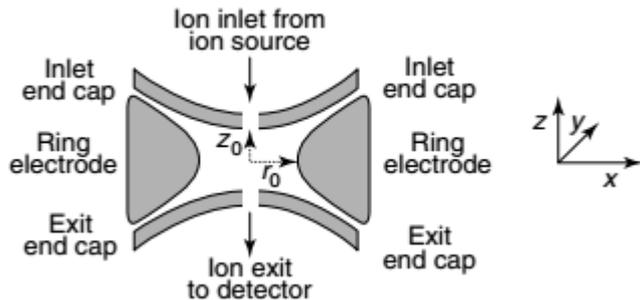
# Trappole ioniche quadrupolari (QIT)

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.*

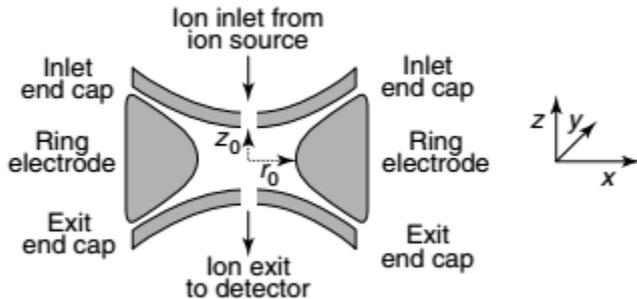
*Quindi una sezione di QIT attraverso il piano rz ricorda la sezione del quadrupolo con barre iperboliche.*



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

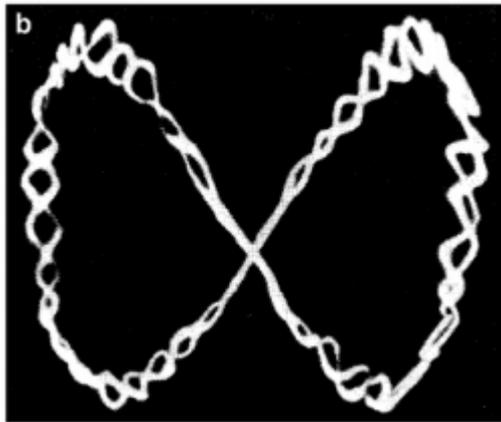
segue →

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.

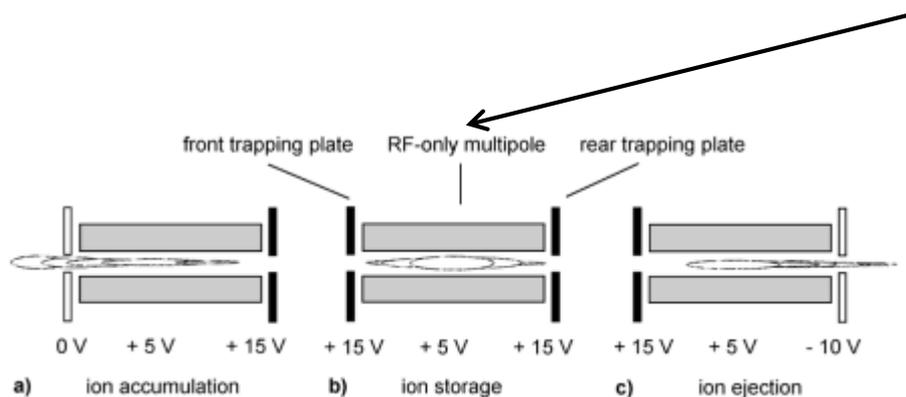
Il QIT è considerato tridimensionale perché il campo elettrico che viene generato all'interno deve essere considerato tridimensionale

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.

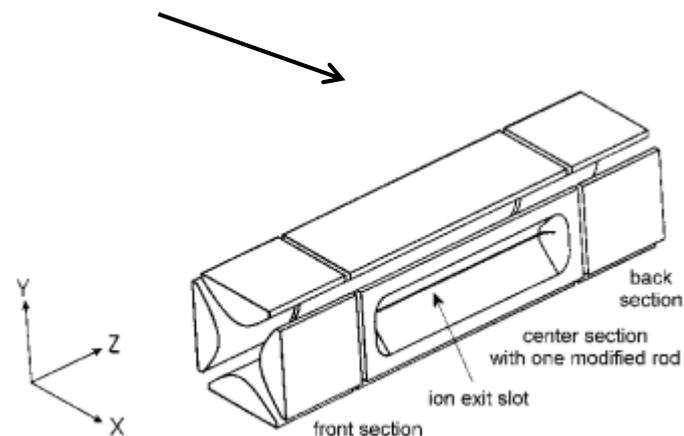
## Trappole ioniche lineari (LIT)

