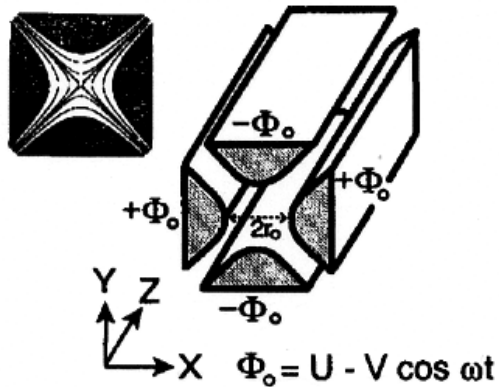


Analizzatori quadrupolari

Principio di funzionamento

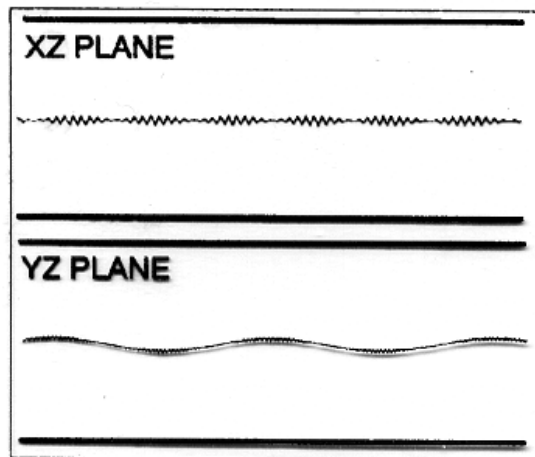


U: corrente continua

V: corrente alternata

1) lo ione (+) entra nel quadrupolo muovendosi lungo l'asse z.

2) viene attratto dal cilindro a potenziale negativo, se questo cambia potenziale e da negativo passa a positivo viene respinto, cambia traiettoria e continua il suo moto verso l'uscita del quadrupolo, altrimenti collide con esso e si esaurisce.

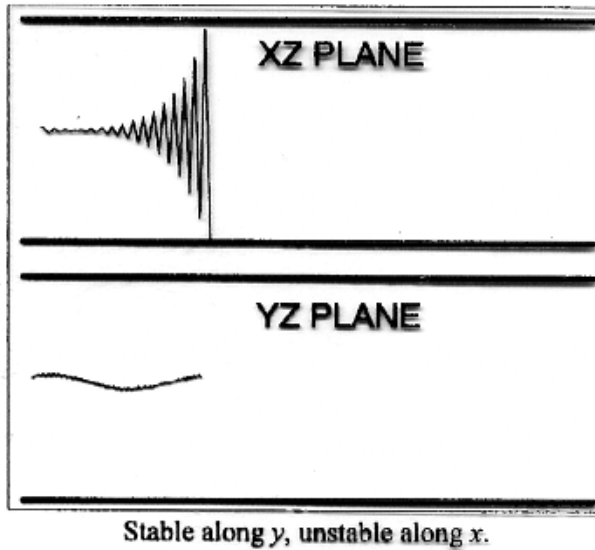


Stable along both x and y

La combinazione di U e V rende stabile la traiettoria di un particolare ione (identificato da un specifico valore m/z); variando in modo opportuno questi valori si permette il superamento del quadrupolo a ioni (m/z) diversi che possono essere rilevati dal detector.



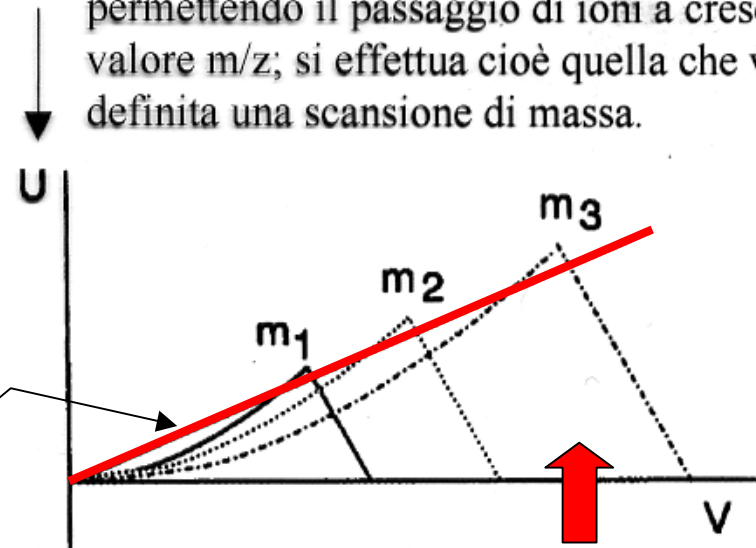
Analizzatori quadrupolari



Ioni (m/z) che non hanno traiettoria stabile vanno a collidere con i cilindri del quadrupolo e non riescono a raggiungere il detector



In effetti ciascun ione (m/z) ha traiettoria stabile per una serie di combinazioni di valori di U e V che formano delle cosiddette aree di stabilità. Facendo variare U in funzione di V si può passare da un'area di stabilità all'altra permettendo il passaggio di ioni a crescente valore m/z ; si effettua cioè quella che viene definita una scansione di massa.



Scansione:

tempo t_1 - può passare $m/z_{(1)}$ -

tempo t_2 - può passare $m/z_{(2)}$ -

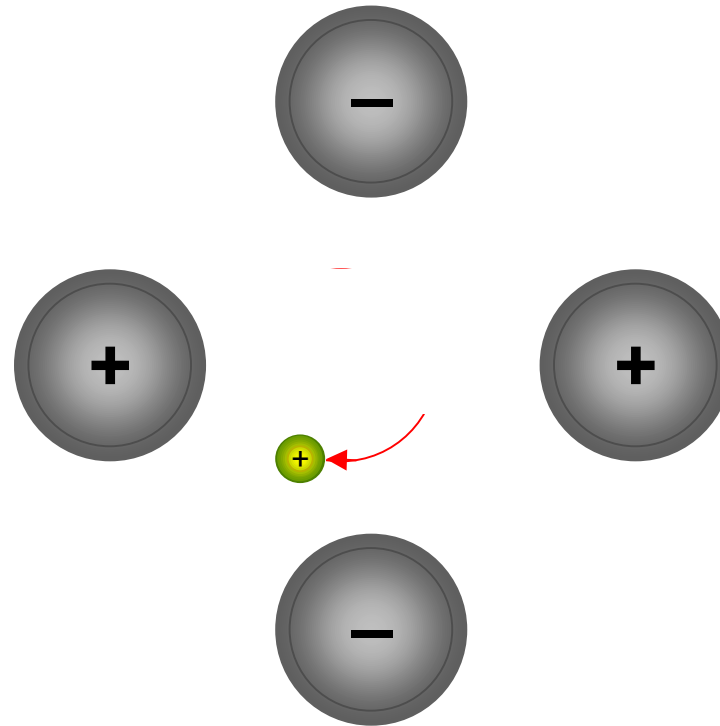
.....

Retta descritta dalle combinazioni di U e V .
Modificando tale retta si modifica l'attraversamento delle aree di stabilità relative ai vari rapporti m/z

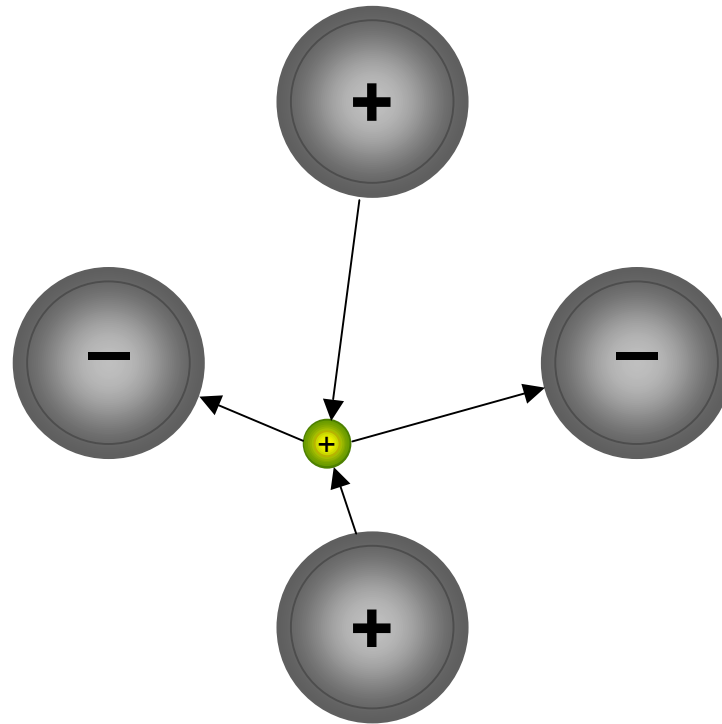
m_1, m_2, m_3 indicano valori m/z

Analizzatori quadrupolari

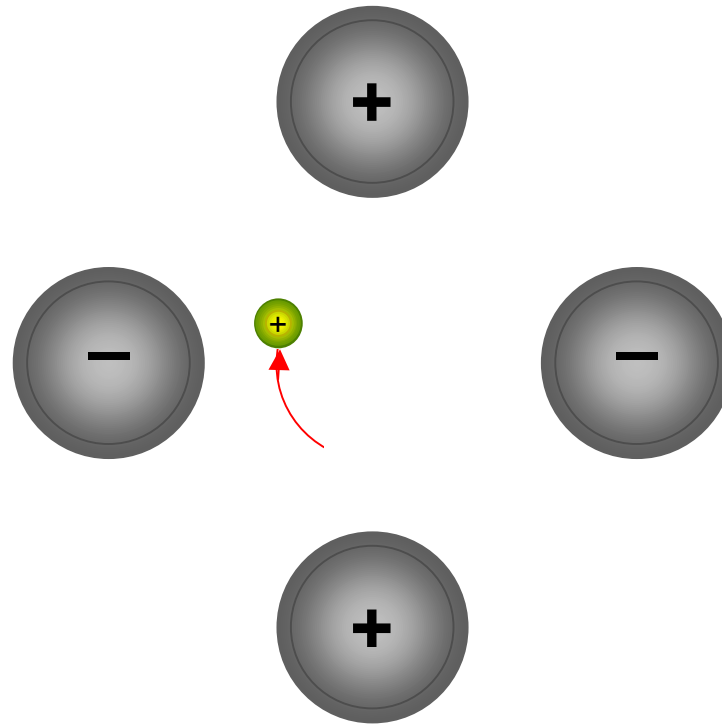
SEZIONE trasversale del Quadrupolo
Movimento degli ioni nel campo elettrico quadrupolare



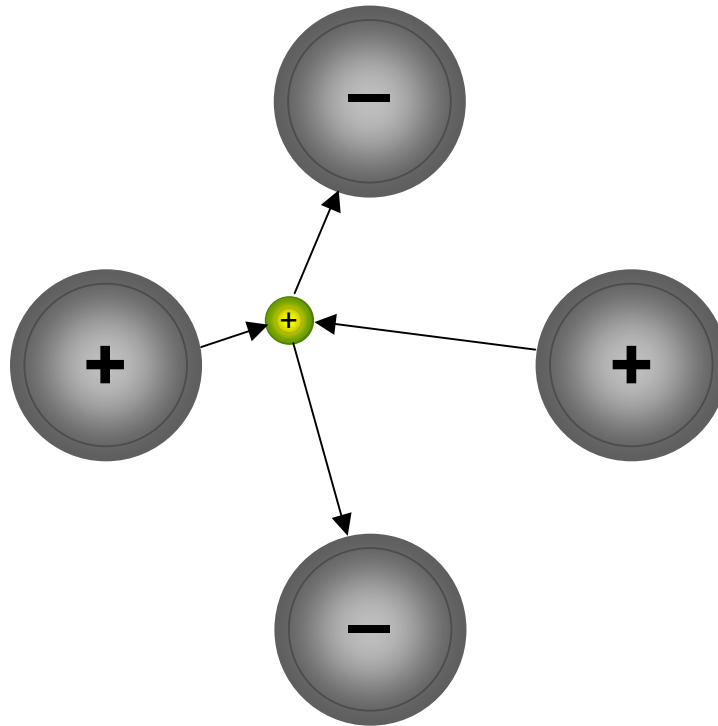
SEZIONE trasversale del Quadrupolo
Movimento degli ioni nel campo elettrico quadrupolare



