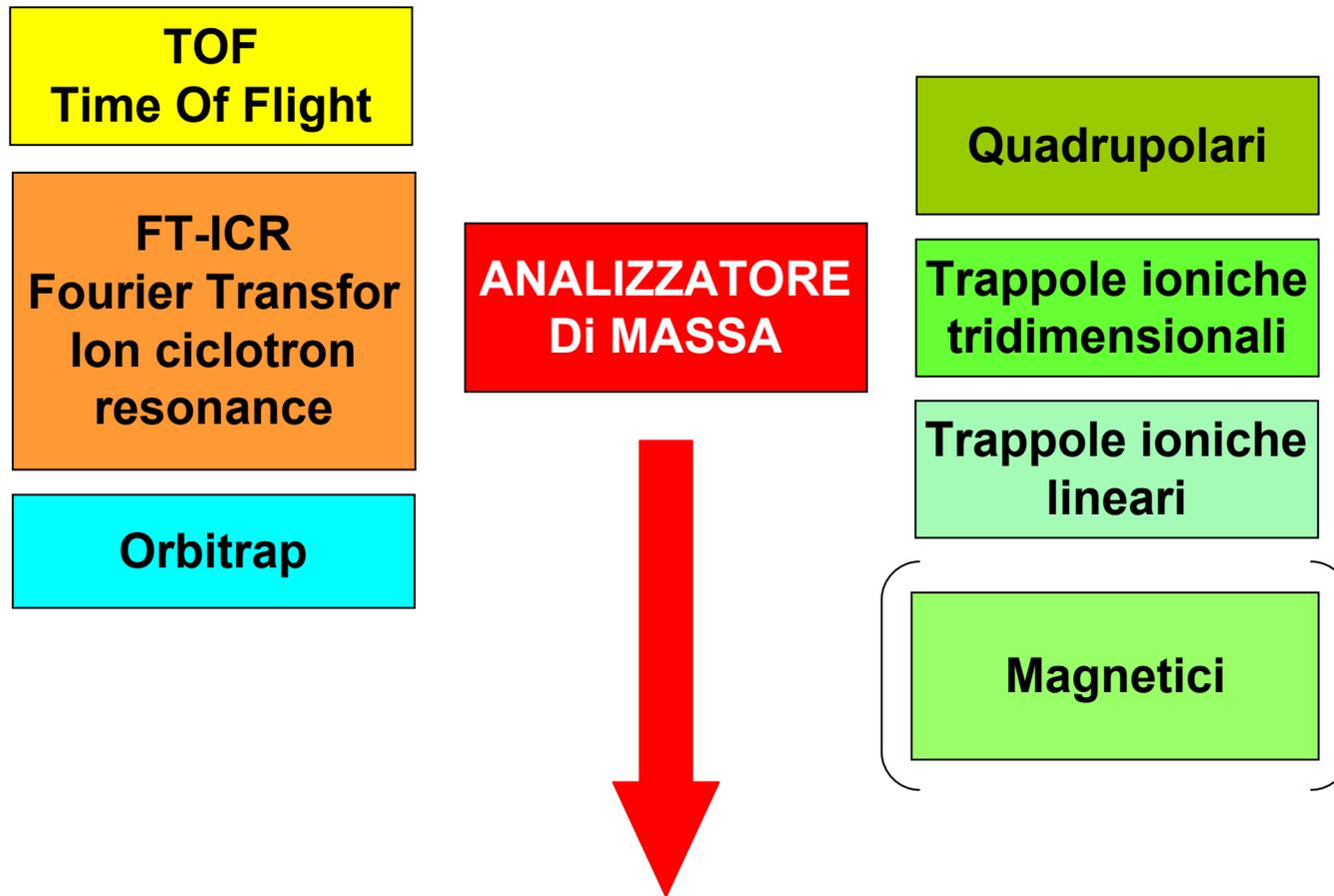


# Analizzatori di Massa



Discriminare molecole in base al loro  
Rapporto massa/carica

**$m/z$**

(NB: informazioni circa il **peso molecolare** ( $m$ ) si possono avere solo ed esclusivamente se si hanno informazioni circa lo **stato di carica** di quella determinata molecola ( $z$ ))

# Analizzatori di Massa

## Analizzatore di massa

Parte dello strumento che è deposta a fornire il valore  $m/z$  dello ione

Basato su campi elettrici (e/o magnetici - poco utilizzati in ambito di analisi delle proteine).

Il fatto di avere un campo elettrico/magnetico comporta nel momento in cui faccio entrare una molecola al suo interno essa che ad essa sia applicata una **forza F**.

$F = ma \Rightarrow a = F/m$  (la molecola subisce un'accelerazione inversamente proporzionale alla sua massa (seconda legge di Newton))

$F = e (E+vxB)$  (legge delle forza di Lorentz) La forza applicata ad una molecola all'interno di un campo elettrico E e/o di un campo magnetico è proporzionale alla sua carica e (z).

$$a = e (E+vxB) / m$$

Da questo si ricava che una molecola sottoposta all'azione di un campo elettrico/magnetico subirà una alterazione della propria traiettoria/moto (accelerazione) che è funzione del proprio rapporto  $m/z$ .



## A Scansione

L'analizzatore funge da filtro selettivo per il passaggio di determinati valori  $m/z$  al detector. In pratica non tutti gli ioni che arrivano all'analizzatore e giungono al detector.

QUADRUPOLI

## Analizzatori



## Simultanei

Gli ioni che vengono indirizzati all'analizzatore vengono tutti inviati al detector e rilevati. La simultaneità si riferisce agli ioni che arrivano all'analizzatore

TOF

TRAPPOLO IONICHE

ORBITRAP

FT-ICR

# Analizzatori di Massa - caratteristiche fondamentali

## **RANGE m/z – Limite superiore di analisi**

Identifica su quale intervallo di m/z posso effettuare le analisi

Limiti superiori di analisi:

Analizzatori **quadrupolari** - **bassi** (ca 3000)

**Trappole ioniche** (tridimensionali e lineari) - **intermedi** (ca 4000-6000)

**Time of Flight** - **elevati** (oltre 100000)

**FT-ICR** - **potenzialmente molto elevati** (strettamente dipendenti dalla configurazione strumentale)

**Orbitrap** - **intermedio** (ca 6000)

## **RISOLUZIONE**

Definita come la capacità di riuscire a distinguere due ioni aventi rapporti m/z diversi. All'aumentare della risoluzione diminuisce la differenza che deve esistere tra due ioni affinché diano due segnali m/z distinti.

Alla risoluzione è strettamente associato un altro parametro che è

### **l'ACCURATEZZA**

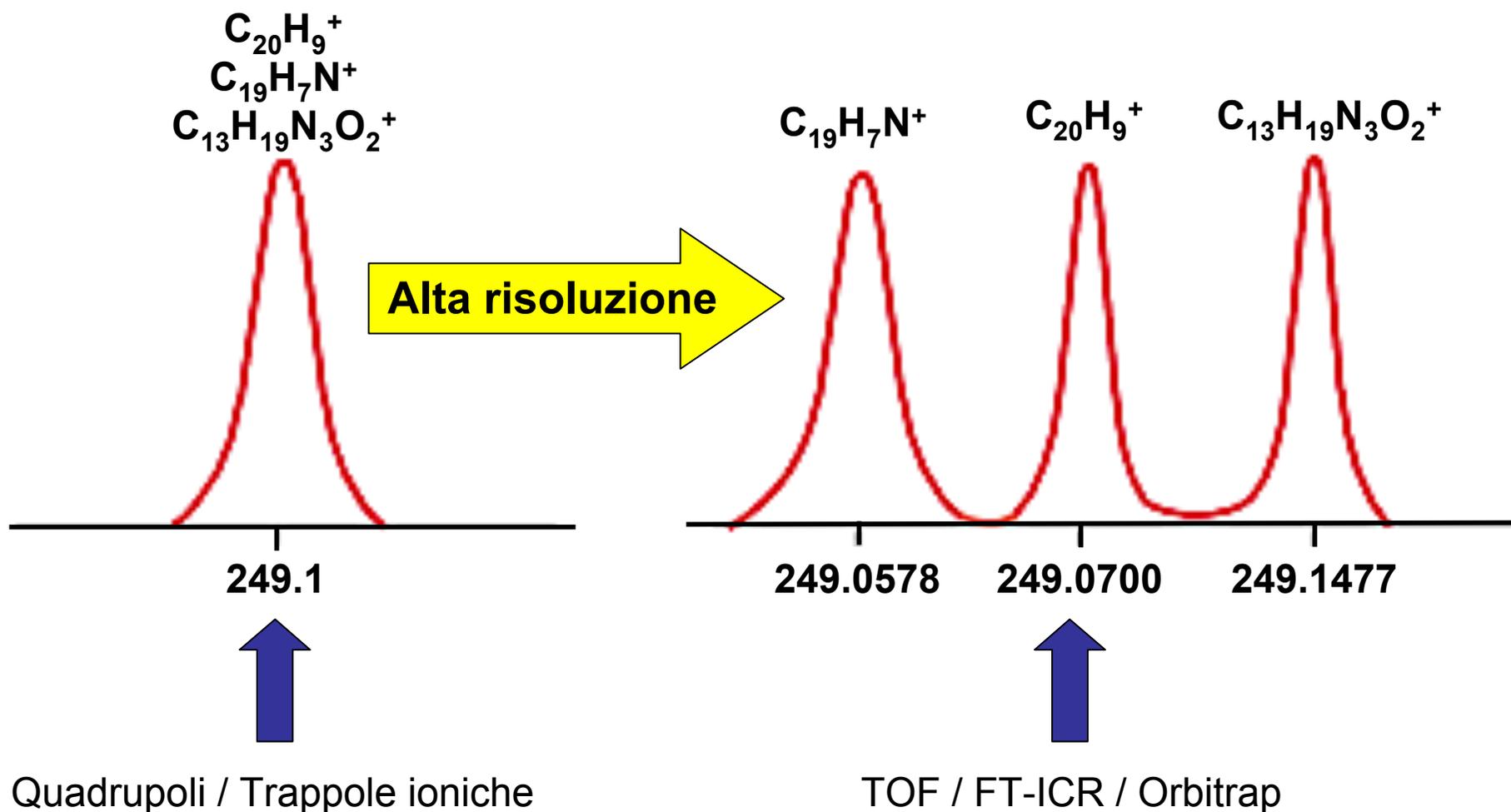
nella misura di massa, ovvero la differenza tra la massa ottenuta sperimentalmente e quella teorica

## **TRASMISSIONE**

Definita come il rapporto tra il numero di ioni generati in sorgente e il numero di ioni che arrivano al rivelatore (efficienza dell'analizzatore nel "passare" gli ioni. Strettamente legato alla sensibilità.