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](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 ( $m_i$ ) è uguale ad un numero intero ( $z$ ) di cariche elettroniche ( $e$ ), quindi  $q = ez$ . L'energia  $E_{el}$  acquisita dallo ione che si muove attraverso un voltaggio  $U$  è data da:

$$E_{el} = qU = ezU$$

L'energia potenziale di una particella carica in un campo elettrico viene convertita in energia cinetica  $E_{kin}$ , cioè in moto traslatorio

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

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

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

cioè la velocità dello ione ( $v$ ) è inversamente proporzionale alla radice quadrata della massa dello ione ( $m_i$ ). Uno ione a  $m/z$  sconosciuto, dopo essere stato accelerato da un voltaggio  $U$ , percorre una determinata distanza ( $s$ ) in un tempo ( $t$ ) dato da:

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

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

segue →

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  $m/z$ :

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

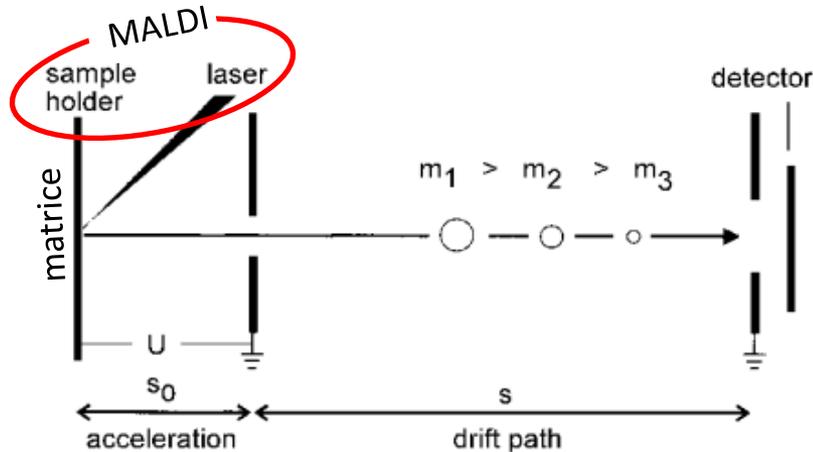
pertanto, l'intervallo di tempo  $\Delta t$  tra i tempi di arrivo di ioni a diverso  $m/z$  è proporzionale a  $s \cdot (m/z_1^{1/2} - m/z_2^{1/2})$ .

La proporzionalità tra tempo di volo e la radice quadrata di  $m/z$  fa sì che il  $\Delta t$  per una data  $\Delta m/z$  diminuisca all'aumentare del valore di  $m/z$ : alle medesime condizioni, un  $\Delta t$  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%.



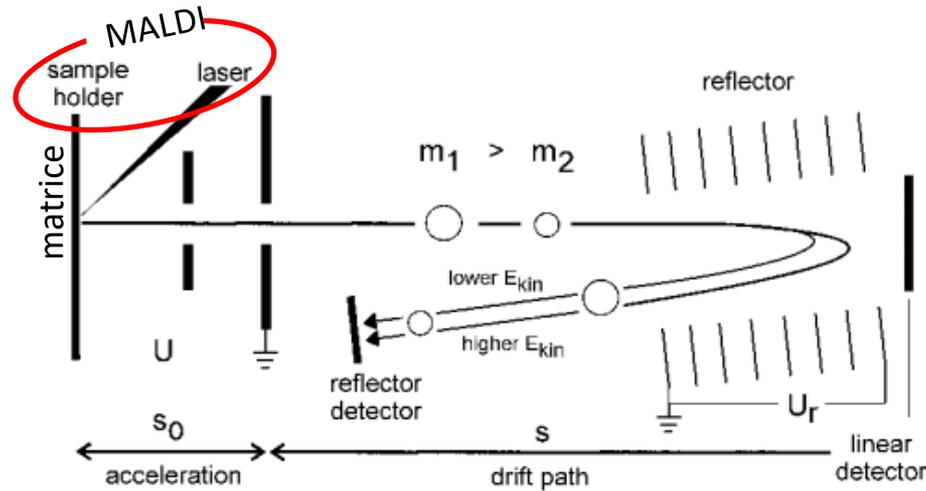
### Limiti del LTOF:

- essendo che ad alte  $m/z$  una differenza  $\Delta m/z = 1$  u comporta una variazione di tempo di volo  $\Delta t$  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  $\Delta t$  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.