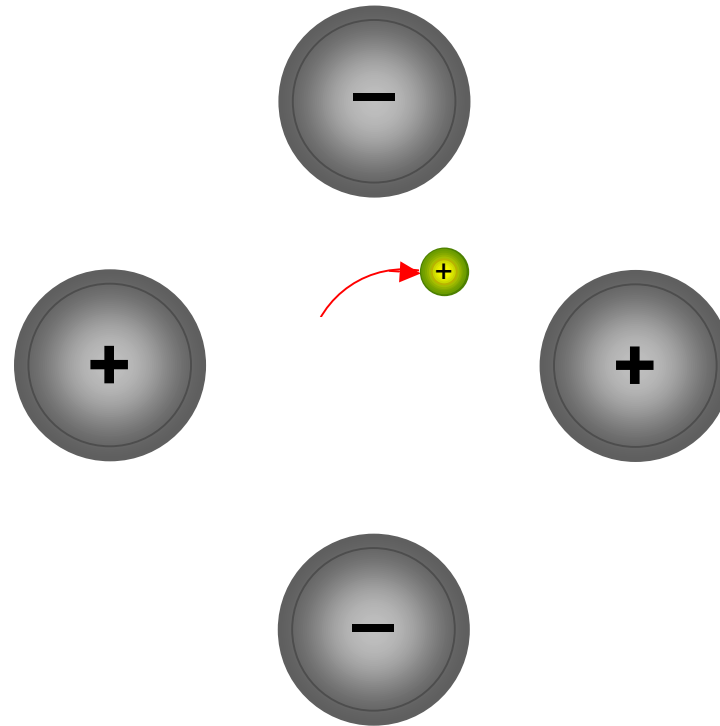
SEZIONE trasversale del Quadrupolo
Movimento degli ioni nel campo elettrico quadrupolare



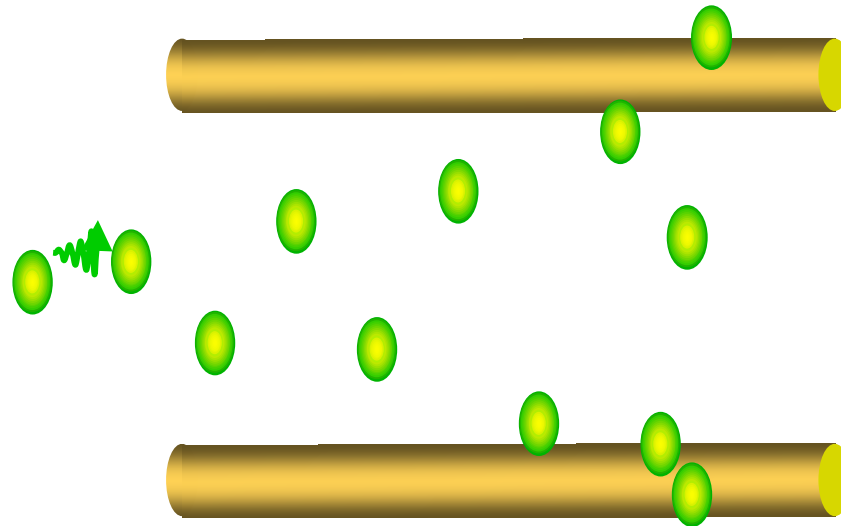
SEZIONE trasversale del Quadrupolo
Movimento degli ioni nel campo elettrico quadrupolare



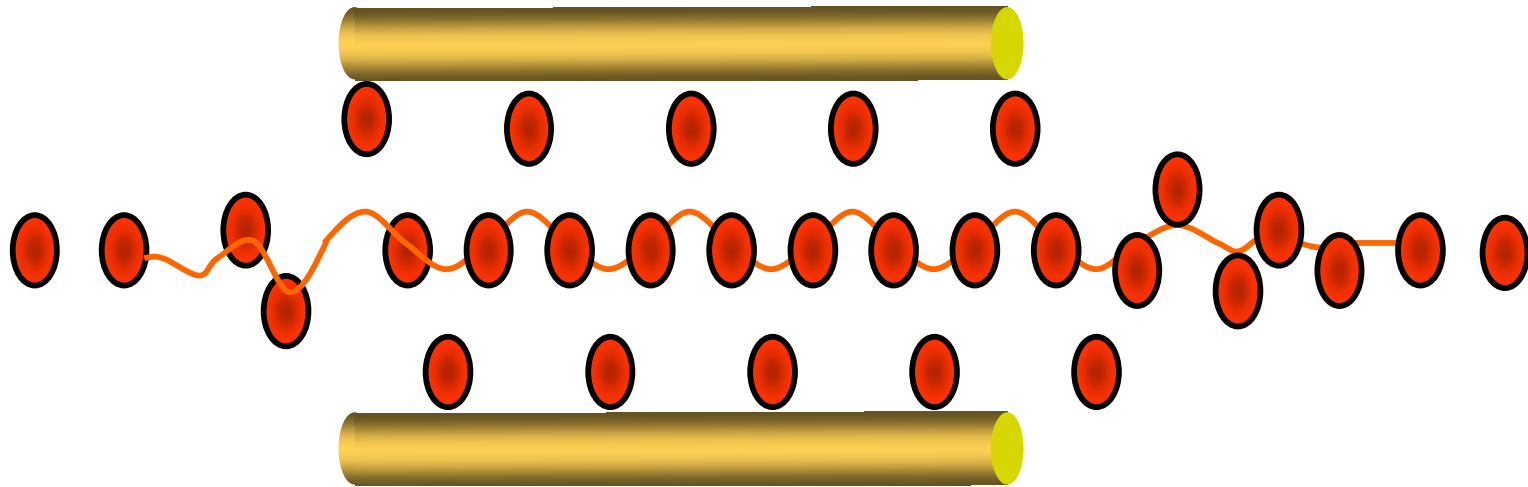
SEZIONE trasversale del Quadrupolo
Movimento degli ioni nel campo elettrico quadrupolare



SEZIONE longitudinale del Quadrupolo
Movimento degli ioni nel campo elettrico quadrupolare
Esempio di traiettoria instabile



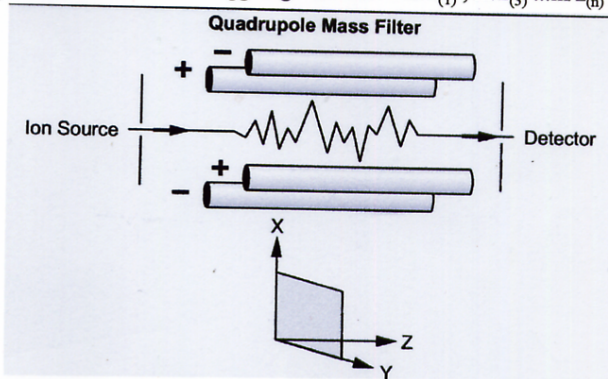
SEZIONE longitudinale del Quadrupolo
Movimento degli ioni nel campo elettrico quadrupolare
Esempio di traiettoria stabile



Quadrupolo vs Trappola ionica

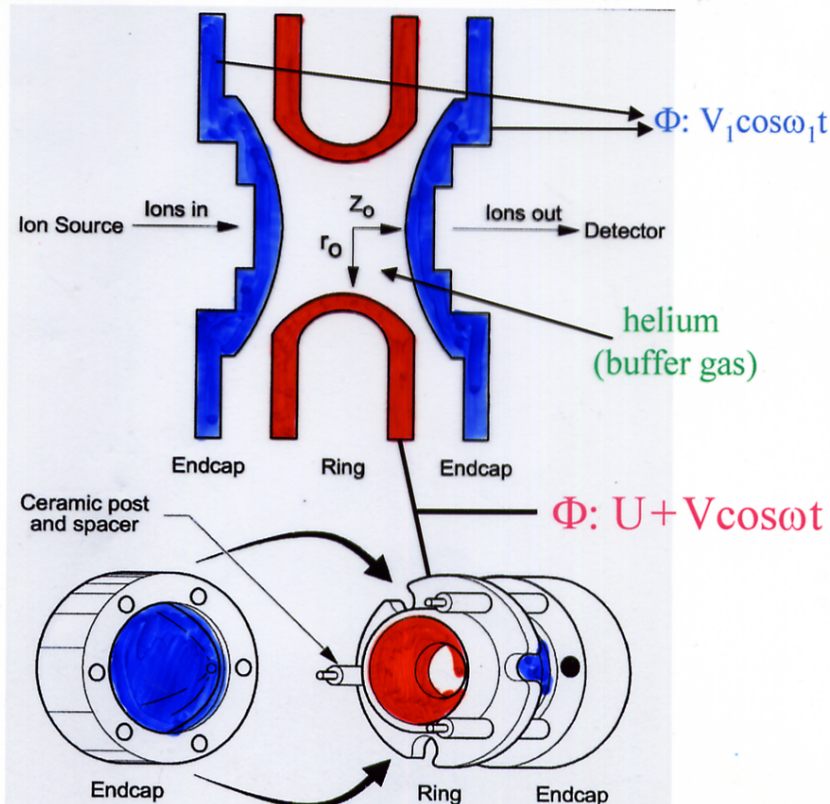
concetto:

tempo t_1 : ione $m/z_{(1)}$ traiettoria stabile => raggiunge detector / $m/z_{(2)}, m/z_{(3)} \dots m/z_{(n)}$ persi
 tempo t_2 : ione $m/z_{(2)}$ traiettoria stabile => raggiunge detector / $m/z_{(1)}, m/z_{(3)} \dots m/z_{(n)}$ persi



concetto:

tempo t_0 : traiettoria stabile per tutti gli ioni $m/z_{(1)}, m/z_{(2)}, \dots m/z_{(n)}$
 tempo t_1 : ione $m/z_{(1)}$ traiettoria instabile => raggiunge detector / stabili $m/z_{(2)}, m/z_{(3)} \dots m/z_{(n)}$
 tempo t_2 : ione $m/z_{(2)}$ traiettoria instabile => raggiunge detector / stabili $m/z_{(3)}, m/z_{(4)} \dots m/z_{(n)}$

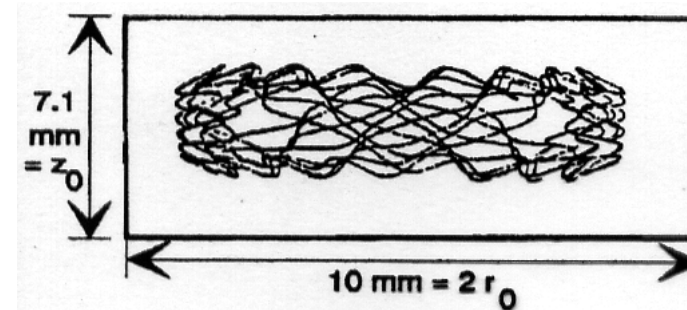


Trappola tridimensionale

Ioni, vengono fatti entrare nello spazio interno della trappola (z_0 e r_0) e la loro traiettoria all'interno della trappola viene stabilizzata:

- a) **Elio** – diminuisce la loro energia cinetica
- b) **N° controllato di ioni** – distorsione delle loro traiettorie in caso di sovraccaricamento
- c) Radiofrequenza fondamentale **$U + V \cos \omega t$**

La stabilità di uno ione, essendo fisse le dimensioni della trappola dipendono da ω e V