## Analizzatori di Massa - bassa vs. alta risoluzione

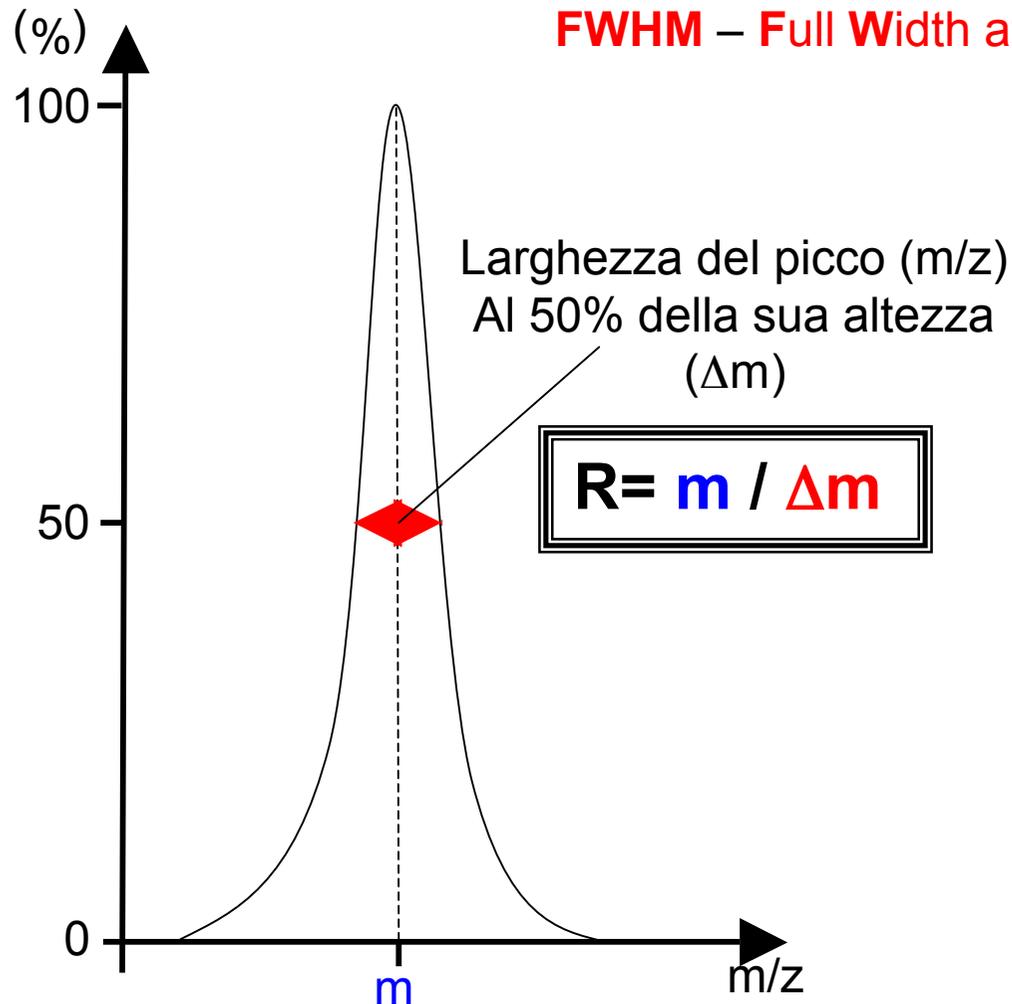
Tre composti **quasi isobarici** sono distinguibili solo con strumenti ad **alta** risoluzione  
Qualora siano opportunamente **calibrati** si può arrivare ad ottenere la **massa esatta**  
dell'analita sotto indagine



# Analizzatori di Massa - risoluzione

Uno dei metodi comunemente utilizzati per calcolare la risoluzione offerta da uno strumento è il metodo che sfrutta la

**FWHM – Full Width at Half Maximum**



TIPICHE risoluzioni ottenibili da:

Quadrupoli – 1000 (HRM: ca 4000)

Trappole – 1000 (HRM: ca 5000)

TOF - 10000

FT-ICR - > 100000

Ipotizzando di andare ad analizzare una molecola con  $m/z = 500$ , la larghezza del suo picco sarebbe:

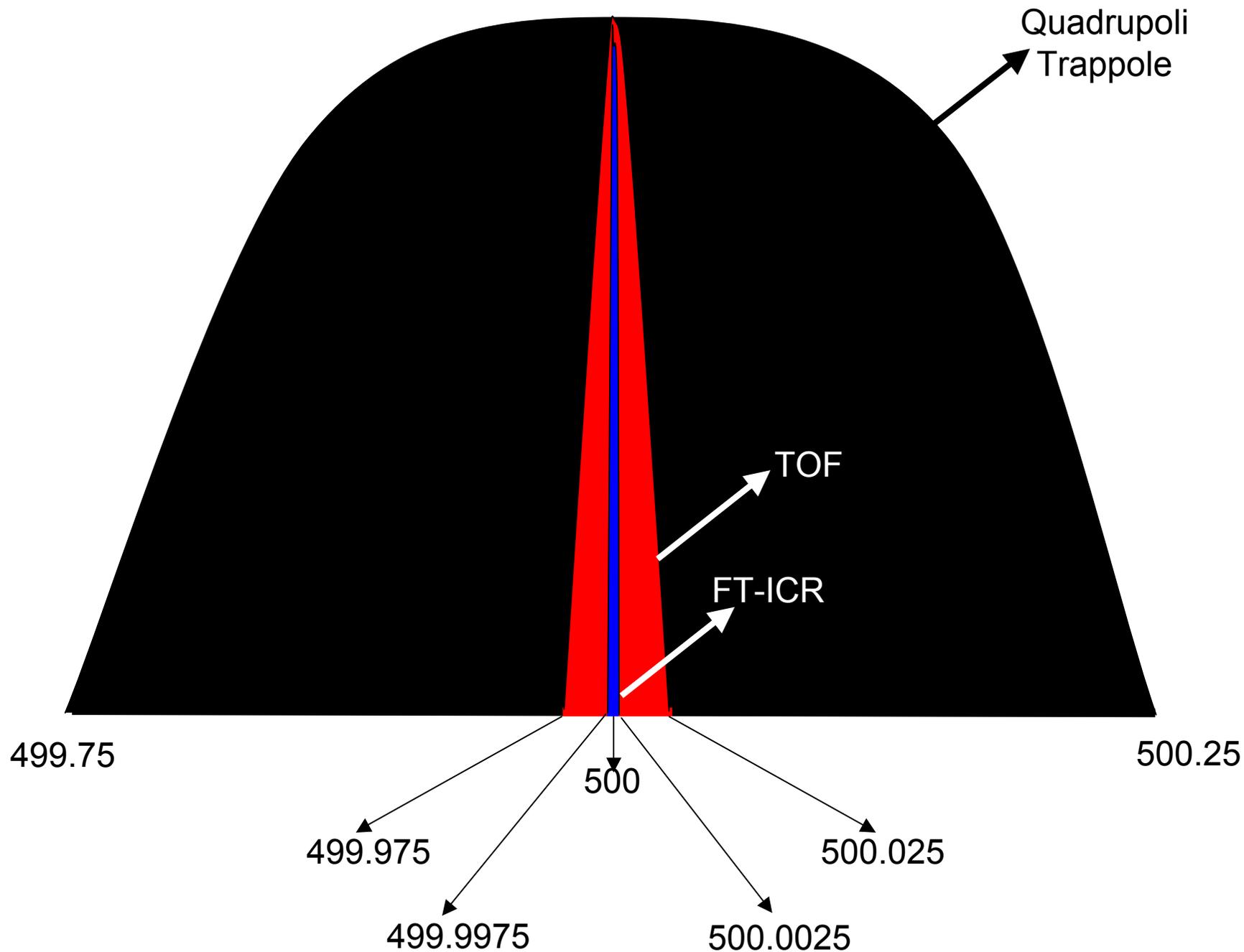
Quadrupoli – **0.5**

Trappole – **0.5**

TOF – **0.05**

FT-ICR - **0.005**

VISUALIZZAZIONE GRAFICA di risoluzione 1000 (Q) – 10000 (TOF) – 100000 (FT-ICR)  
su di un picco a m/z 500



## Accuratezza: precisione nella misurazione del rapporto mass/carica

**Accuratezza e Risoluzione** sono parametri strettamente collegati  
Maggiore risoluzione => possibilità di fornire una misura con elevata accuratezza  
(dipendente da un processo di **calibrazione** (riferimento interno o esterno))

Errore: espresso in **ppm** (parti per milione)