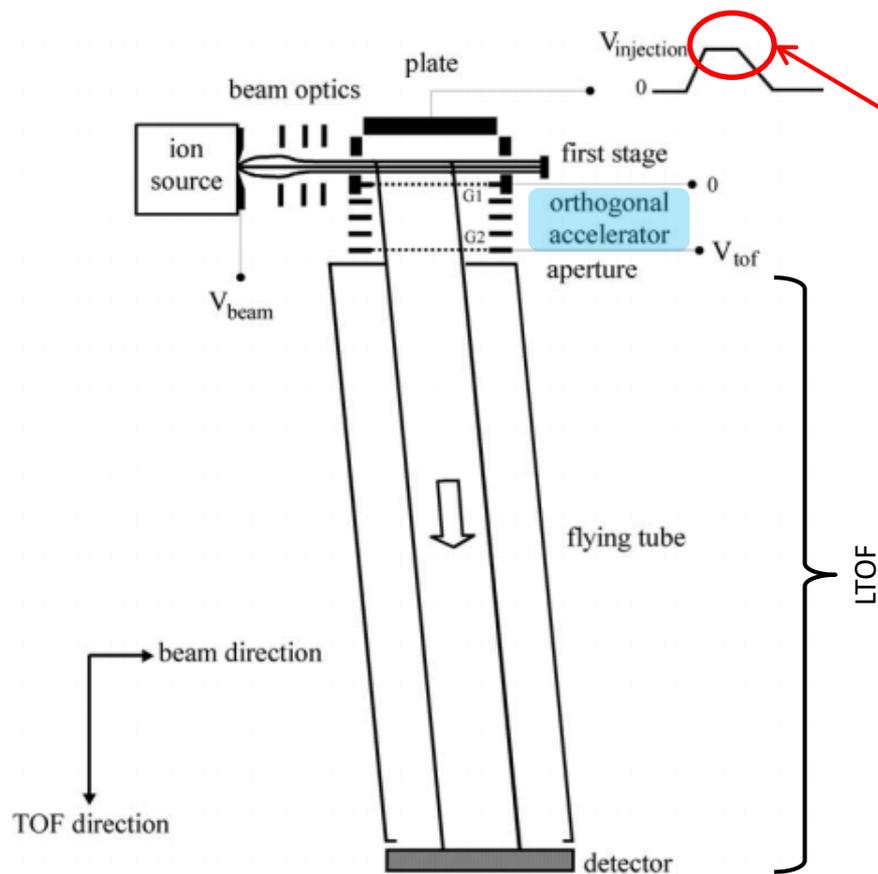
Il riflettore è capace di riallineare (nel tempo) ioni con stesso  $m/z$  ma diversa energia cinetica  $E_{kin}$ . Gli ioni con  $E_{kin}$  più alta penetreranno all'interno del riflettore più a fondo rispetto a ioni con  $E_{kin}$  minore, con il risultato che poi tutti gli ioni con stesso  $m/z$  usciranno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