Su dei principi analoghi funzionano

Le trappole ioniche lineari

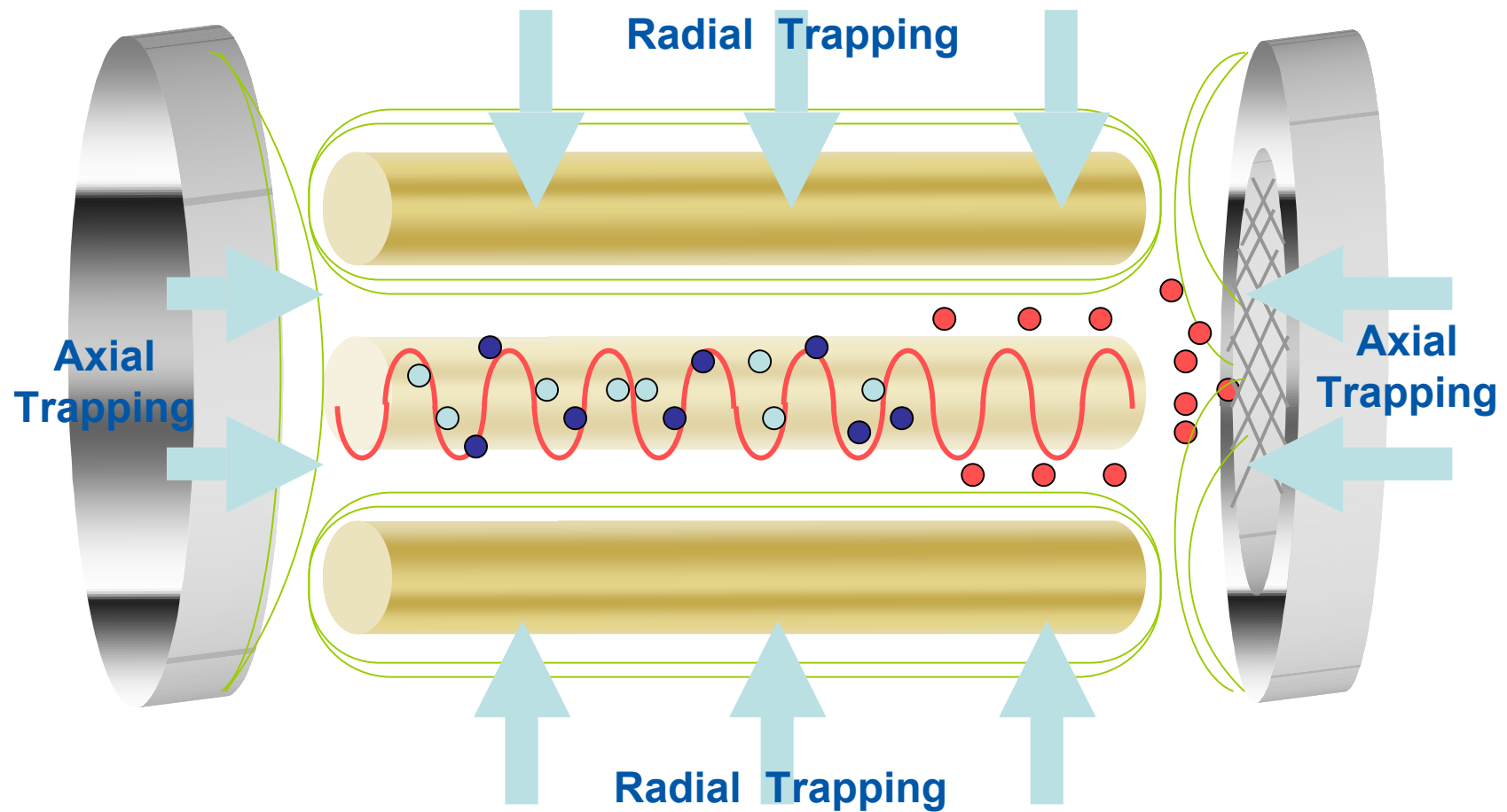
(**LIT**)

Maggiore spazio dove intrappolare gli ioni =>

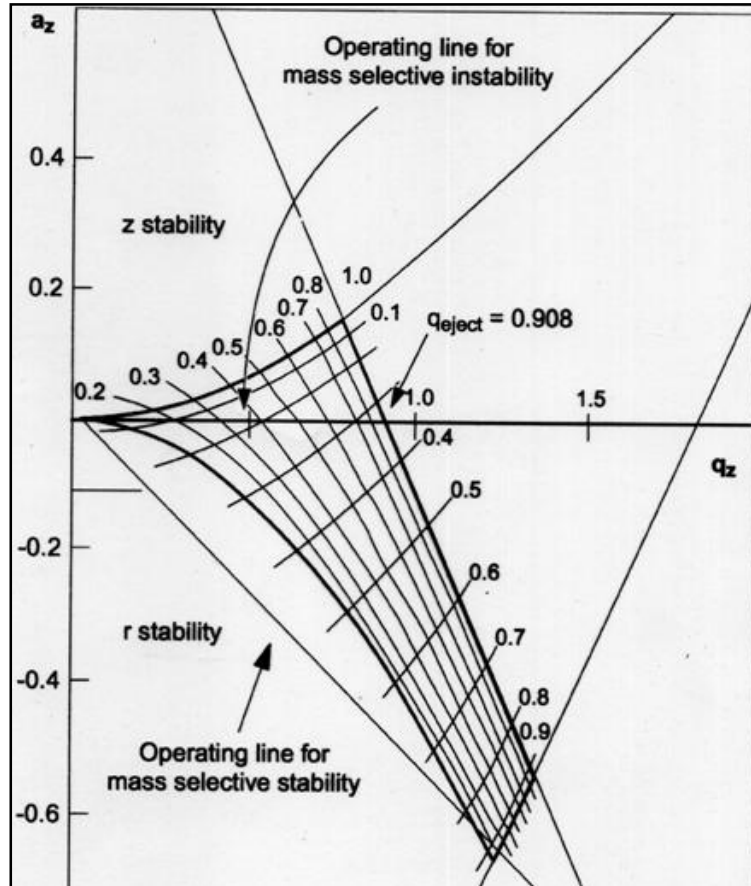
Maggiore sensibilità

Quadrupolo in modalità LIT – Linear Ion Trap

Una trappola ionica lineare non è altro che un quadrupolo che invece di funzionare come filtro selettivo viene fatto funzionare come trappola ionica. Il vantaggio di questo tipo di analizzatori è che lo spazio a disposizione degli ioni è maggiore. Questo comporta il fatto che può essere accumulato un numero maggiore di ioni senza che essi si “**disturbino**” a vicenda. Questo infatti è uno dei **limiti principali** di questo tipo di analizzatori. Il fatto che ci siano più ioni in uno spazio ristretto porta ad una **mutua influenza** degli ioni sulle proprie traiettorie all'interno della trappola che in questo modo non dipendono più solo ed esclusivamente dai voltaggi applicati alla trappola stessa. In questo modo se ne salta la possibilità di controllare in modo predeterminato le loro traiettorie.



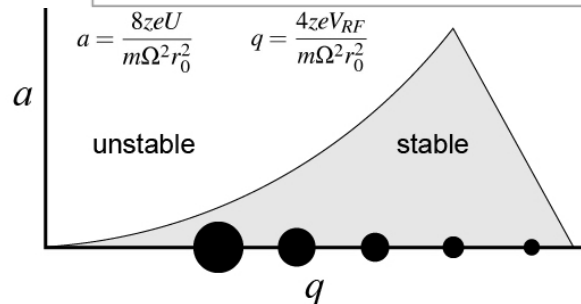
Trappola tridimensionale



EQUAZIONE di MATHIEU

for $u=x,y,z$

$$\frac{d^2u}{dt^2} + \frac{\Omega^2}{4} (a_u - 2q_u \cos \Omega t) u = 0$$



Traiettoria di ione in una trappola ionica 3D:

Equazione di Mathieu

=>

Coordinate di stabilità a_z e q_z

Questi valori stabiliscono per un dato (specifico m/z) ione se la sua traiettoria sarà stabile o meno.

Per uno specifico ione e per una determinata trappola ionica (dimensioni), queste coordinate dipendono dai **voltaggi** applicati alla trappola

Ci sono due direzioni in cui uno ione deve essere stabile (cioè avere delle coordinate di movimento che non superino le dimensioni della trappola, ovvero lungo **l'asse z e l'asse r (z and r stability)**)

A seconda dei voltaggi applicati alla trappola, ciascun determinato ione si troverà ad avere dei valori di q_z e a_z che descrivono la sua traiettoria (stabilità)

