

# **Introdução à LC/MS**

# Introdução

---

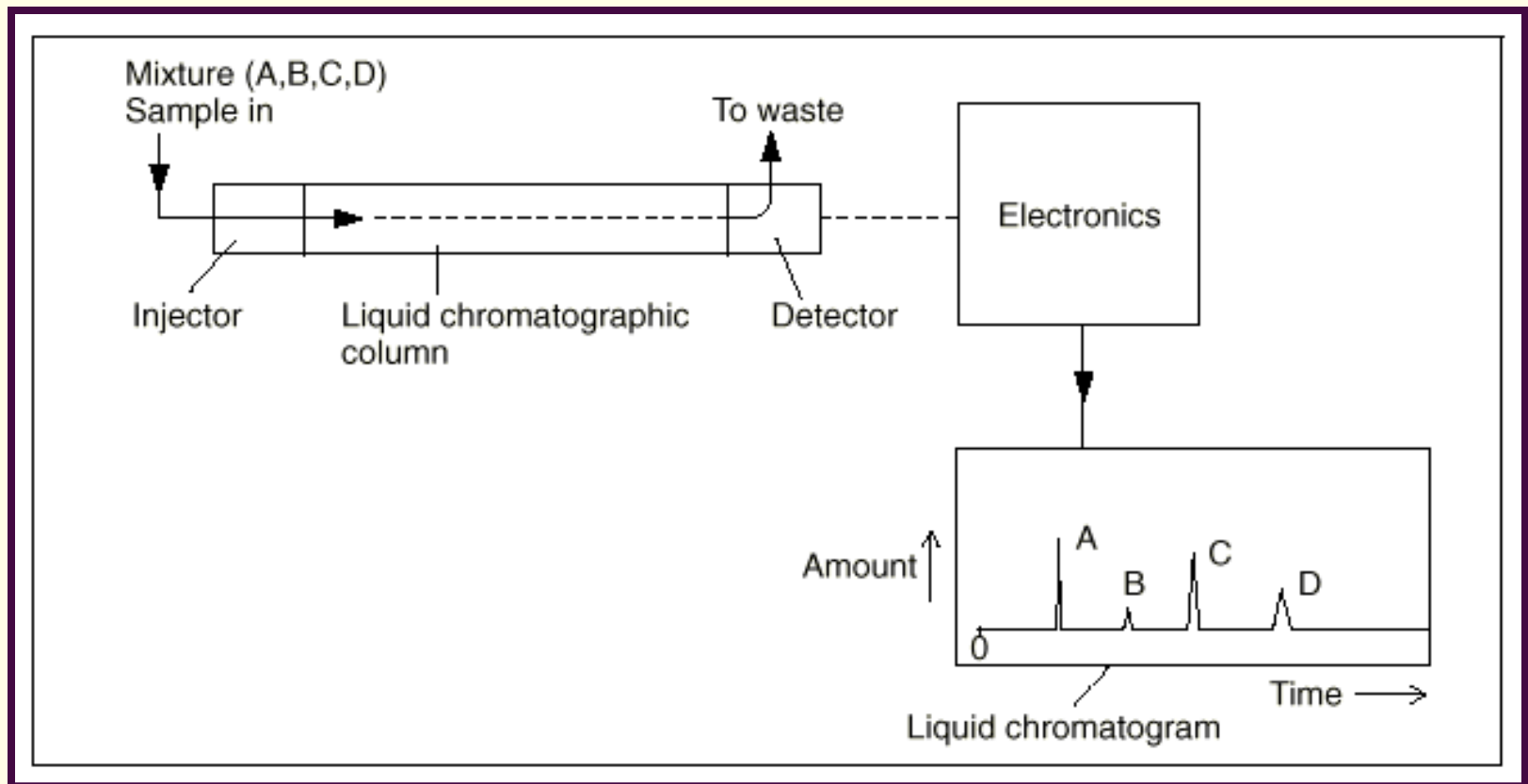
- **LC** provém a separação, em fase líquida, de misturas complexas, porém dificilmente fornece a identificação positiva de componentes individuais.
- **MS** é uma técnica que auxilia na elucidação estrutural de compostos em fase gasosa, porém dificilmente é apropriado para a análise de misturas.
- **LC** opera em fase líquida enquanto que **MS** opera em fase gasosa, sob alto vácuo.