Quadrupoli / Trappole  $\approx$  200-100 ppm

TOF  $\approx$  10-5 ppm

FT-ICR/Orbitrap  $\approx$  2 – 0.2 ppm

Considerando la misura di una molecola con m/z pari a 500, l'errore si verrebbe a tradurre nel seguente modo (considerando l'errore maggiore):

Quadrupoli / Trappole  $\approx 500 \pm 0.1$  [499.9 – 500.1]

TOF  $500 \pm 0.005$  [499.995 – 500.005]

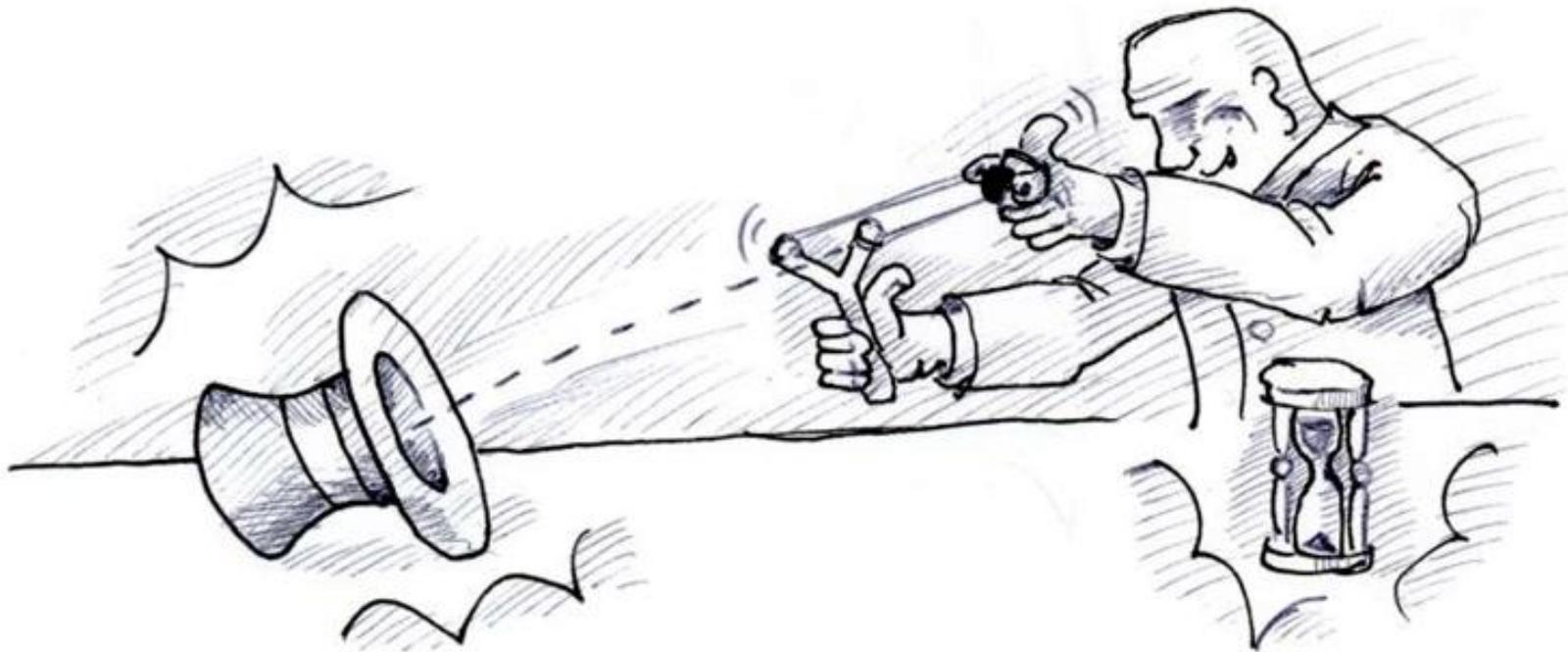
FT-ICR/Orbitrap  $500 \pm 0.001$  [499.999 – 500.001]



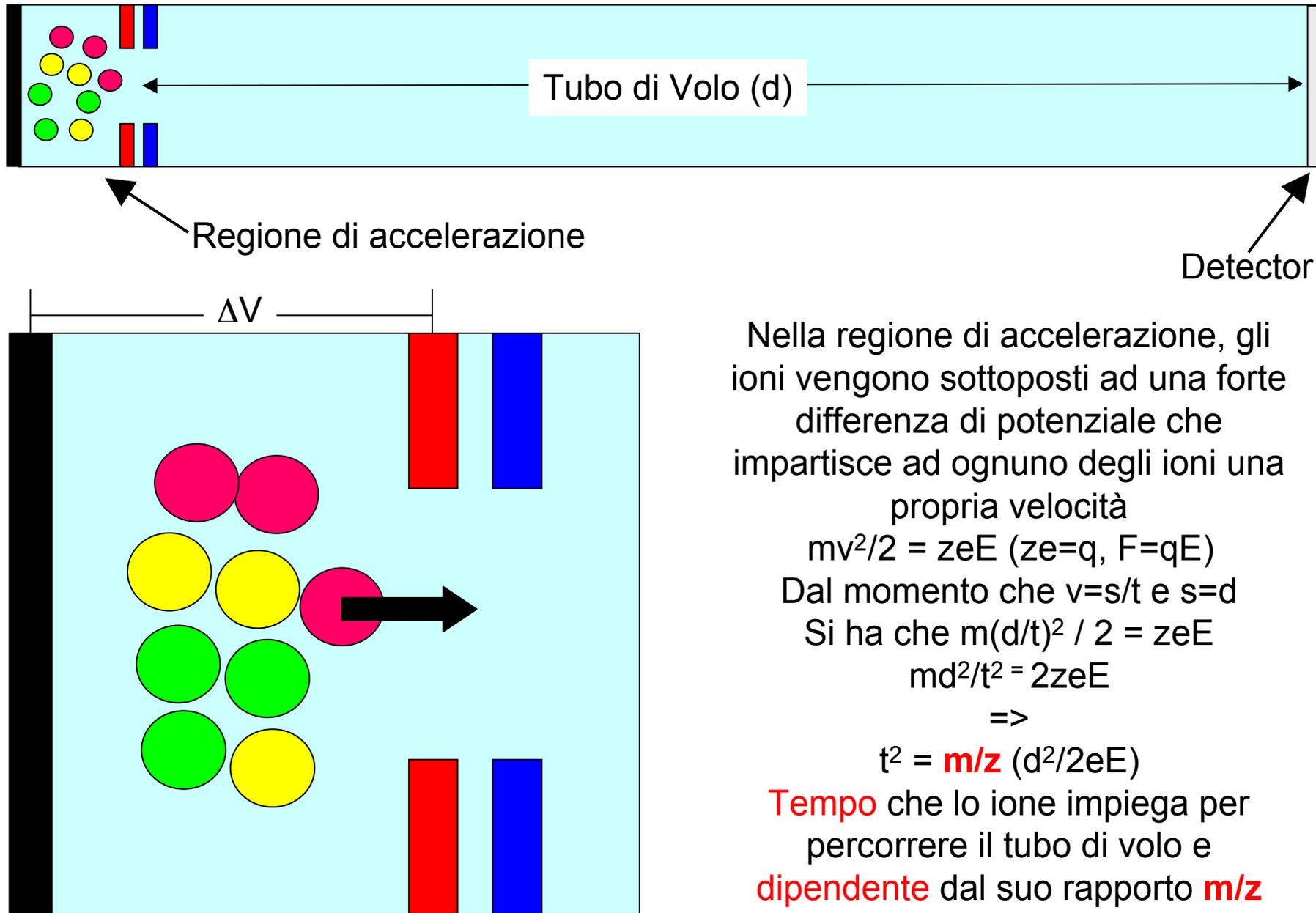
**Una misura di massa effettuata con elevata accuratezza permette di essere maggiormente confidenti nell'identificazione di una molecola.**

**Fornendo un intervallo piccolo, vengono automaticamente scartati tutti quei valori al di fuori di esso (richiamare quanto detto parlando del peptide fingerprinting)**

## Analizzatori a tempo di volo - TOF (Time of Flight)

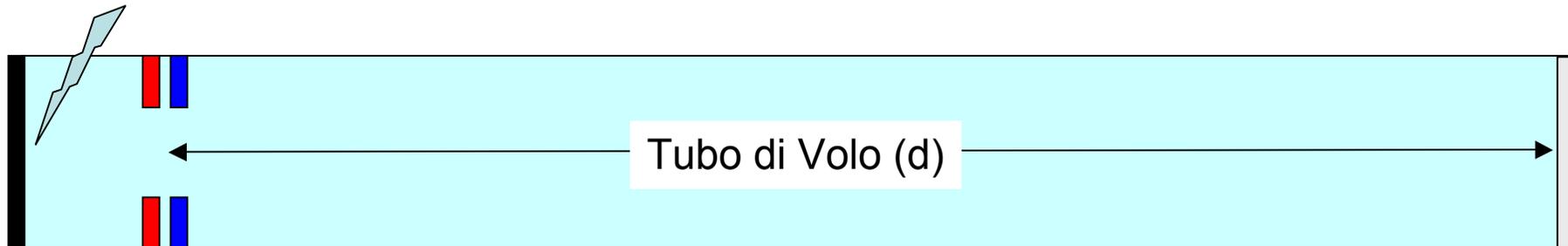


## Analizzatori a tempo di volo - TOF (Time of Flight)



## Analizzatori a tempo di volo - TOF (Time of Flight)

Generazione degli ioni – Ad esempio tramite un impulso laser (MALDI)