$q_z > 0.908$

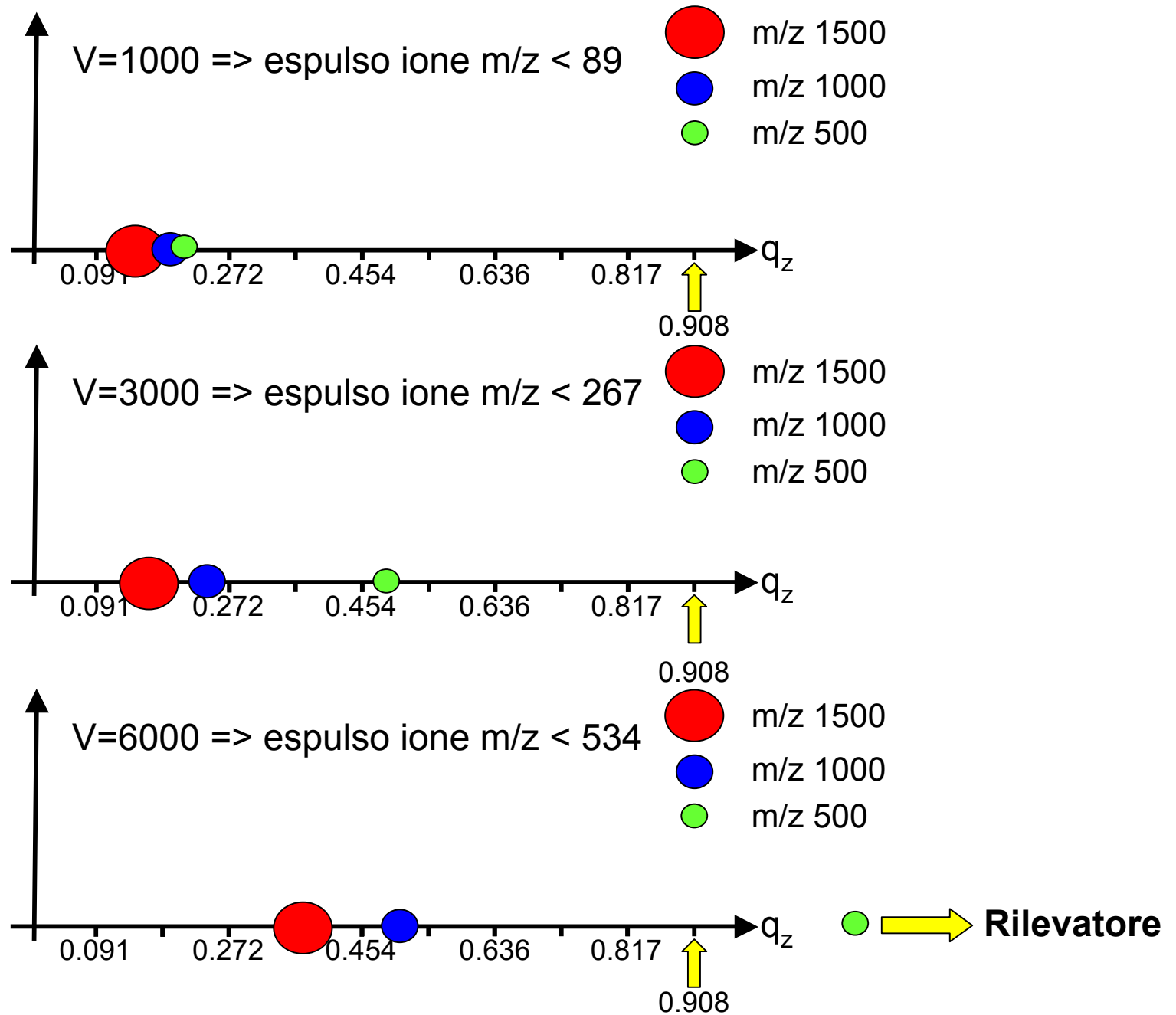
=> espulsione dalla Trappola

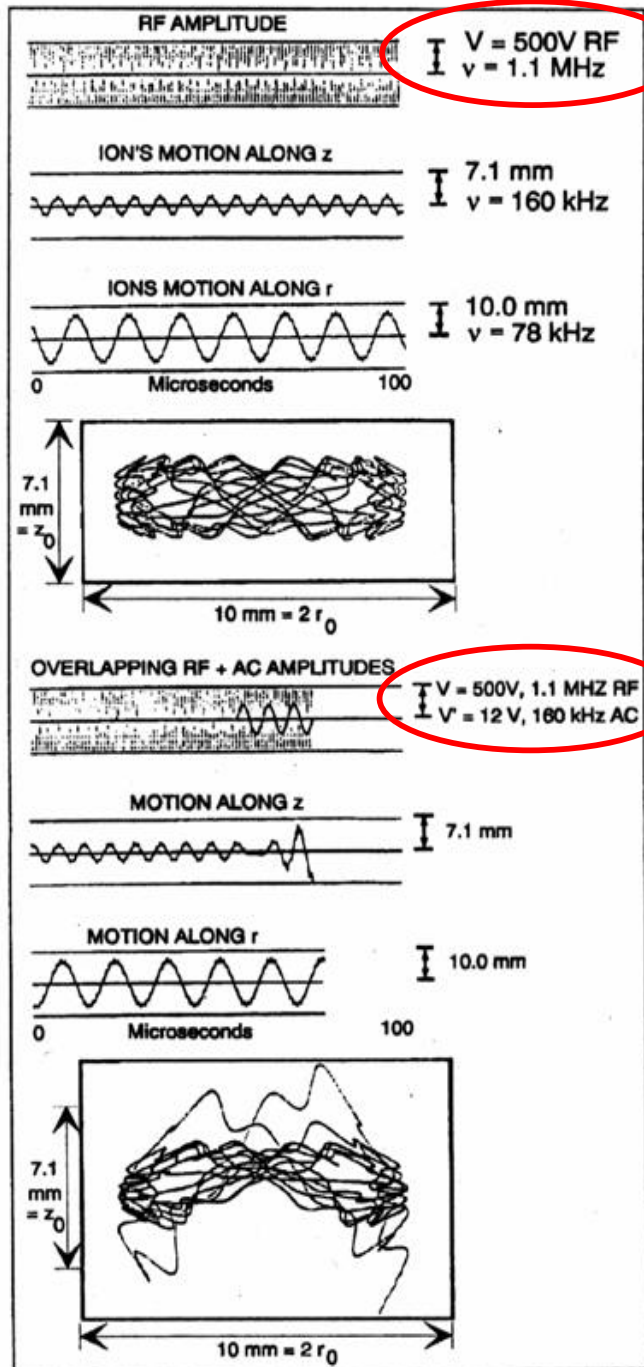
Lo ione continuerebbe a essere stabile su r, ma non lo è più su z e quindi viene convogliato verso il detector.

Cio che influenza il moto degli ioni e che noi possiamo modulare/controlare sono i voltaggi applicati alla trappola (elettrodi).

A valori via via crescenti di V , ioni con m/z via via crescenti sono espulsi (ovvero acquisiscono valori di q_z che li portano ad uscire dalla trappola verso il detector (scansione di instabilità).

Trappola tridimensionale - Scansione del range di m/z variando V





Trappola tridimensionale - Risonanza

Ogni ione oscilla all'interno della trappola con una determinata **frequenza** che dipende dai potenziali applicati agli elettrodi della trappola.

Sovraimponendo a $V \cos \omega t$ un altro potenziale oscillante (**AC, alternating current - radiofrequenza**) in modo che questo abbia la stessa frequenza ad esempio dell'oscillazione lungo l'asse z di un particolare ione (m/z), si fa entrare in risonanza quello ione con la conseguenza che questo verrà destabilizzato lungo l'asse z e quindi espulso verso il detector. Si possono creare quelli che vengono comunemente definiti **buchi di stabilità**

Radiofrequenza (AC) => buco d'instabilità

Trappola tridimensionale - isolamento per risonanza

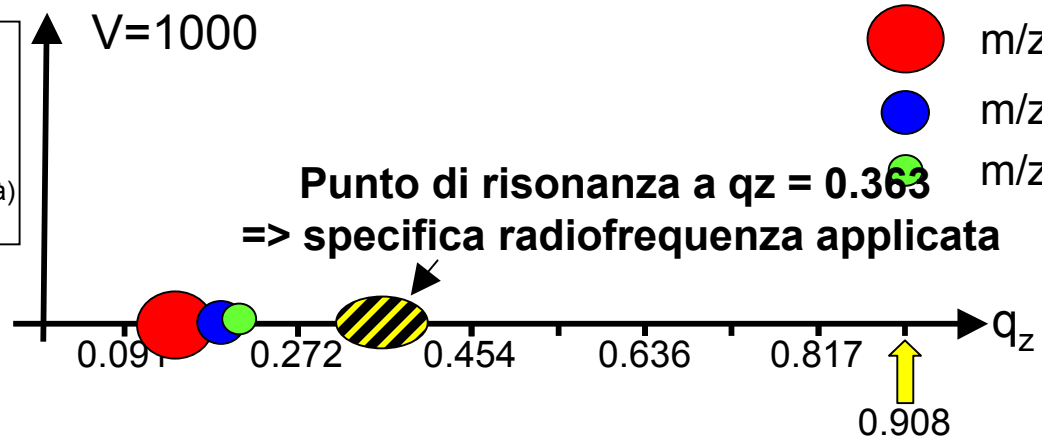
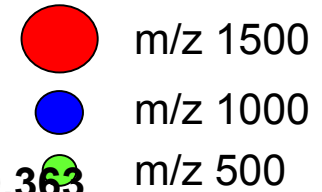
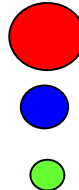
Voltaggi applicati alla trappola

V1000	V1500	V2000
50	60	70
60	70	80
70	80	

Frequenze di oscillazione dello ione



Radiofrequenza Sovrainposta (buco d'instabilità)

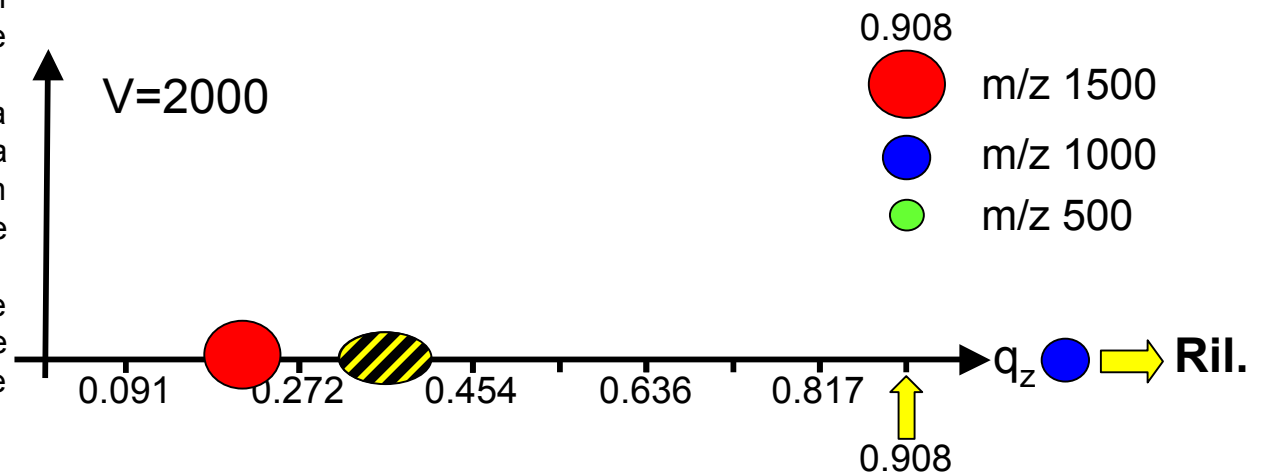
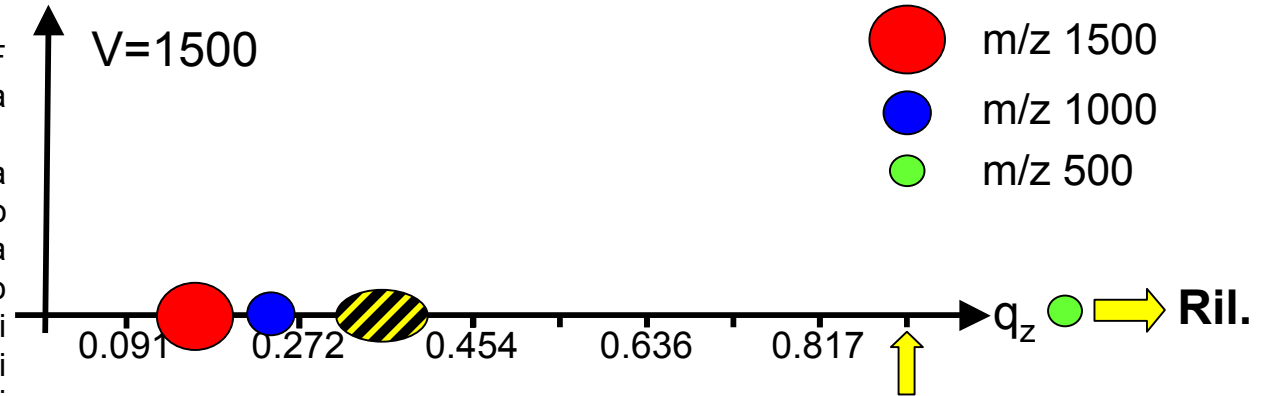


Alla trappola ionica posso applicare una RF (corrente alternata) con una specifica frequenza.