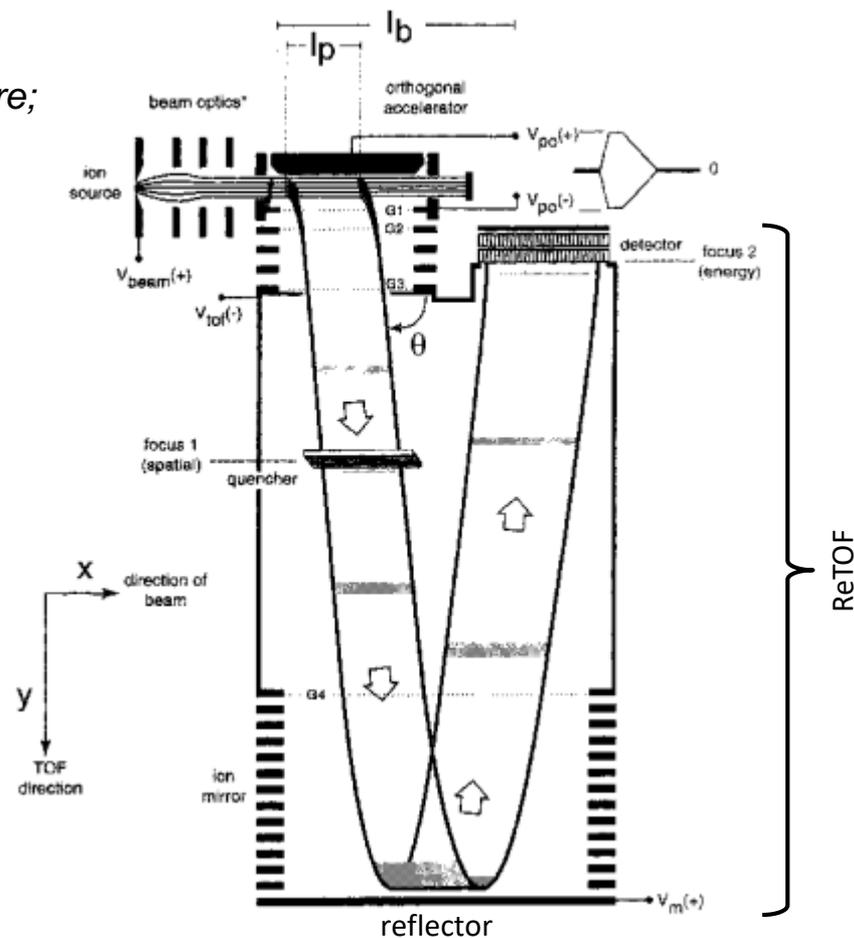
- i) Gli ioni focalizzati in uscita dallo ionizzatore flussano in modo continuo nello spazio tra il "plate" (inizialmente a voltaggio  $V_{injection} = 0$ ) e la griglia G1.
- ii) Poi viene applicato un potenziale  $V_{injection}$  che genera un campo elettrico tra il "plate" e G1 in direzione perpendicolare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