# Analizzatori a tempo di volo - TOF (Time of Flight)

Accelerazione degli ioni mediante  $\Delta V$



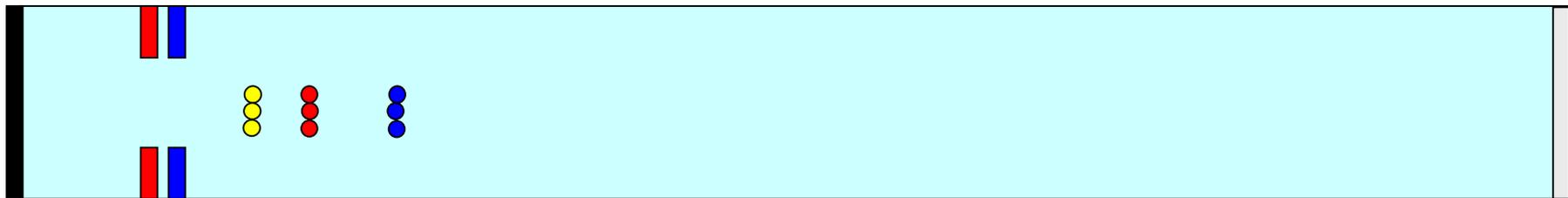
## Analizzatori a tempo di volo - TOF (Time of Flight)

Ioni hanno acquisito una propria velocità  
in dipendenza del loro  $m/z$  e si muovono  
verso il detector



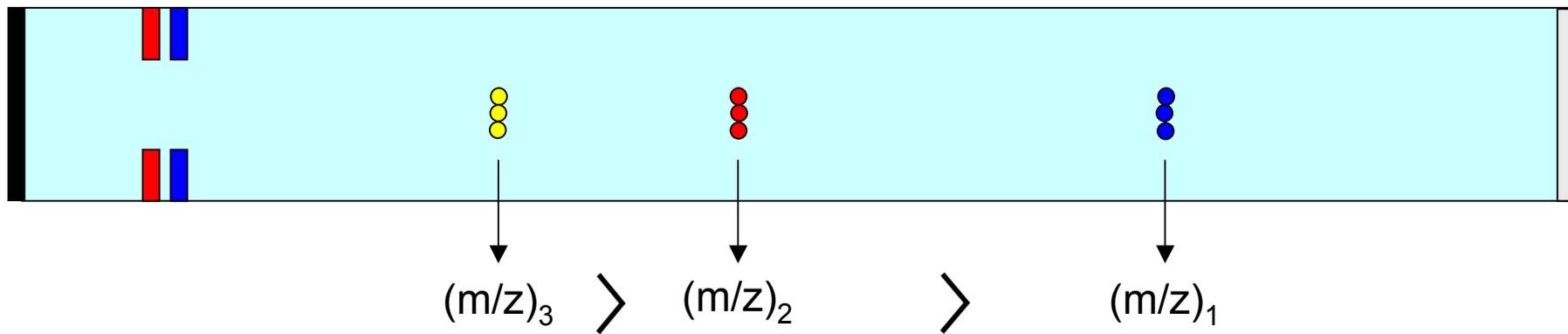
## Analizzatori a tempo di volo - TOF (Time of Flight)

Le loro diverse velocità separano progressivamente gli ioni con diverso  $m/z$  durante il loro cammino verso il detector



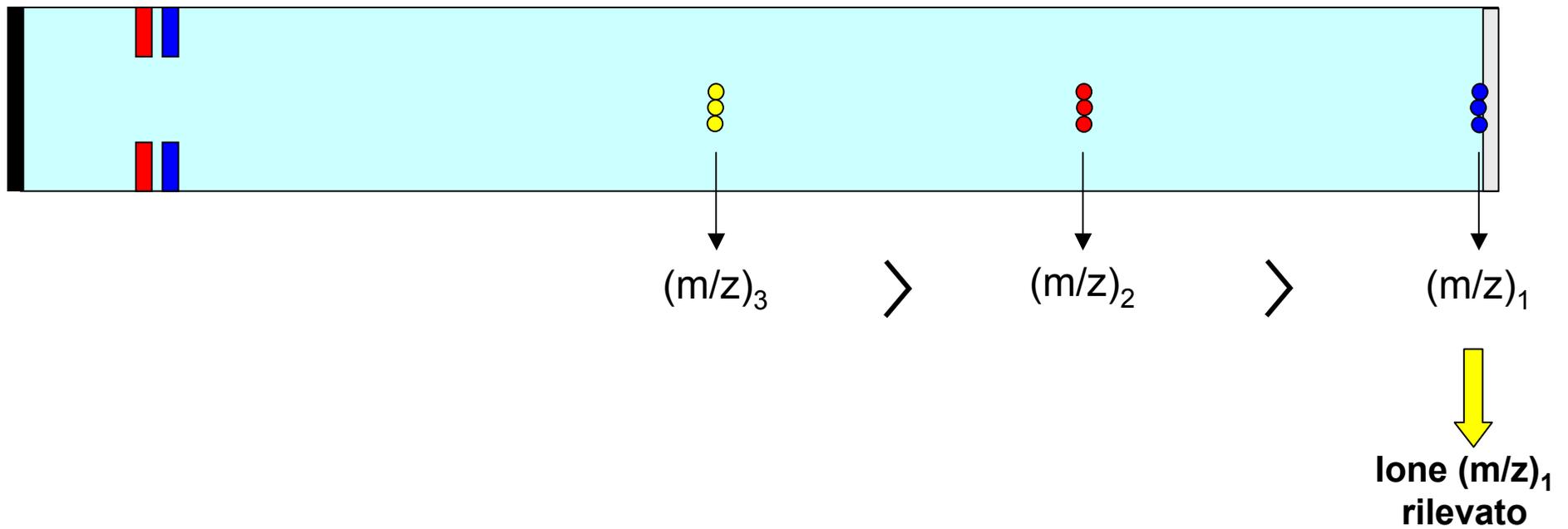
## Analizzatori a tempo di volo - TOF (Time of Flight)

Le loro diverse velocità separano progressivamente gli ioni con diverso  $m/z$  durante il loro cammino verso il detector