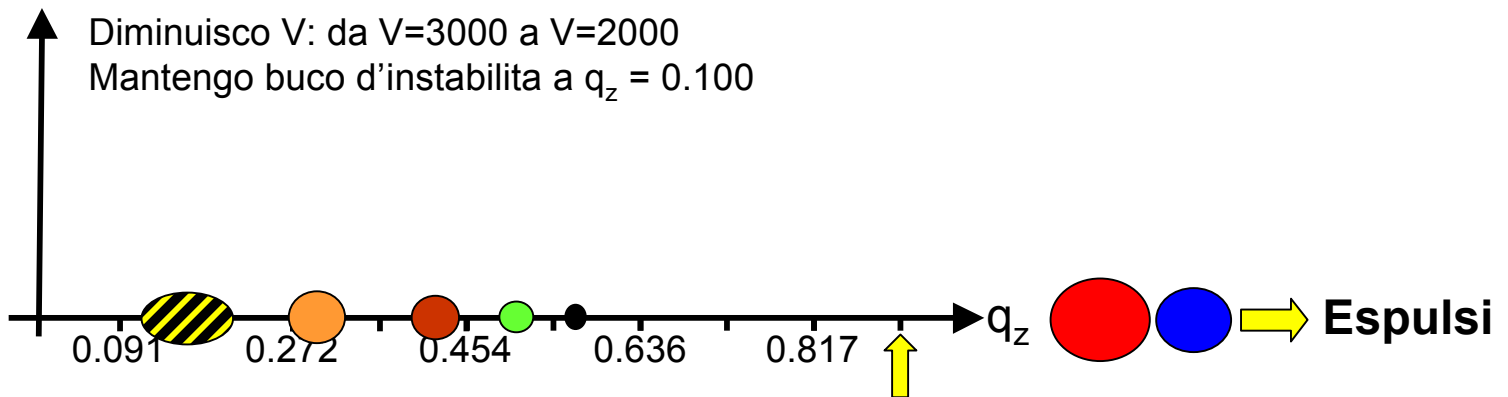
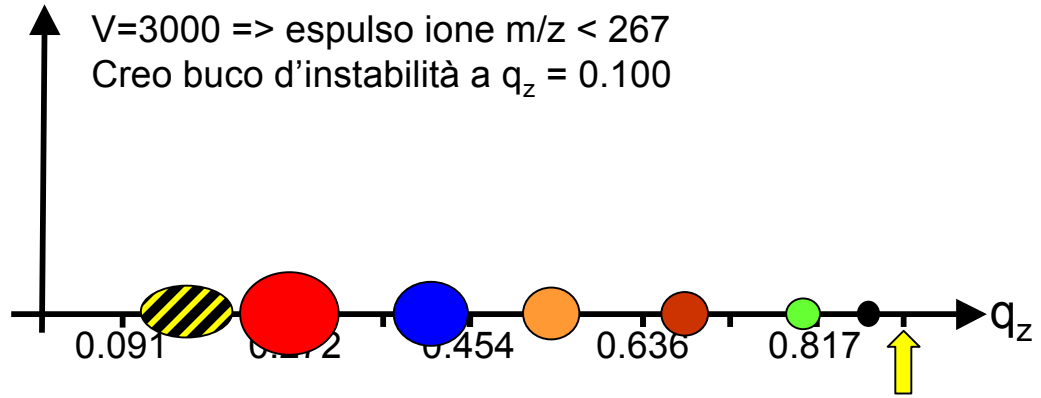
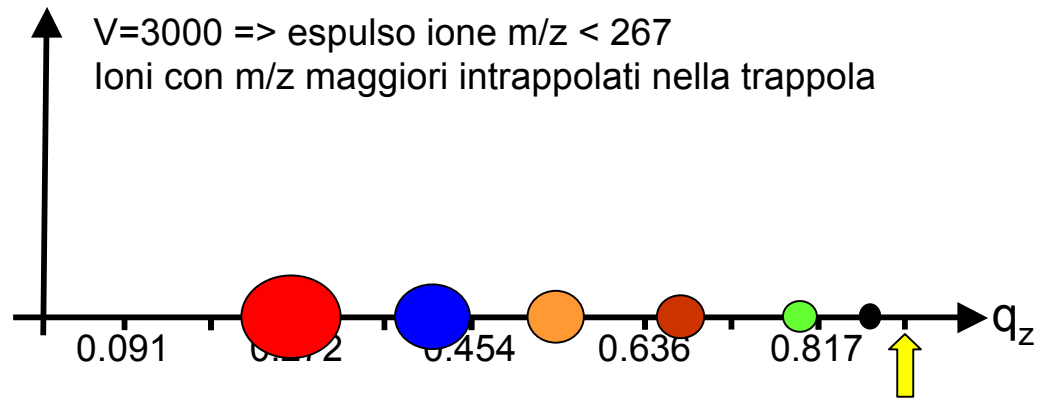
Tutti gli ioni che sono all'interno della trappola oscillano lungo l'asse z (quello dove si trova il detector) con una determinata e specifica frequenza. La loro frequenza di oscillazione dipende dai voltaggi applicati alla trappola. Se i voltaggi applicati alla trappola vengono cambiati di conseguenza cambiano anche le frequenze di oscillazione degli ioni.

Quando uno ione si trova ad avere una frequenza di oscillazione pari alla frequenza delle RF applicata entra in risonanza (cade nel buco d'instabilità) e viene espulso dalla trappola.

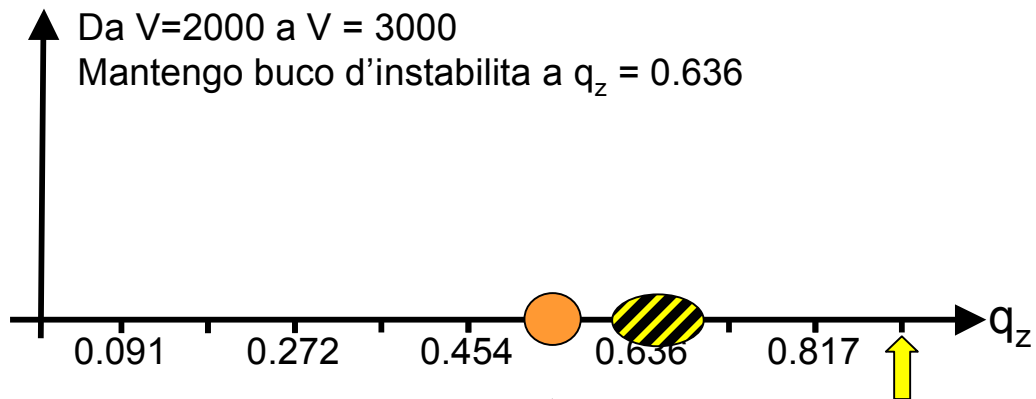
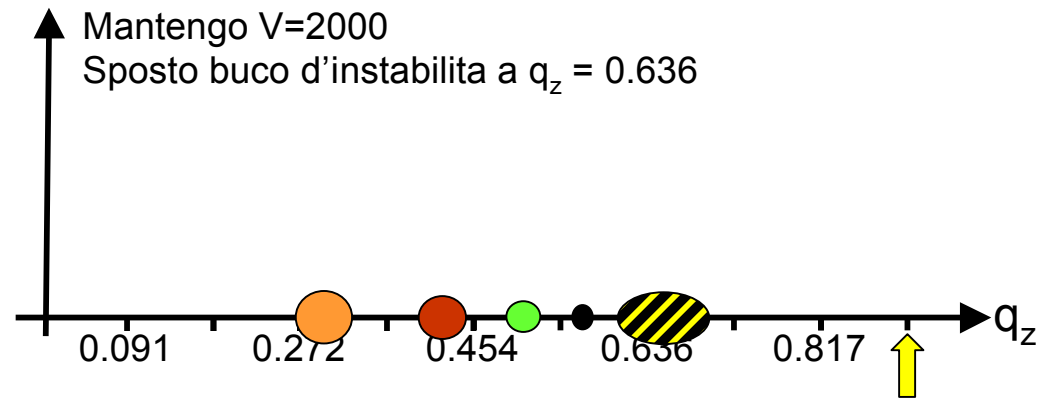
Questo modo di operare può essere utilizzato per isolare uno specifico ione all'interno della trappola (vedasi le due slide successive).



Trappola tridimensionale - isolamento per risonanza



Trappola tridimensionale - isolamento per risonanza

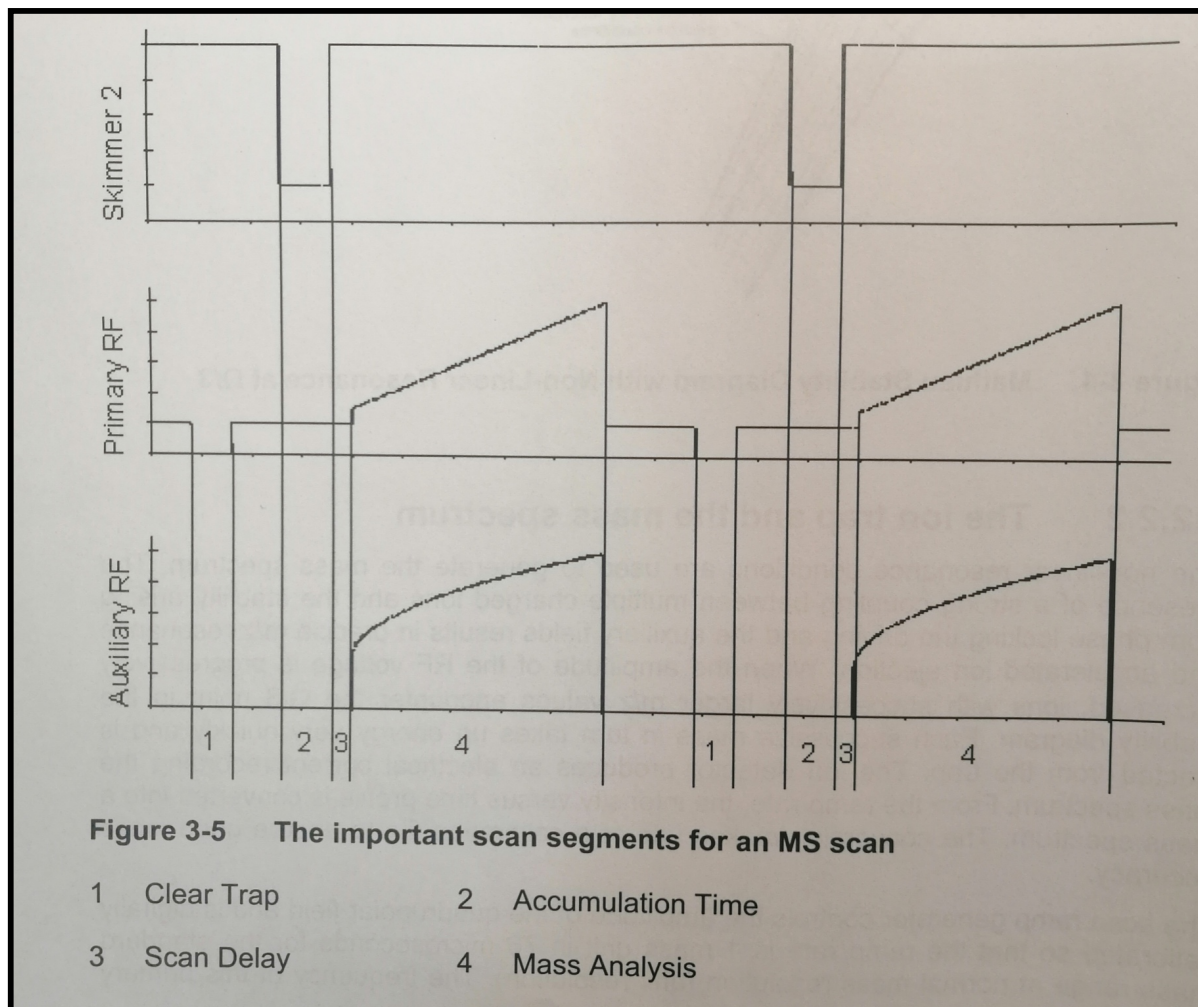


● ● ● → Espulsi

Nella trappola è presente solo ●

Possibilità di isolare un determinato ione (m/z)
e su questo di andare ad esempio ad
effettuare esperimenti di tipo MS/MS

Trappola tridimensionale - in pratica



SKIMMER:

lente per accesso alla trappola

Primary RF:

RF applicata al ring

Auxiliary RF:

RF applicata agli endcap

La combinazione dell'aumento della primary RF con l'aumento della auxiliary RF rende particolarmente eff

Fourier transform-ion cyclotron resonance - FT-ICR

Quando uno ione entra in un campo magnetico uniforme, esso assume una traiettoria circolare perpendicolare al campo magnetico.