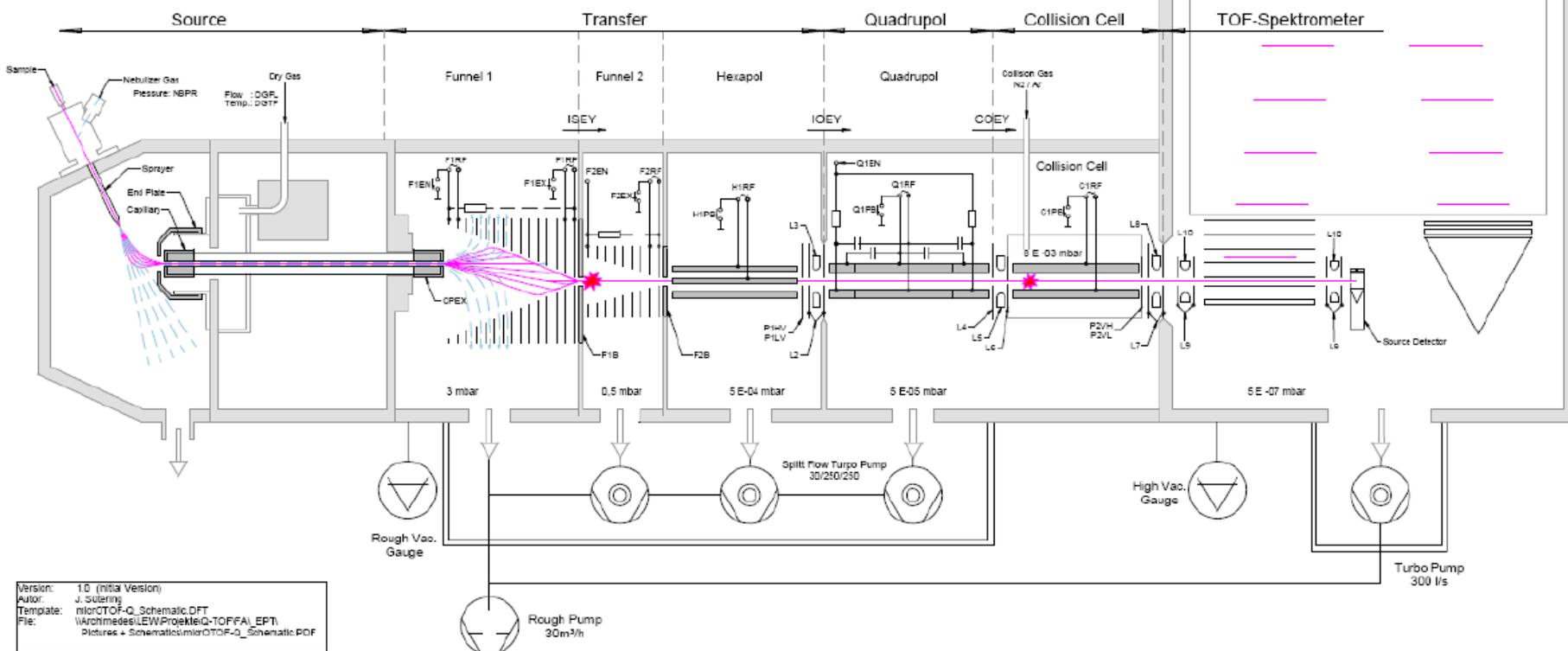


# MicroToF-Q Schematic

Set-Values									Set-Values											
Group	Description GUI	Unit	Min	Max	MPC333-Com.	I/M	P	Plug	Assembly	Group	Description GUI	Unit	Min	Max	MPC333-Com.	I/M	P	Plug	Assembly	
<b>Source</b>									<b>Quadrupole</b>											
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_CAPLU	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.		
<b>Transfer</b>									<b>Collision Cell</b>											
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 Cabell	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 2 Base	V	-300	+300	IFOC:F2B	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\TOFFA\_EPT)  
 Pictures + Schematics\microTOF-Q\_Schematic.PDF

# Vantaggi TOF

## I principali vantaggi di strumenti TOF sono:

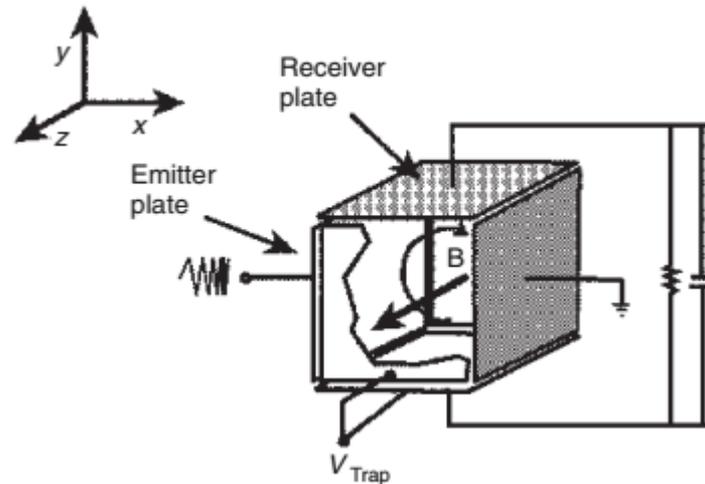
- i. in linea di principio, l'intervallo  $m/z$  è illimitato;
- ii. Da ogni evento ionizzanti, ad esempio, un solo colpo laser MALDI, si ottiene uno spettro di massa completa in qualche decina di microsecondi;
- iii. La trasmissione di un analizzatore TOF è molto alta, dando origine ad alta sensibilità;
- 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  $\Delta t$  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.*

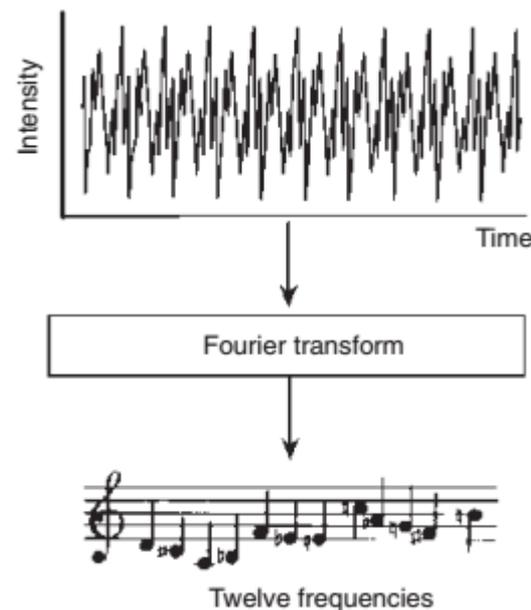
*La relazione tra la frequenza e la massa mostra che in questo caso la determinazione della massa si effettua misurando una frequenza.*