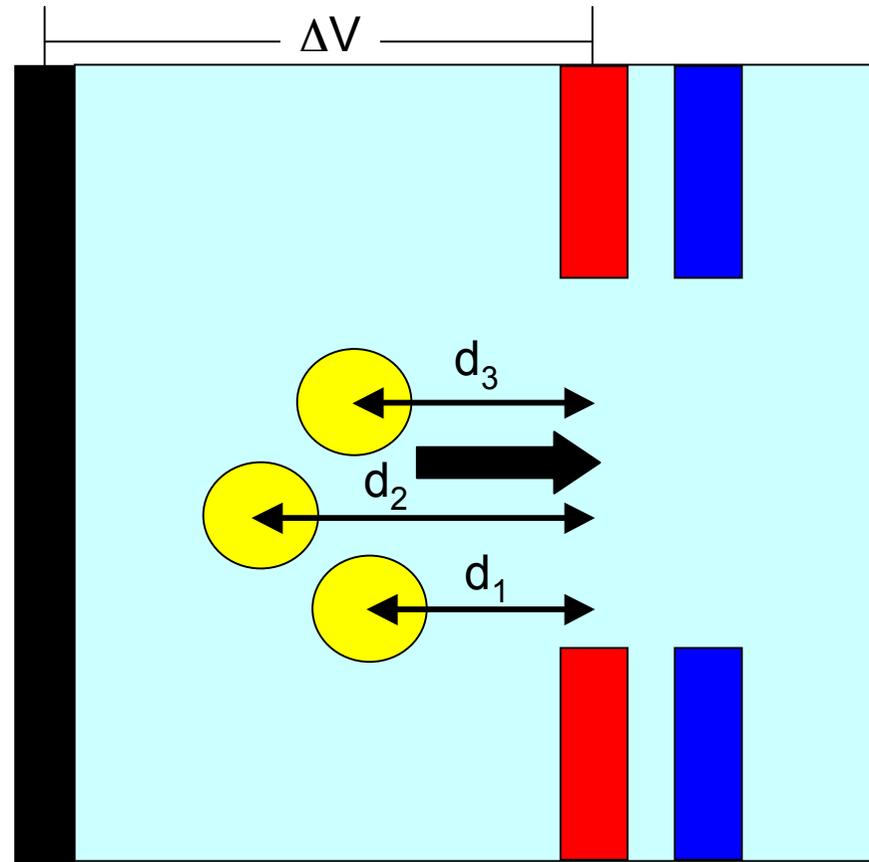


## Analizzatori a tempo di volo - TOF (Time of Flight)

Gli ioni con  $m/z$  diversi raggiungono il detector in tempi diversi



## Analizzatori a tempo di volo - TOF (Time of Flight)



Gli ioni prodotti in sorgente non partono tutti dalla medesima posizione

=>

Sono soggetti ad accelerazione differenti

=>

Si muovono con velocità differenti

=>

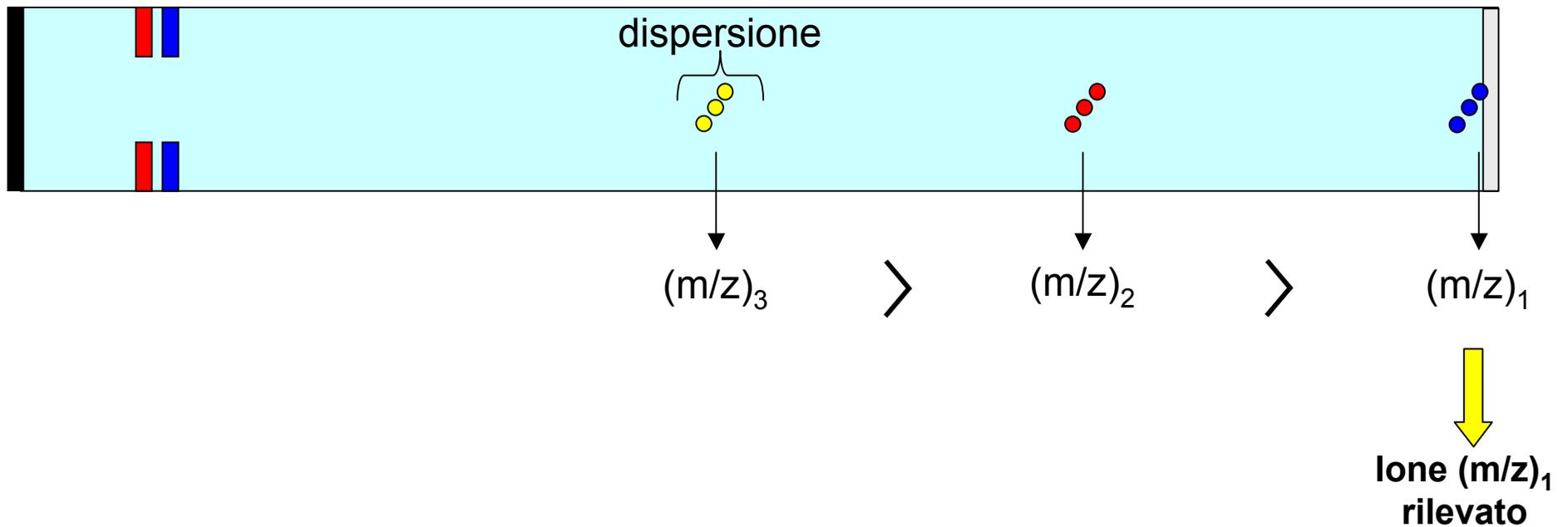
Pur avendo  $m/z$  uguale, raggiungono il detector in tempi diversi

=>

Risoluzione strumentale bassa

## Analizzatori a tempo di volo - TOF (Time of Flight)

Gli ioni con  $m/z$  uguali raggiungono il detector in tempi leggermente diversi a causa della loro differente accelerazione iniziale

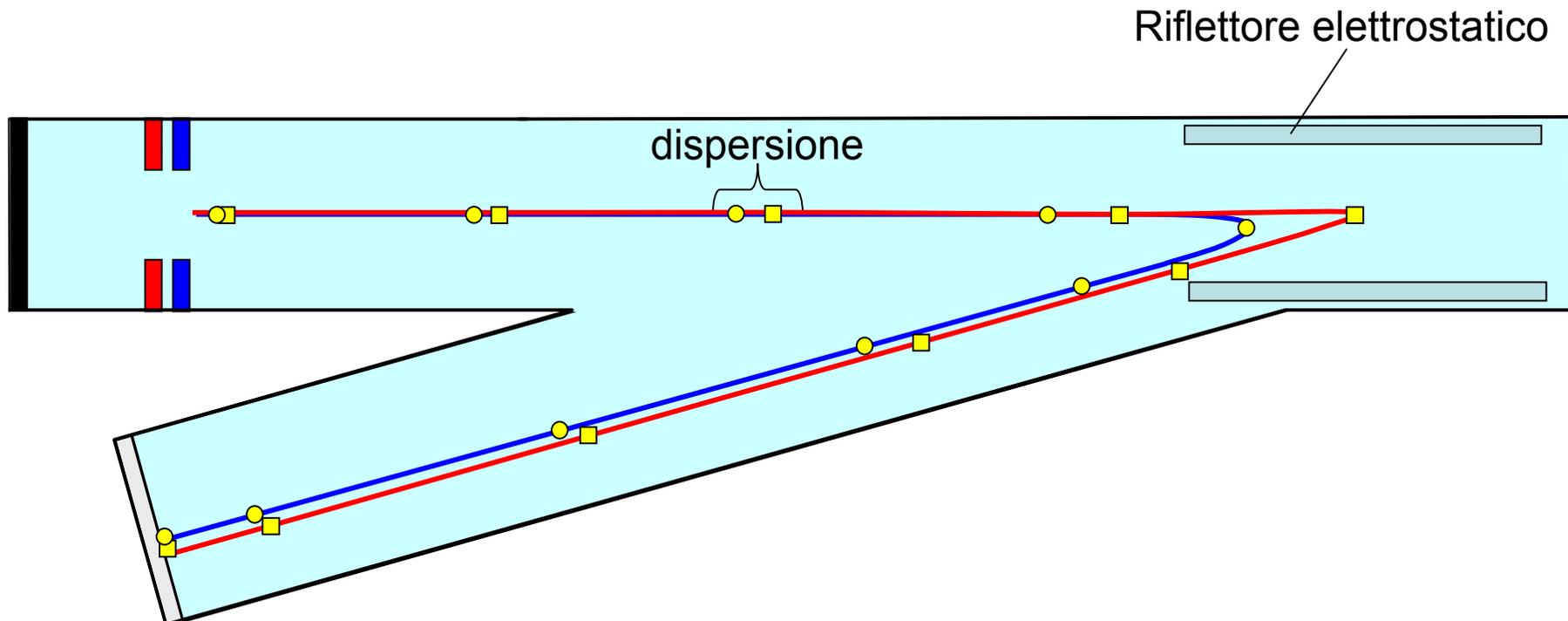


# Analizzatori a tempo di volo - TOF (Time of Flight)

## Reflectron

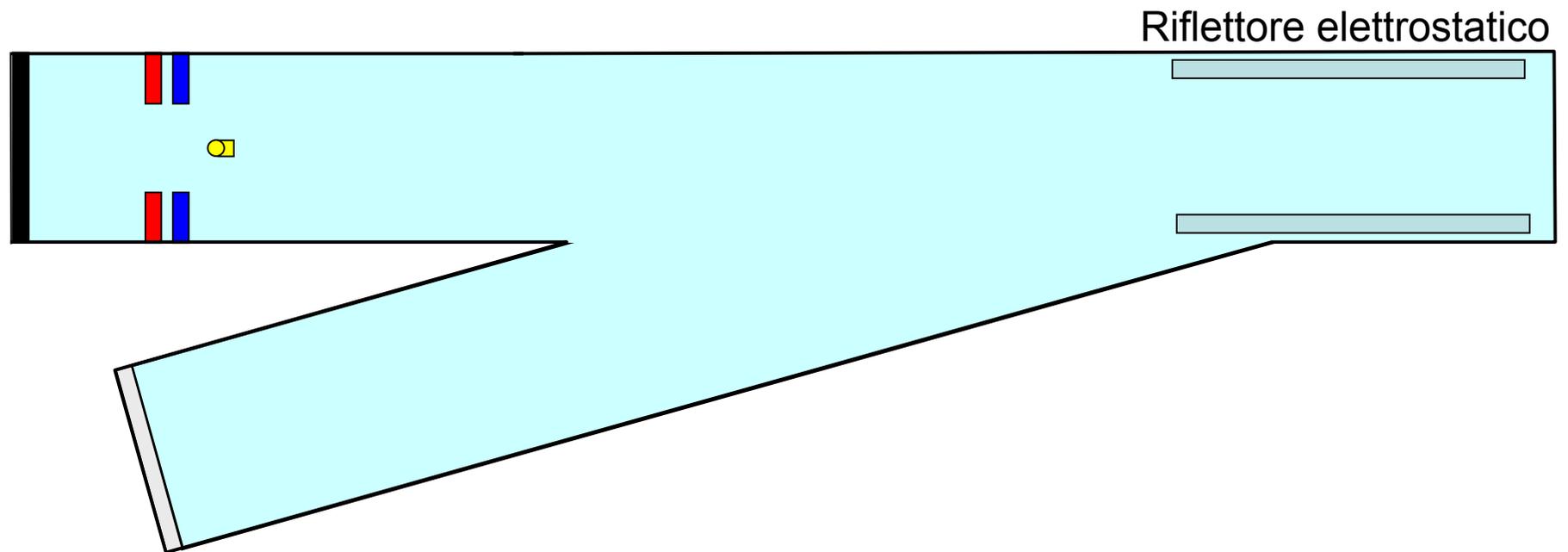
Al riflettore elettrostatico viene applicato un potenziale dello stesso segno rispetto alla carica degli ioni generati in sorgente => repulsione elettrostatica  
Ioni che hanno maggiore energia cinetica penetrano più in profondità nel reflectron rispetto a ioni che hanno energia cinetica minore.