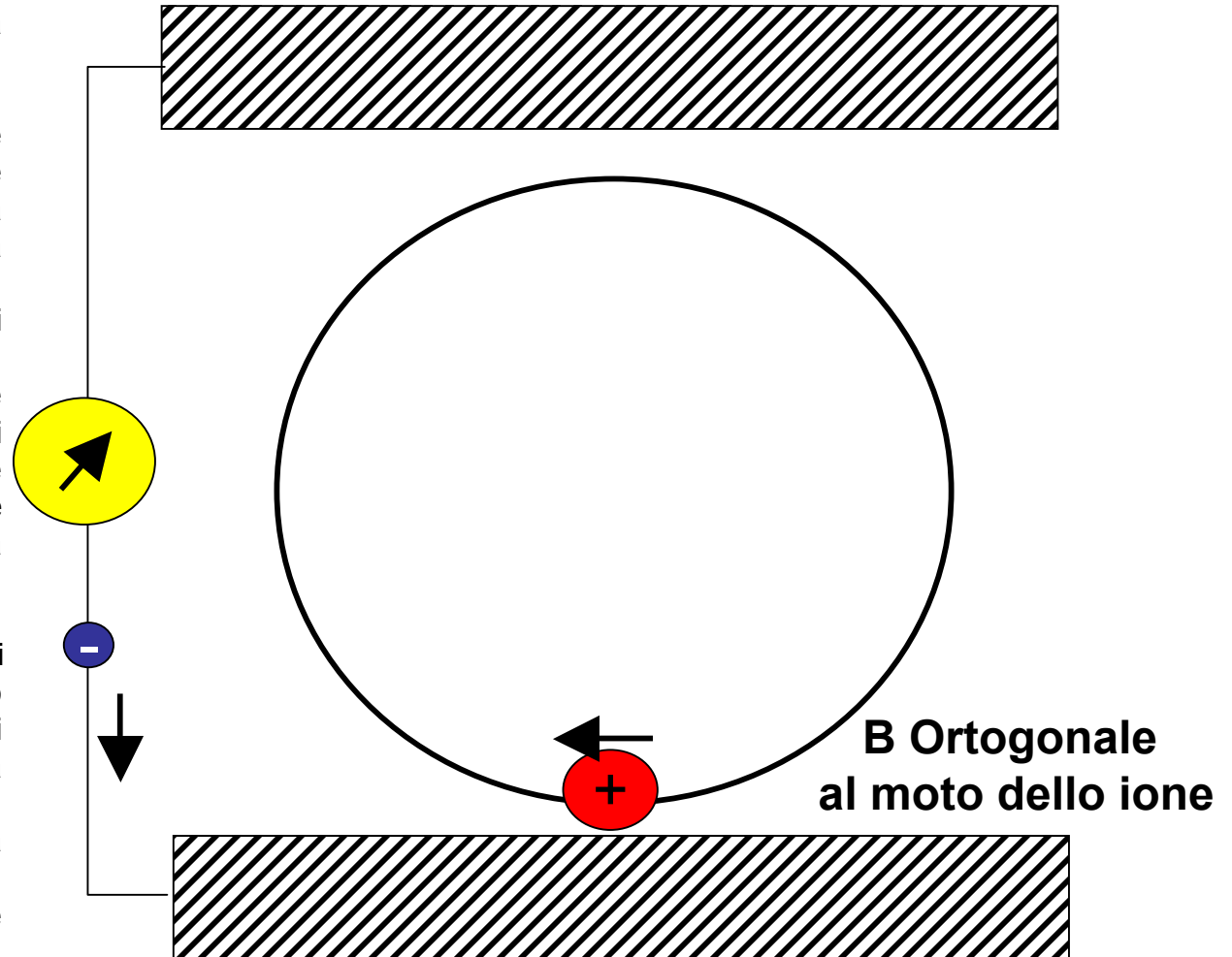
La frequenza di rotazione dello ione all'interno del campo magnetico è direttamente proporzionale alla sua carica e inversamente proporzionale alla sua massa.

C'è quindi una **relazione** tra **frequenza** di oscillazione e **m/z**.

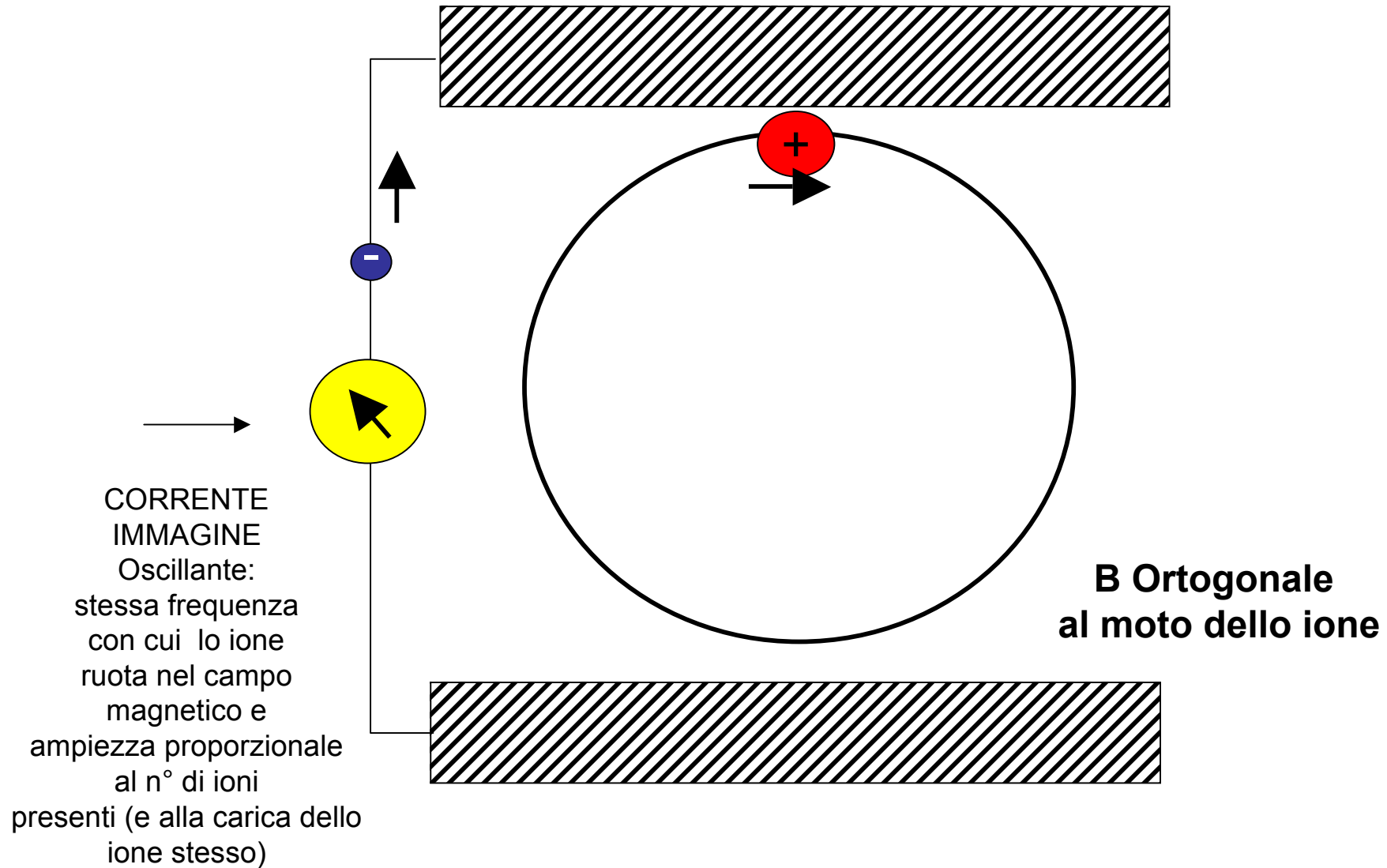
Gli ioni che oscillano possono essere sfruttati per generare delle correnti indotte, attraverso le quali è possibile risalire sia ai valori di m/z che alle abbondanze degli ioni presenti nella cella di ICR.

Il sistema però funziona solo se gli ioni vengono "**messi in fase**" (ioni aventi stesso m/z che si muovono in modo coerente come "pacchetti") e se questi ioni hanno un raggio nella loro traiettoria sufficientemente grande da avvicinarsi alle piastre deposte alla rilevazione della corrente indotta.

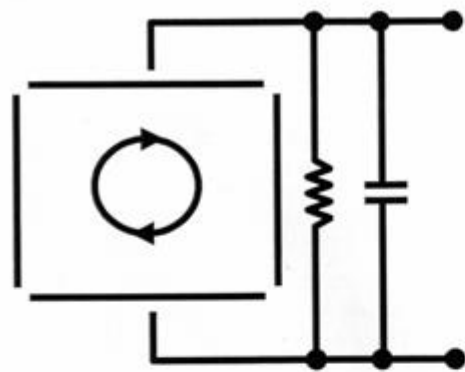
Si usano delle RF che eccitano e permettono di registrare quei particolari ioni che entrano in risonanza (stessa frequenza di oscillazione della RF applicata alla cella ICR).



Fourier transform-ion cyclotron resonance - FT-ICR



Fourier transform-ion cyclotron resonance - FT-ICR



Differential
Amplifier

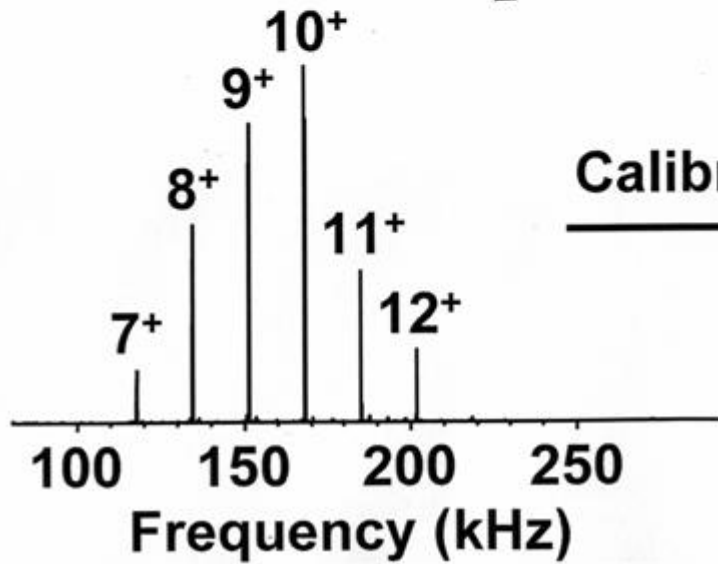
Image
Current

Bovine
Ubiquitin

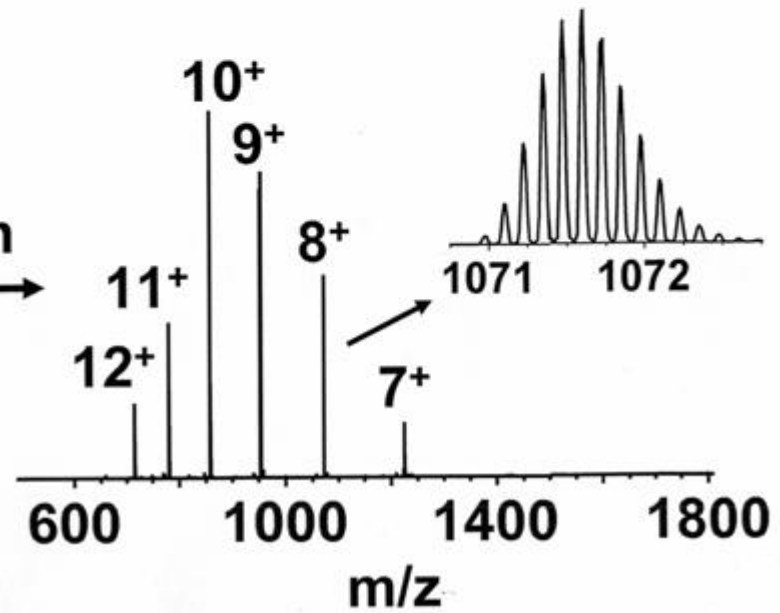
0

80 240 400
Time (ms)