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

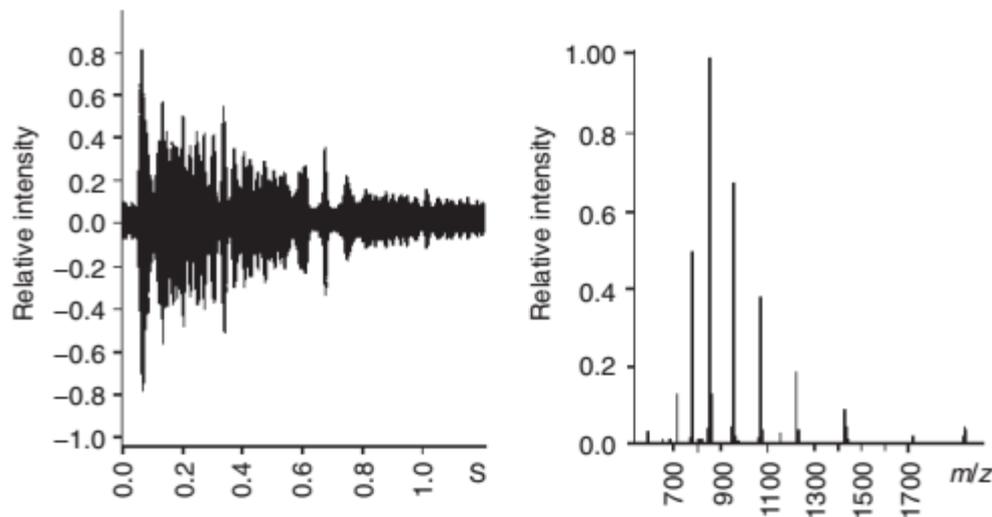
*Il raggio è indipendente da  $m/z$ , invece la frequenza a cui "risuonano" gli ioni nel ciclotrone dipende da  $m/z$ .*

*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:**

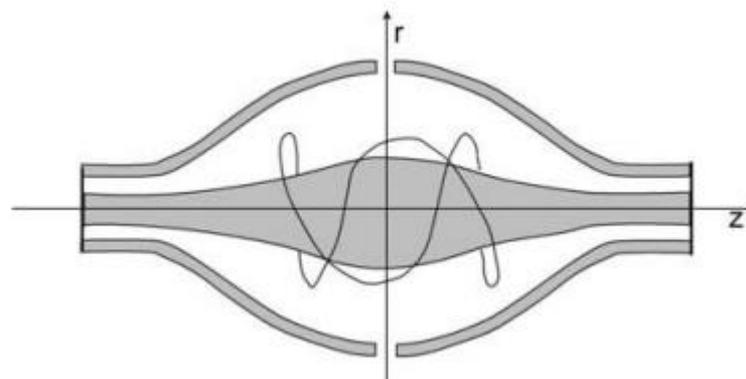
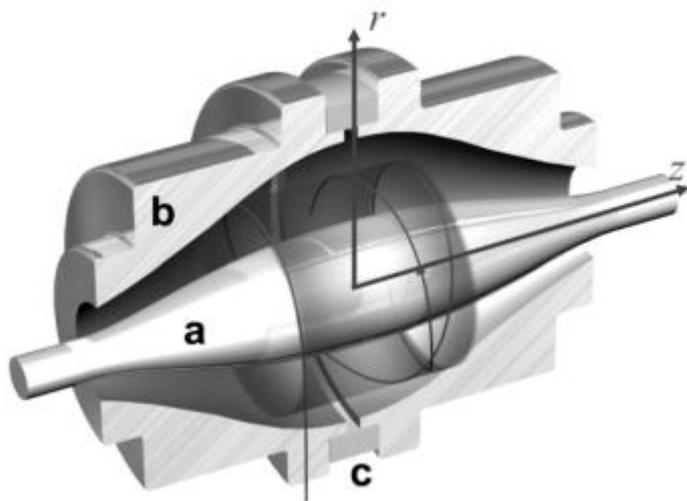
- *necessità di magneti superconduttori per ottenere l'intensità di campo magnetico necessaria (quindi necessità di utilizzo di gas criogenici);*
- *necessità di un alto vuoto perfettamente controllato (per evitare collisioni "indesiderate" degli ioni con molecole presenti che possono defasare la frequenza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

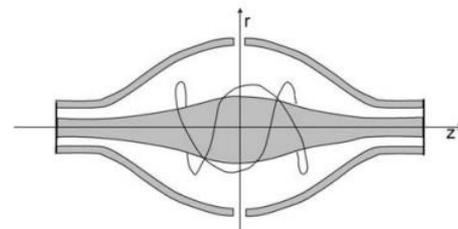


segue →

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

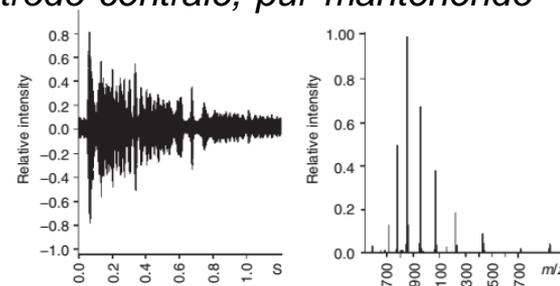
Si può dimostrare che la frequenza di oscillazione assiale è data da:

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



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)

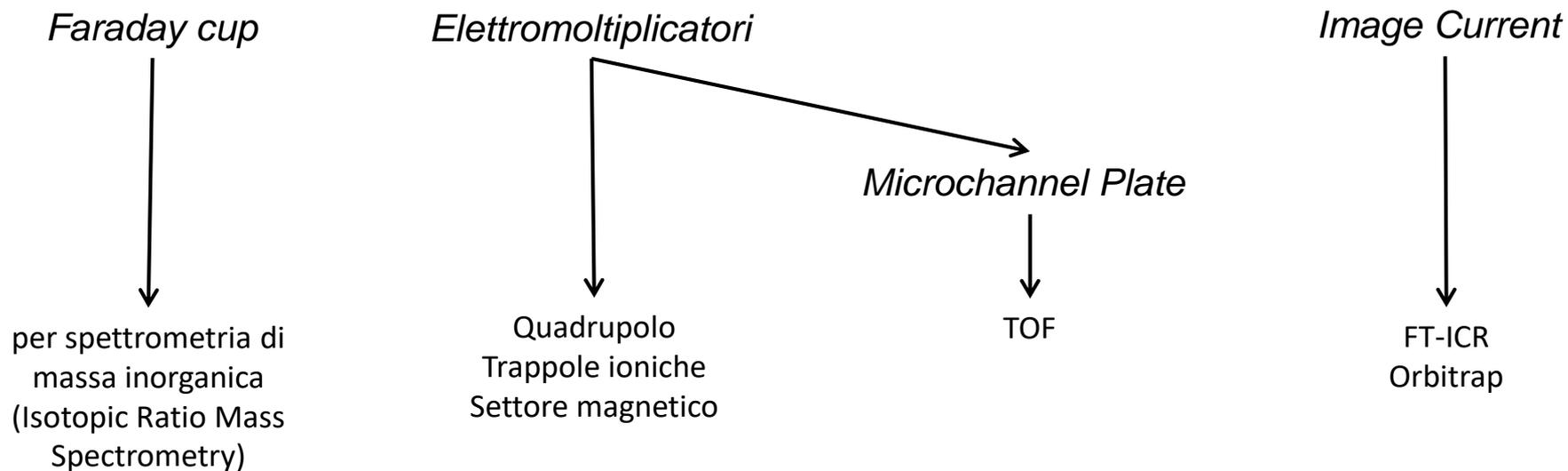
**Table 4.1.** Common mass analyzers

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.*

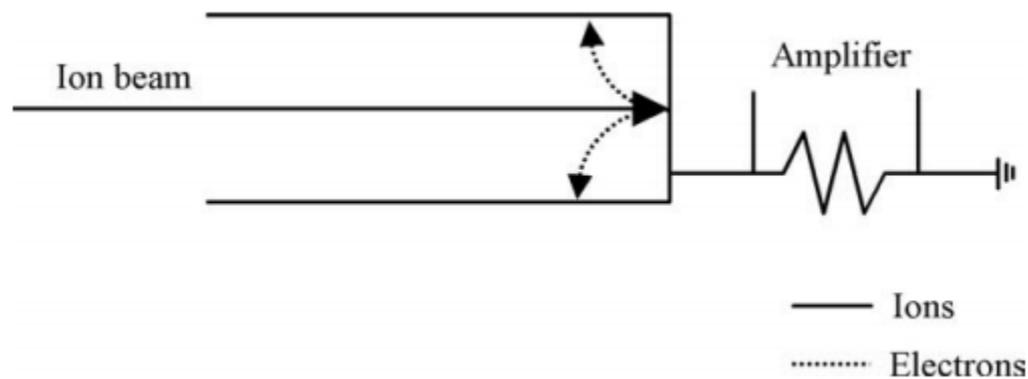
*Esistono diversi tipi di detector, tutti sono basati sulla rivelazione della massa e/o della carica e/o della velocità degli ioni. Il detector, in genere, viene scelto in base alle caratteristiche dell'analizzatore presente nello strumento o comunque in base all'assetto strumentale complessivo. Sotto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