Questo si traduce in traiettorie diversificate. Se il potenziale applicato al reflectron è opportunamente scelto, avviene una correzione per gli ioni aventi medesimo  $m/z$  raggiungono il detector in contemporanea => alta risoluzione



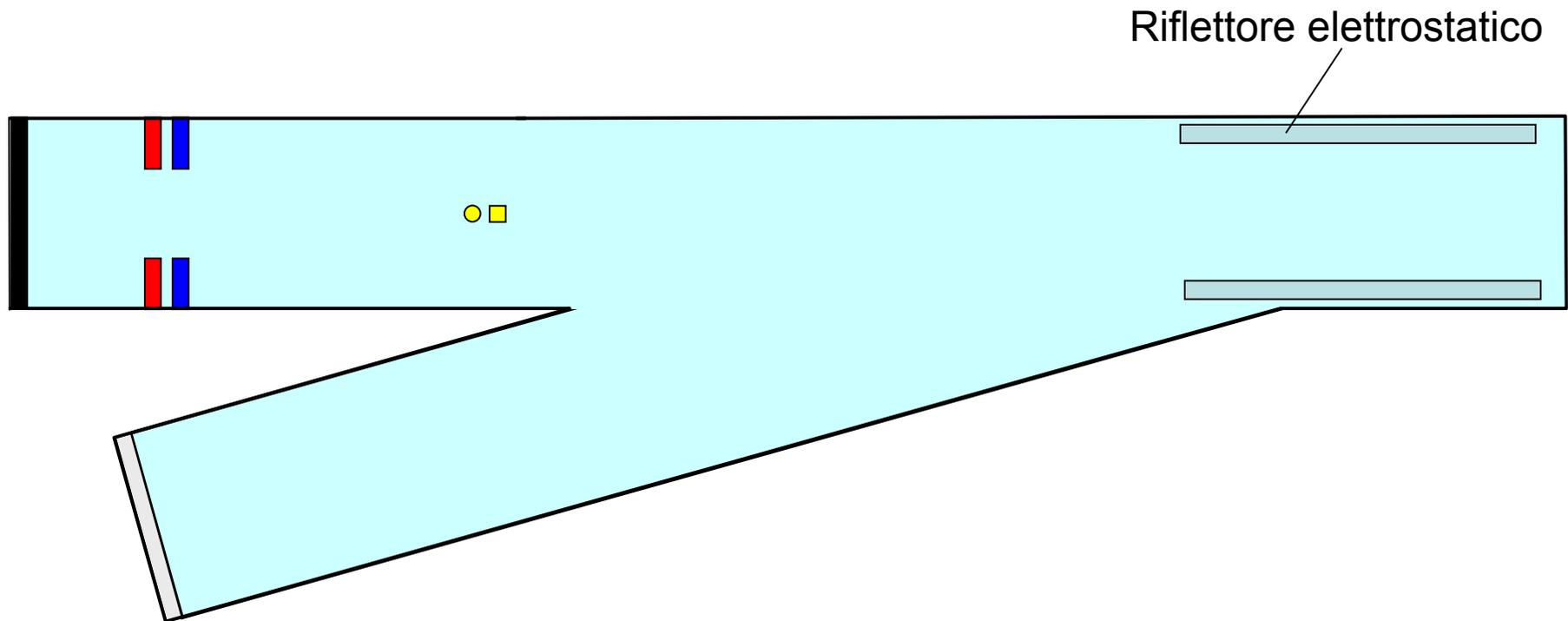
## Analizzatori a tempo di volo - TOF (Time of Flight)

**Gli ioni accelerati si muovono con velocità diverse verso il reflectron**



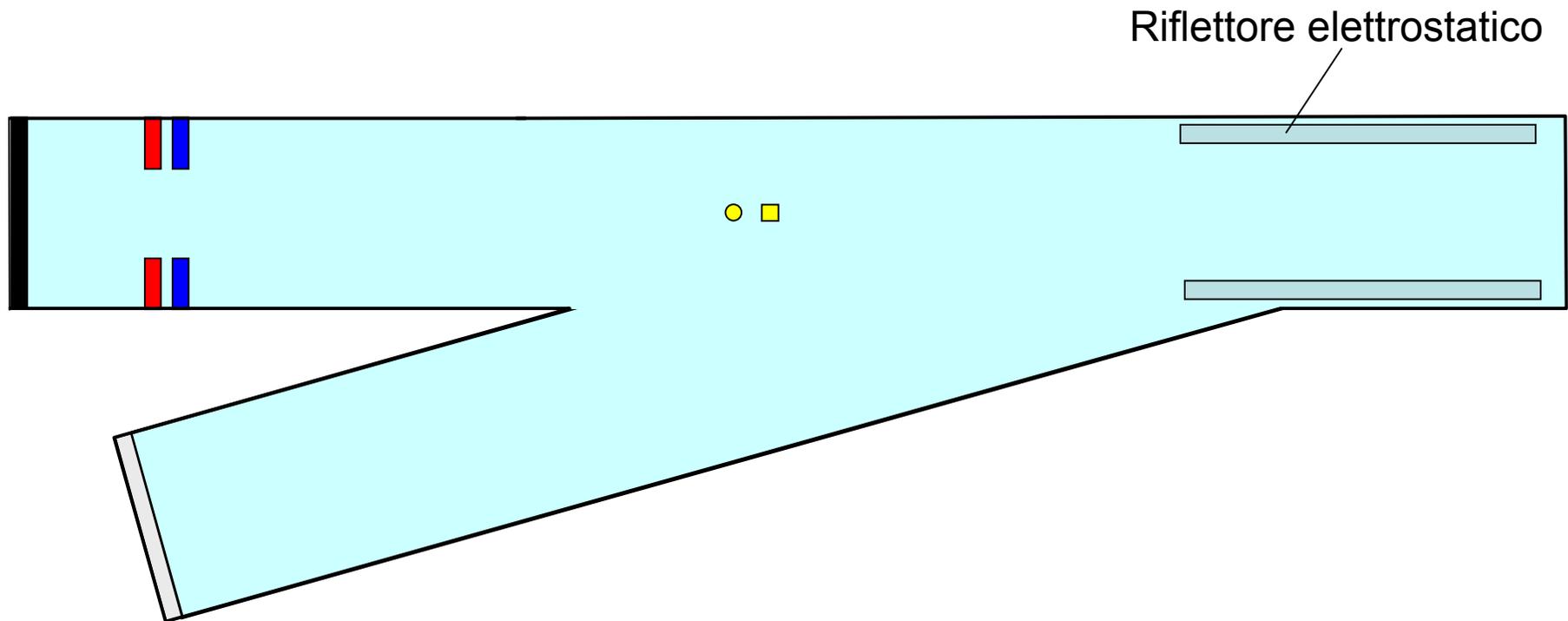
## Analizzatori a tempo di volo - TOF (Time of Flight)

**Gli ioni accelerati si muovono con velocità diverse verso il reflectron**



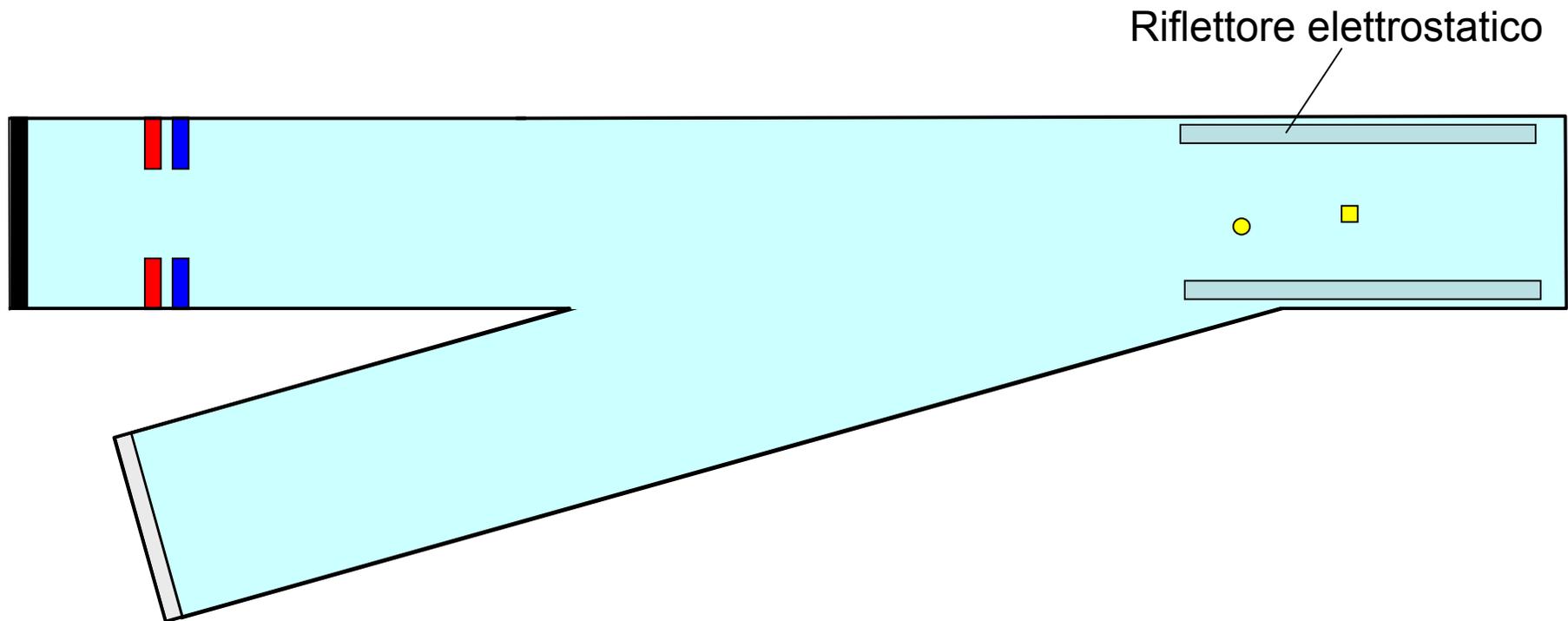
## Analizzatori a tempo di volo - TOF (Time of Flight)