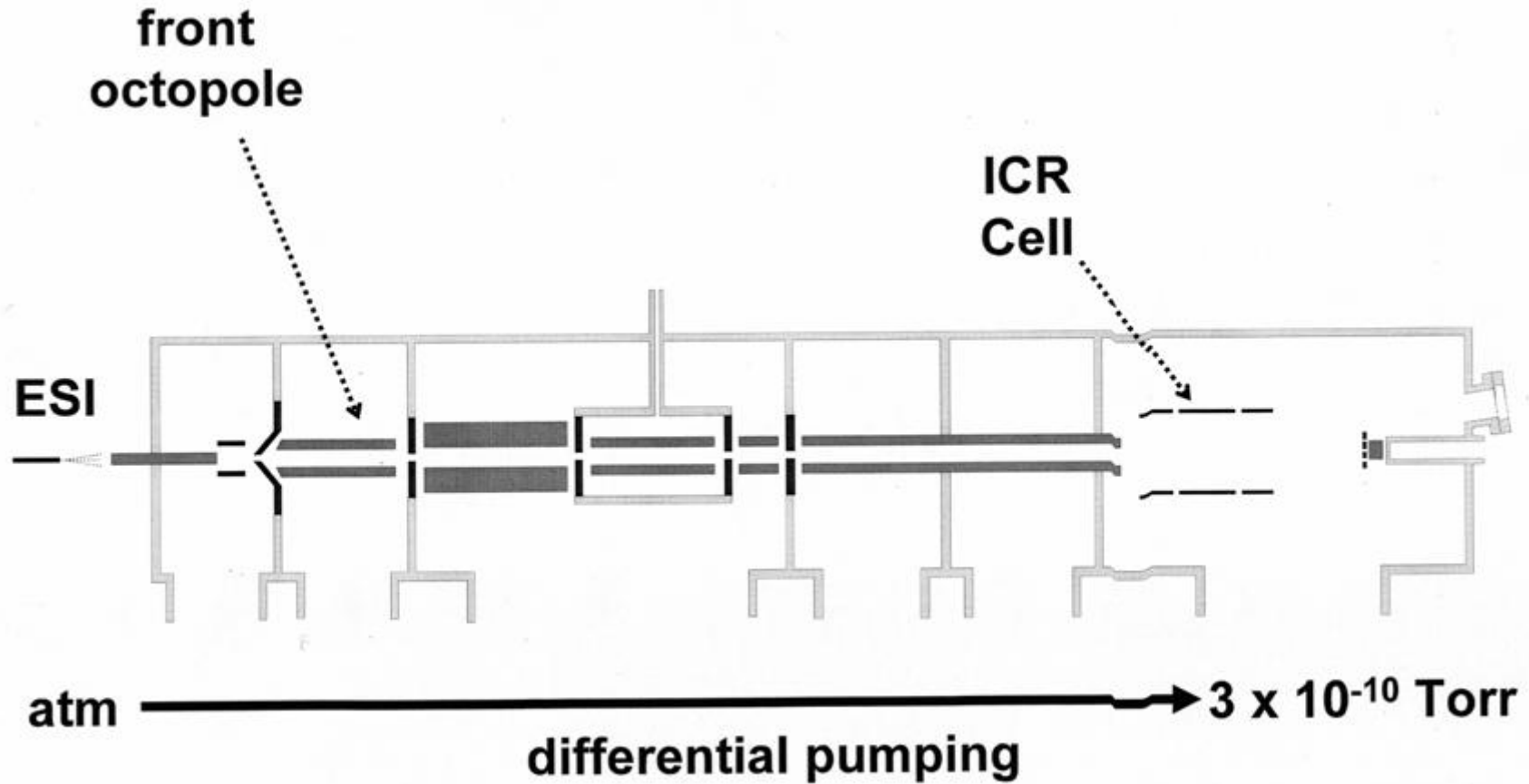
FT



Calibration



Fourier transform-ion cyclotron resonance - FT-ICR



Una caratteristica peculiare di questi strumenti è il fatto che la cella ICR richiede un vuoto molto spinto affinché gli ioni in essa contenuti possano orbitare liberamente e comportarsi in modo “ideale” dando luogo alla possibilità di registrare le correnti indotte.

Orbitrap

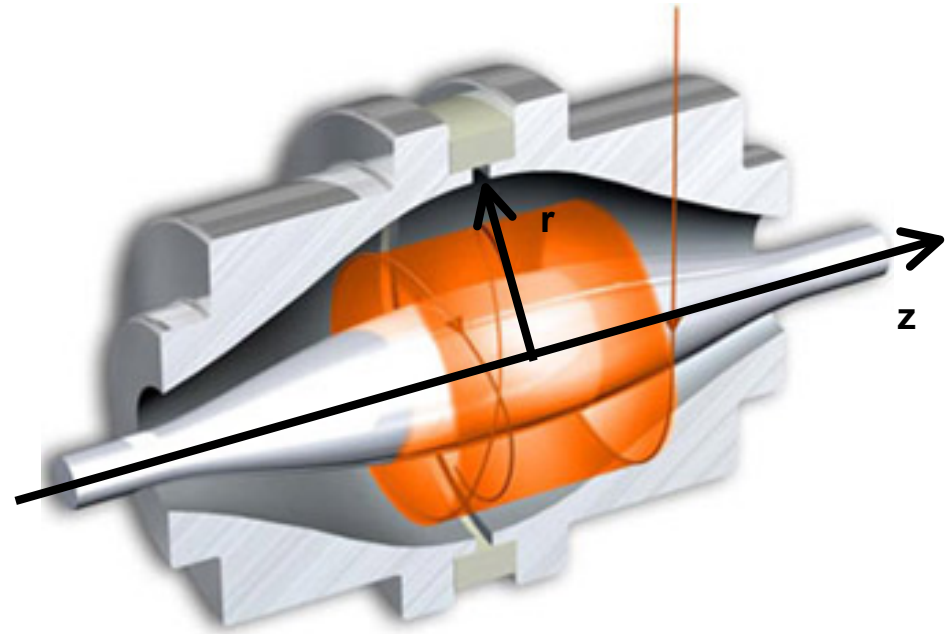
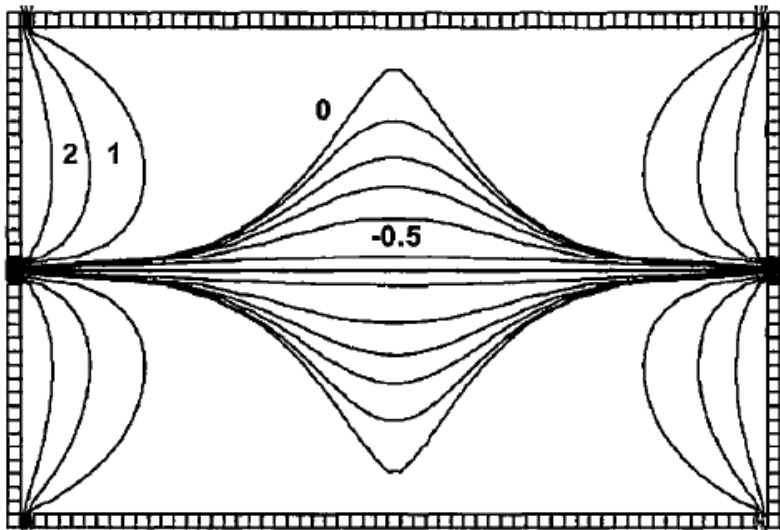
L'orbitrap deriva dallo sviluppo della trappola di Kingdom (1923)

Gli ioni introdotti in trappola ortogonalmente all'asse z , ed in una posizione differente rispetto al suo centro ($z=0$) vengono "intrappolati" all'interno della trappola poichè assumono un'orbità stabile.

Da cosa dipende l'intrappolamento:

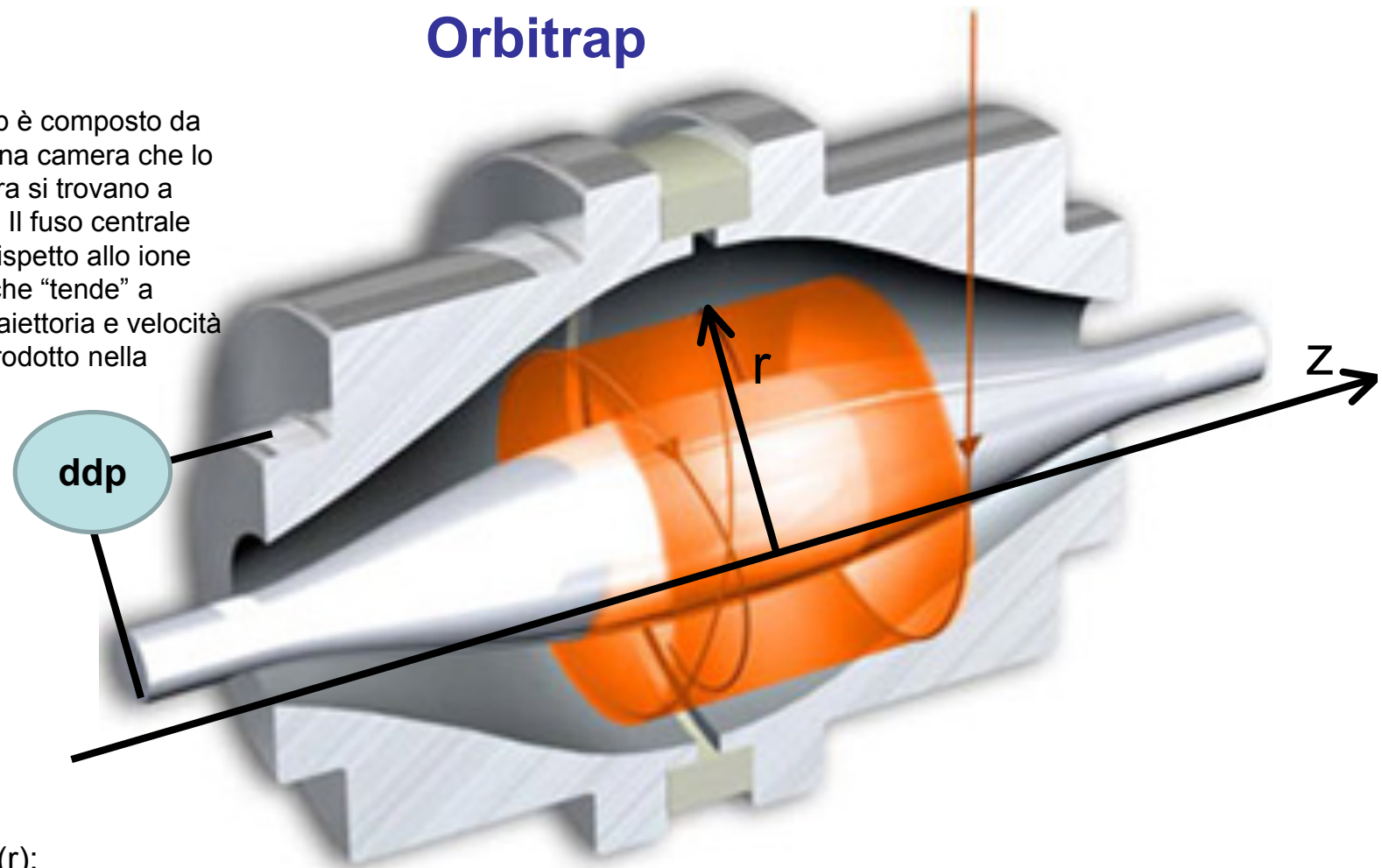
- a) Energia d'entrata nella trappola
- b) Potenziale della trappola

Linee equipotenziali in una trappola di Kingdom



Orbitrap

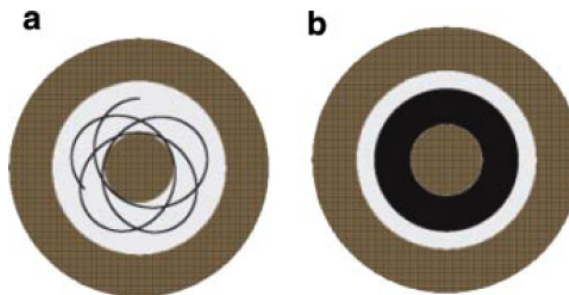
Un analizzatore orbitrap è composto da un fuso centrale e da una camera che lo contiene. Fuso e camera si trovano a potenziali diversi (ddp). Il fuso centrale esercita un'attrazione rispetto allo ione che viene introdotto e che "tende" a sfuggire per via della traiettoria e velocità con la quale è stato introdotto nella camera.