## Faraday cup

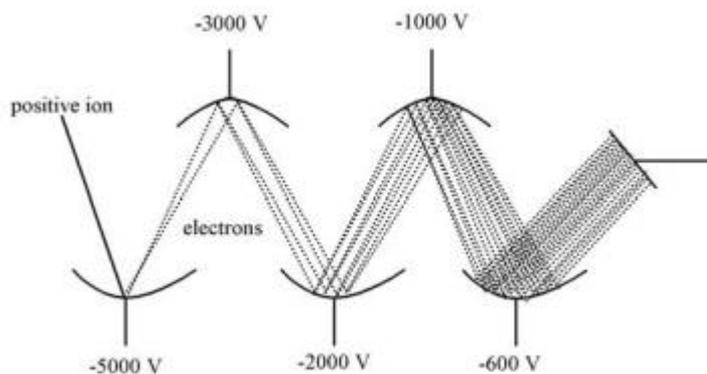
La coppa di Faraday è il primo e più semplice detector applicato agli spettrometri di massa. E' formata da una coppa o un cilindro di metallo con un piccolo orifizio per l'ingresso degli ioni. Gli ioni che entrano nella coppa vengono neutralizzati quando collidono con le pareti donando o acquisendo un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

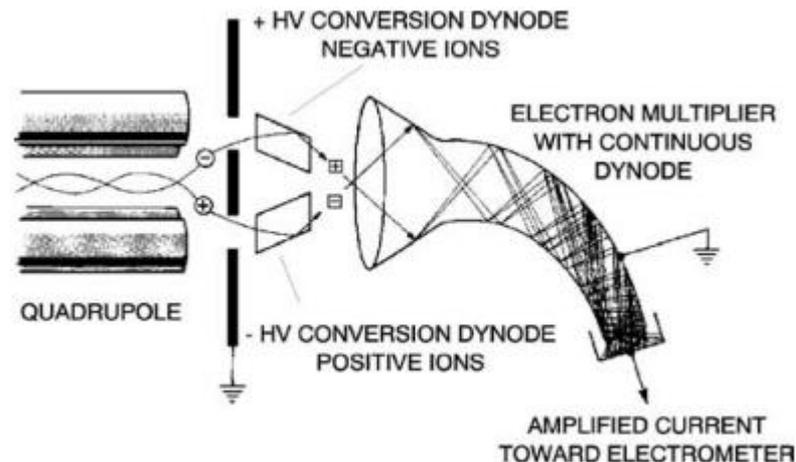


## Elettromoltiplicatori (EM)

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



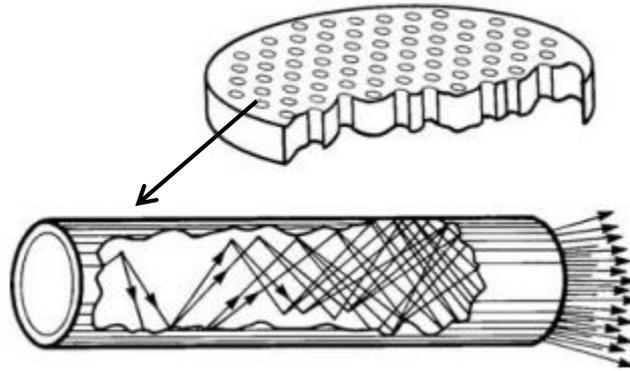
EM a dinodo continuo ricurvo

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  $10^8$ .*

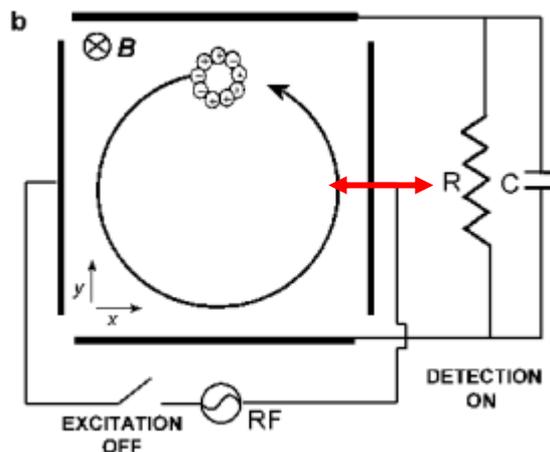


*Questo detector è caratterizzato da una risposta molto veloce poiché il percorso degli elettroni nei canali è molto breve (la lunghezza di ogni microcanale è di pochi millimetri). Quindi è ottimale per essere accoppiato con analizzatori TOF in cui gli ioni arrivano al detector con intervalli temporali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