**Gli ioni accelerati si muovono con velocità diverse verso il reflectron**



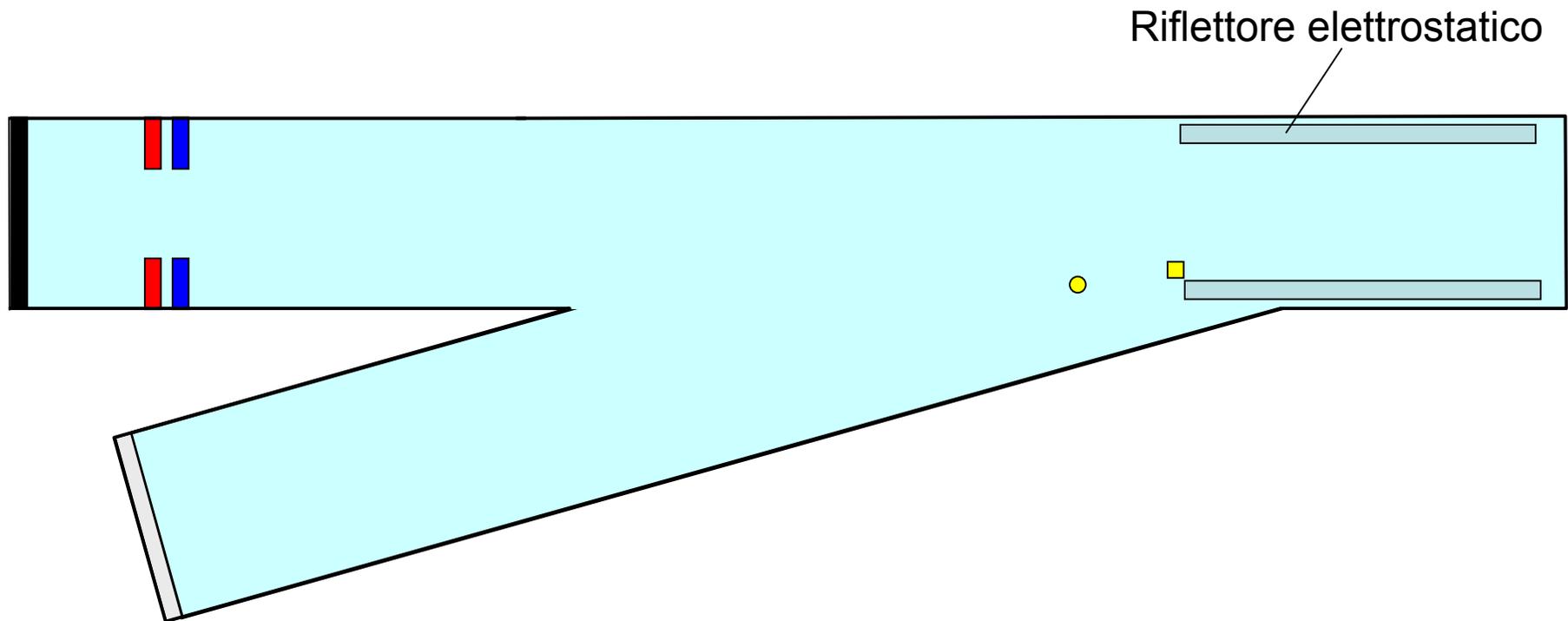
## Analizzatori a tempo di volo - TOF (Time of Flight)

**Gli ioni aventi lo stesso  $m/z$  ma diversa energia cinetica penetrano differenzialmente nel riflettore. Quelli con energia cinetica maggiore in maggior misura rispetto a quelli con energia cinetica minore.**

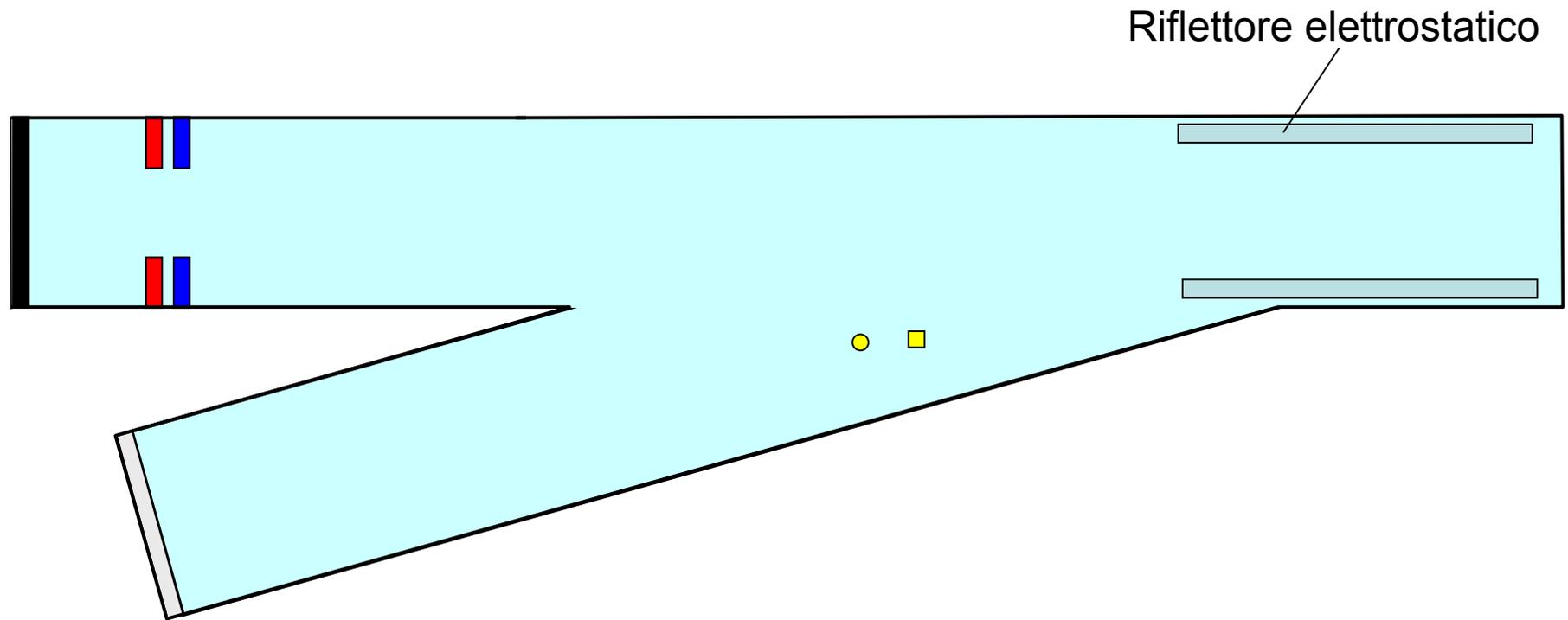


## Analizzatori a tempo di volo - TOF (Time of Flight)

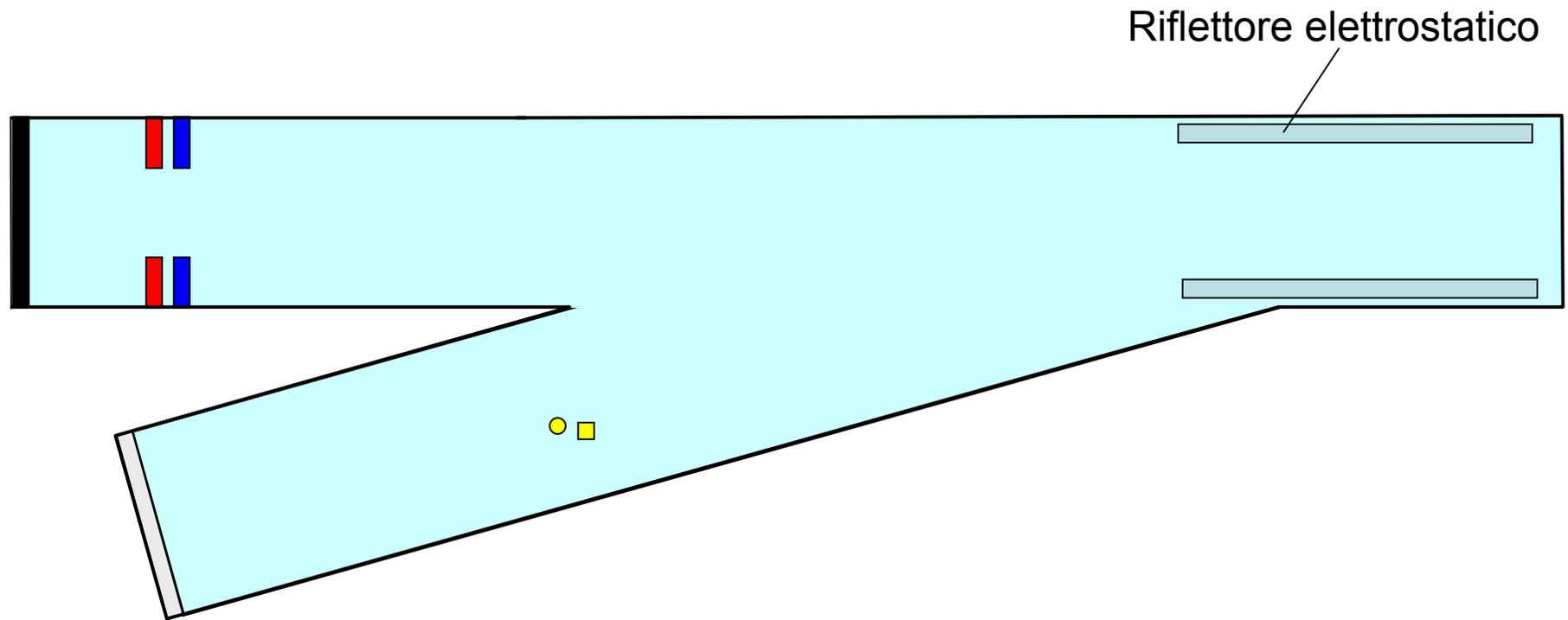
**All'uscita dal reflectron, le velocità sono le stesse rispetto all'entrata, ma lo ione con velocità maggiore si trova dietro a quello con velocità minore.**