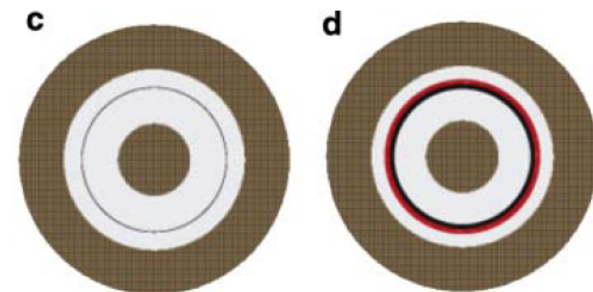
Moto Rotazionale (r):

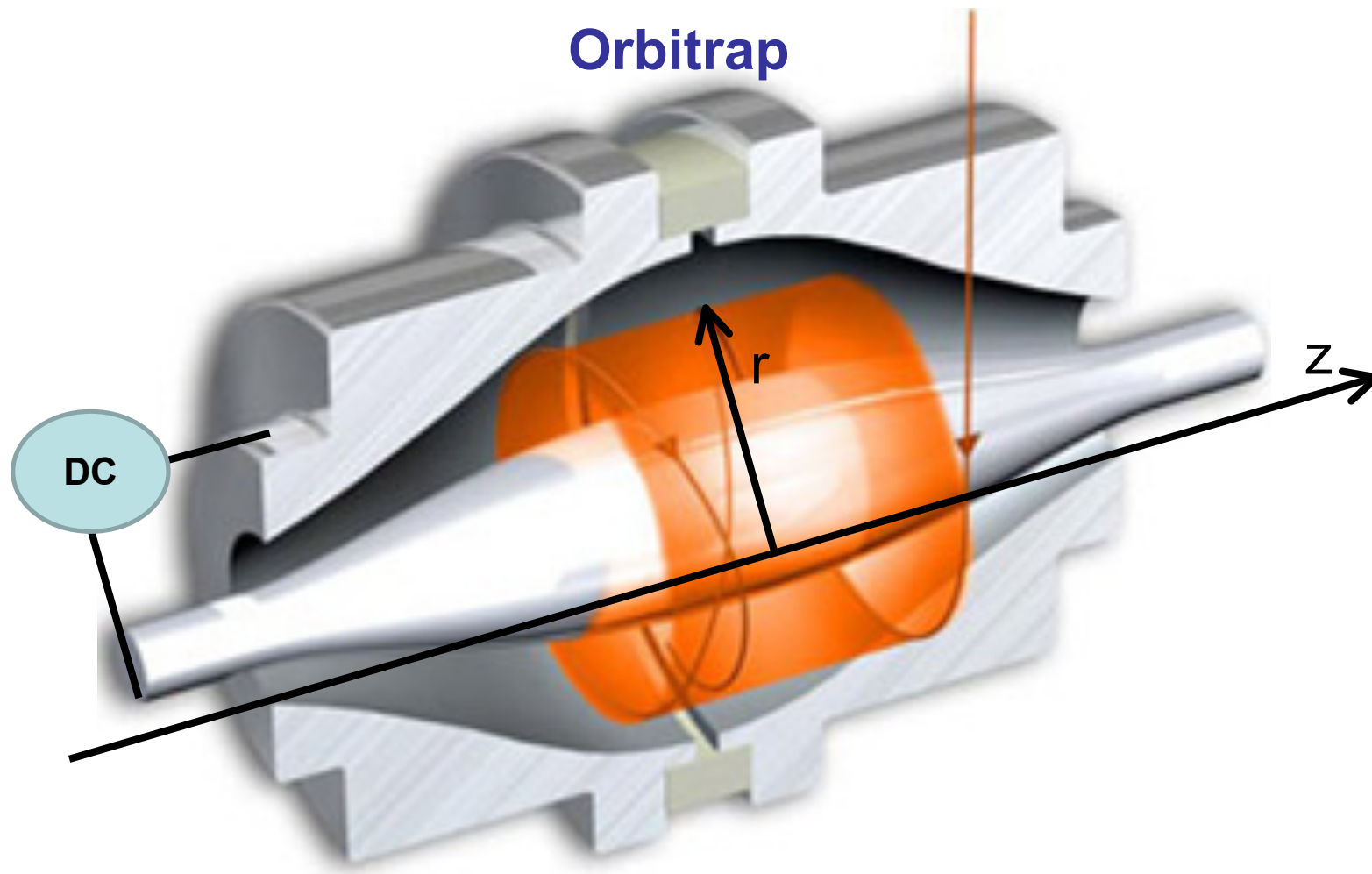
Dipende dalla posizione degli ioni e dalla loro energia cinetica – Una traiettoria stabile prevede che ci sia un **bilanciamento** tra **forza centrifuga** (energia cinetica dello ione) e **forza centripeta** (attrazione elettrostatica). Gli ioni non sono in fase.

Non Stabili



Stabili



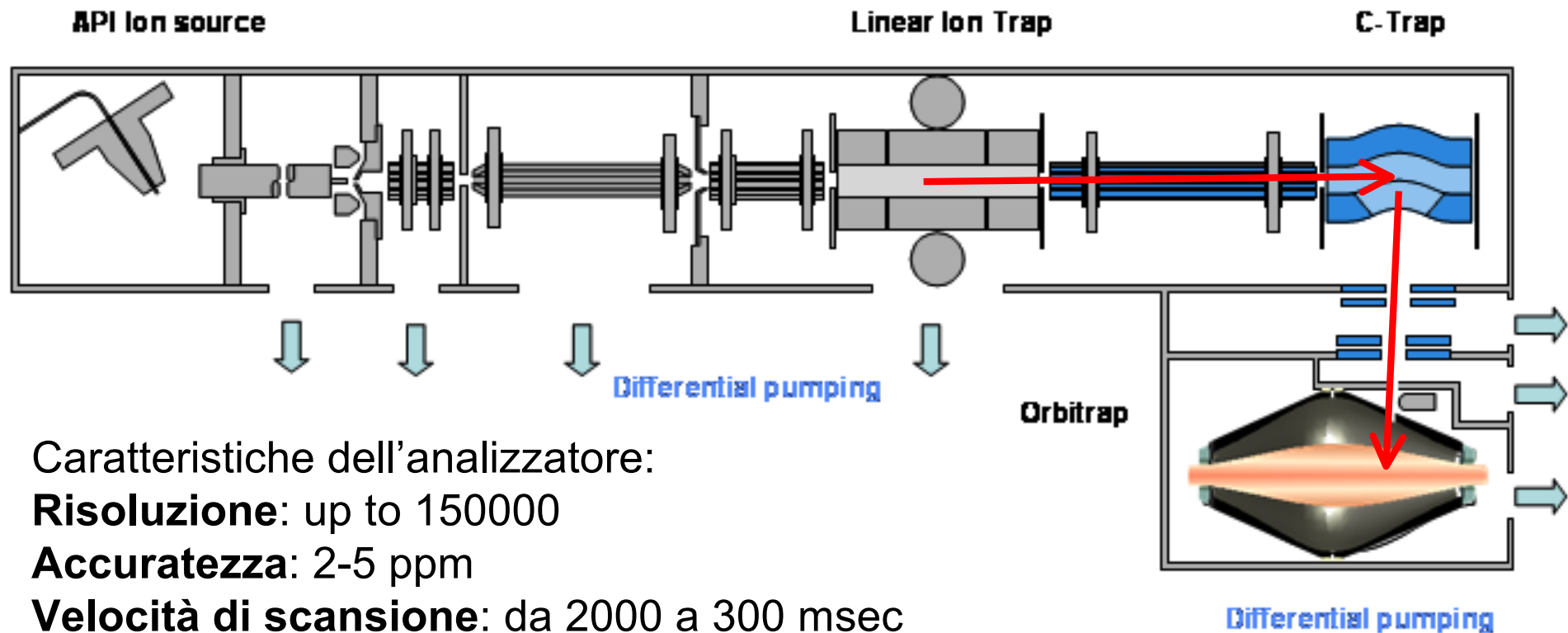


Moto assiale(z):

non dipende dalla posizione degli ioni e dalla loro energia cinetica ma solo dal loro rapporto m/z .
Per un certo periodo (numero di oscillazioni – asse z) tutti gli ioni con il medesimo m/z sono in fase.
Gli anelli di ioni si muovono con una frequenza che dipende dal loro m/z e generano delle correnti indotte sugli elettrodi esterni => tramite la trasformata di Fourier dalla frequenza si ricava il rapporto m/z

Orbitrap

Dal momento che la misura del m/z dipende dalla frequenza della corrente indotta registrata sugli elettrodi esterni e dal momento che l'influenza del campo elettrico comincia non appena gli ioni entrano nella trappola, gli ioni devono essere introdotti in un tempo ridotto (100-200 nsec) e sotto forma di una "nuvola" di dimensioni ridotte (pochi mm^3).
La C-Trap è una ion storage device, in grado sia di accumulare un elevato numero di ioni e di espellerli radialmente in modo estremamente focalizzato.



Caratteristiche dell'analizzatore:

Risoluzione: up to 150000

Accuratezza: 2-5 ppm

Velocità di scansione: da 2000 a 300 msec
con R diverse: maggiore tempo di scansione =>
maggiore risoluzione.

Range: up to 6000 m/z

RILEVATORI / Detector

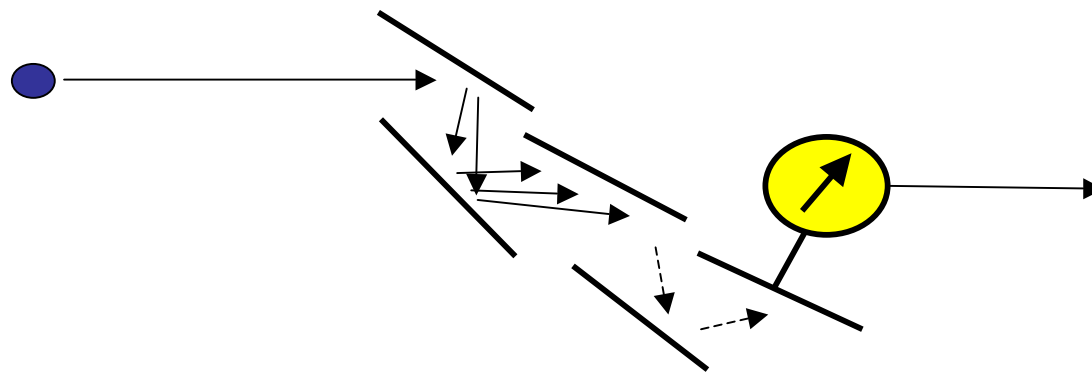
Oltre che segnalare la presenza di uno ione devono anche fornire un segnale proporzionale al n° di ioni che arriva in quel momento. Di possibili detector ne esistono di diversi tipi:

- a) Faraday cup
- b) Electromultiplier
- c) Photomultiplier
- d) Micro Channel cup

Solitamente si basano sulla generazione di elettroni/fotoni a seguito dell'impatto di uno ione su una superficie solida. Questi elettroni a loro volta, andando a collidere con un'altra superficie generano altri ioni e così via

=>

Sia ha un moltiplicazione degli elettroni generati con il risultato alla fine di generare un impulso registrabile (corrente), che risulterà proporzionale al numero di ioni iniziali.



SPETTROMETRO DI MASSA
(CRONOMETRO)

Al tempo $t(1)$ arrivano ioni con $m/z(1)$ e generano un segnale $s(1)$

con un intensità proporzionale al numero di ioni arrivati al detector

Intensità del segnale relativo ad m/z è proporzionale al numero di ioni che arrivano al rivelatore

RILEVATORI / Detector

In uno strumento dotato di elettromoltiplicatore gli ioni vengono deflessi da una lente elettrostatica e inviati all'interno del detector. Qui l'impatto dello ione sulla superficie stessa dell'elettromoltiplicatore provoca l'emmissione di elettroni, che a causa della geometria dello stesso, vanno ad impattare dall'altro lato più internamente. Questo processo si ripete un numero n di volte amplificandosi ogni volta, fino a generare una corrente registrabile.