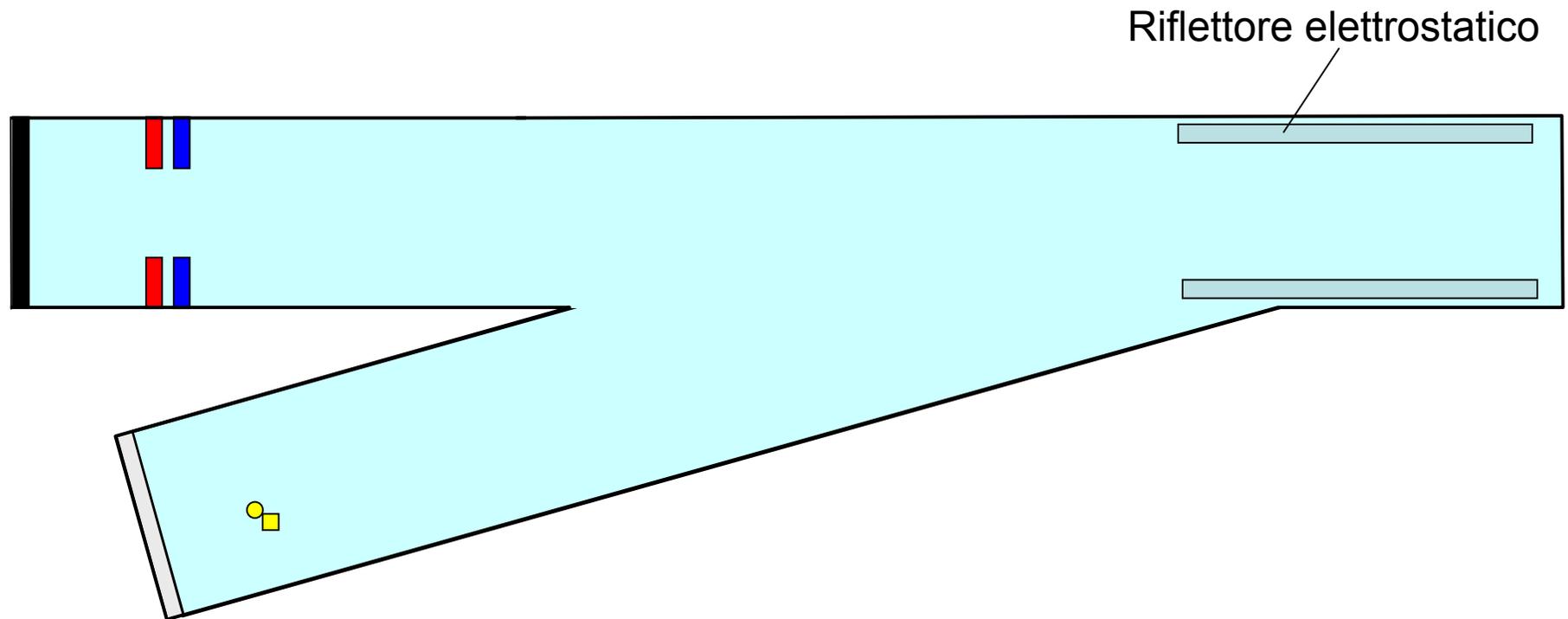
# Analizzatori a tempo di volo - TOF (Time of Flight)



# Analizzatori a tempo di volo - TOF (Time of Flight)

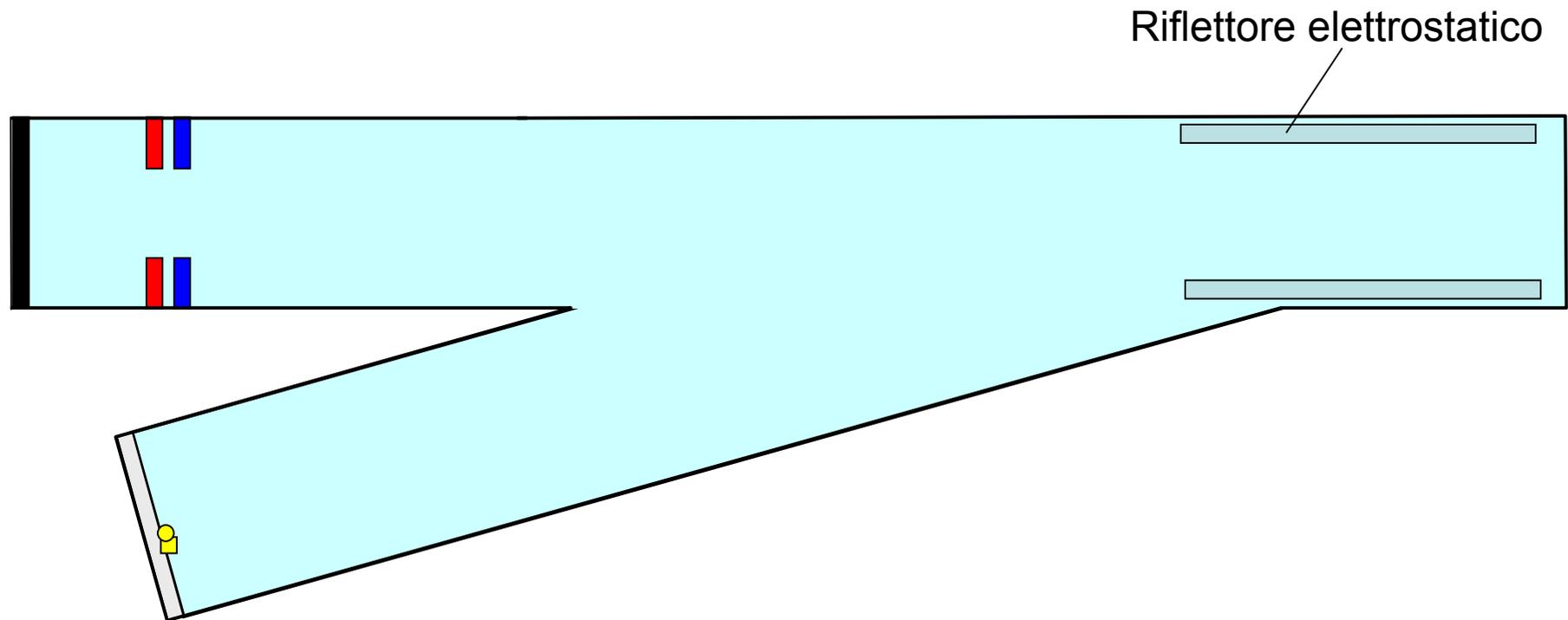


# Analizzatori a tempo di volo - TOF (Time of Flight)



## Analizzatori a tempo di volo - TOF (Time of Flight)

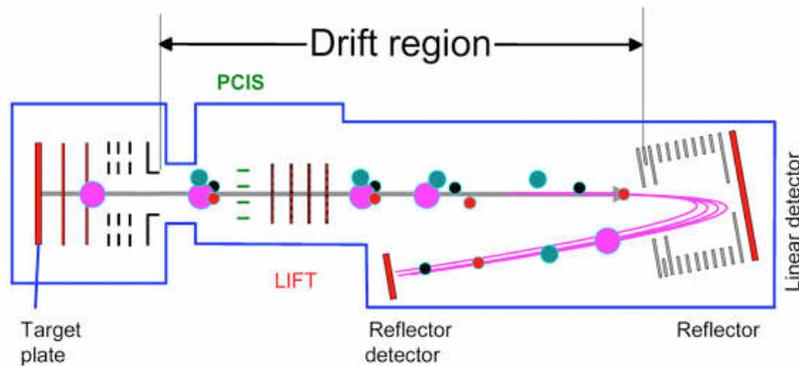
**Qualora il ritardo dato dal reflectron è opportunamente tarato, i due ioni, aventi comunque velocità diverse, raggiungono il detector in contemporanea.**



## Analizzatore TOF singoli e in abbinata ad altri analizzatori

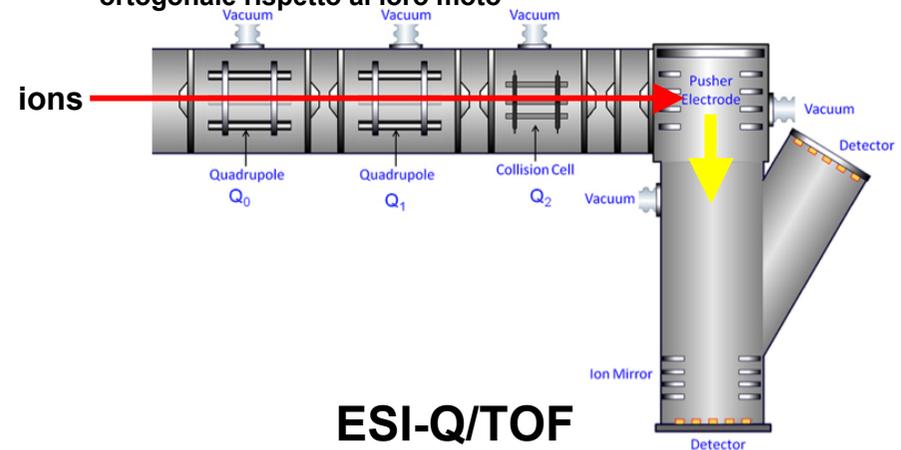
In passato gli analizzatori TOF erano prevalentemente associati ad interfacce di tipo MALDI. Attualmente gli analizzatori TOF possono essere associati direttamente anche delle sorgenti di tipo ESI (strumenti ESI-TOF) o, più frequentemente, fanno parte di strumenti ibridi che prevedono più analizzatori in serie. Comuni sono analizzatori di tipo ESI-Q/TOF (interfaccia di tipo ESI in abbinamento ad un quadrupolo seguito da un TOF) oppure ESI-IT/TOF (interfaccia di tipo ESI in abbinamento ad una trappola ionica in testa ad un TOF).

### MALDI-TOF



### Acceleratore ortogonale al flusso di ioni in entrata

Gli ioni sono guidati da delle lenti/quadrupoli e vengono portati in una regione dove subiscono un'accelerazione ortogonale rispetto al loro moto



### ESI-Q/TOF

### ESI-IT/TOF