# Introdução

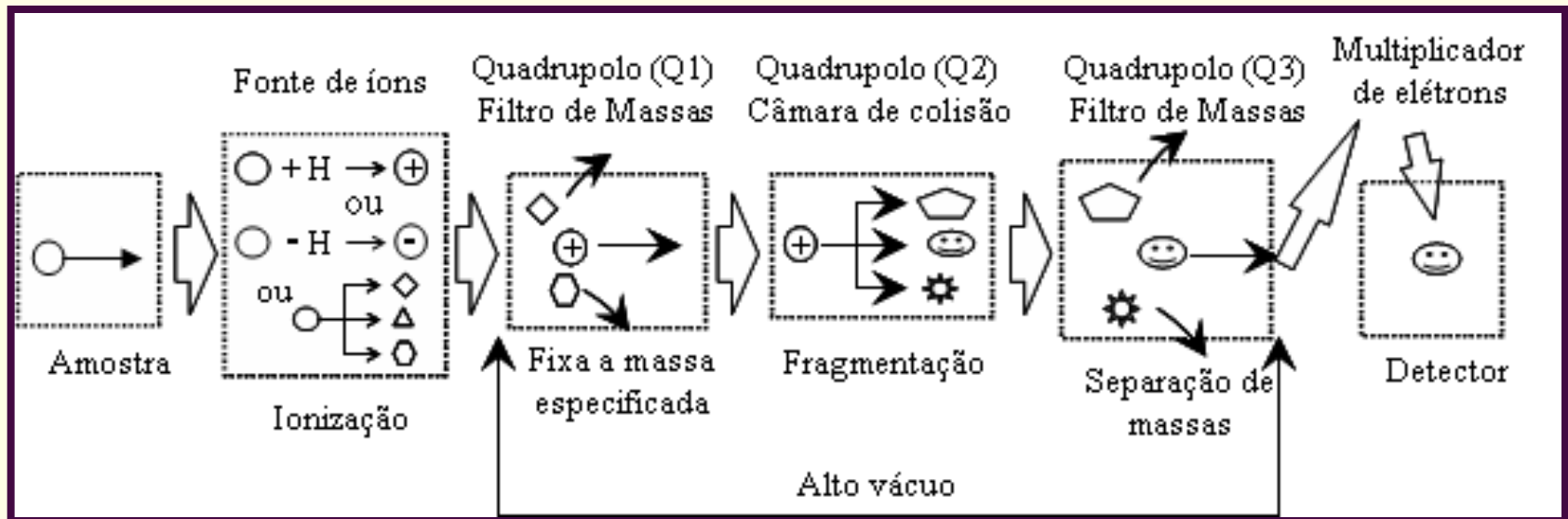
---

- O uso de uma interface é necessário para ter compostos seqüencialmente separados em LC e introduzidos para análise no MS.
- Um bom sistema LC/MS pode fornecer informações quali e quantitativas, geralmente com diminutas quantidades de material.

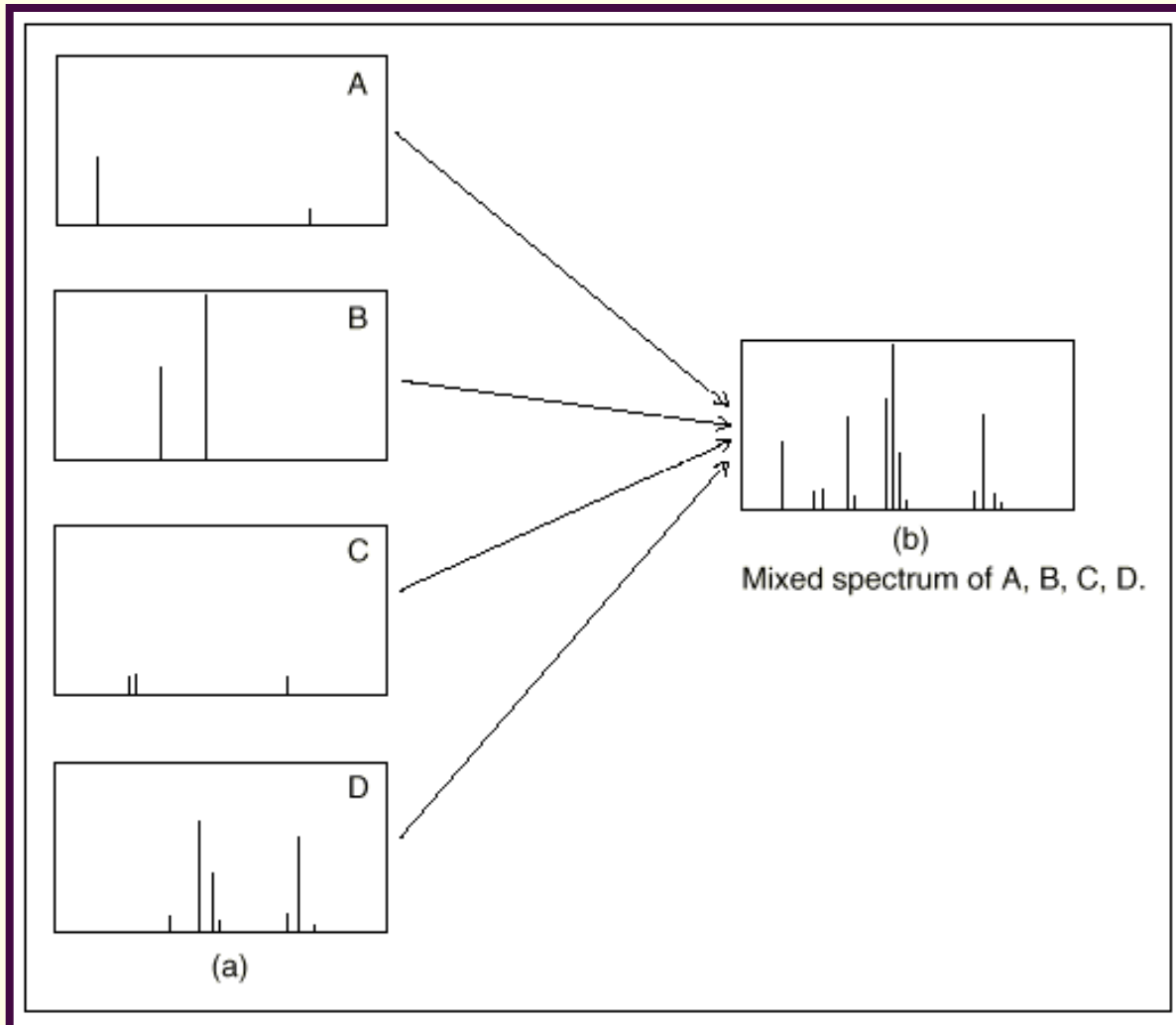
# Cromatografía Líquida



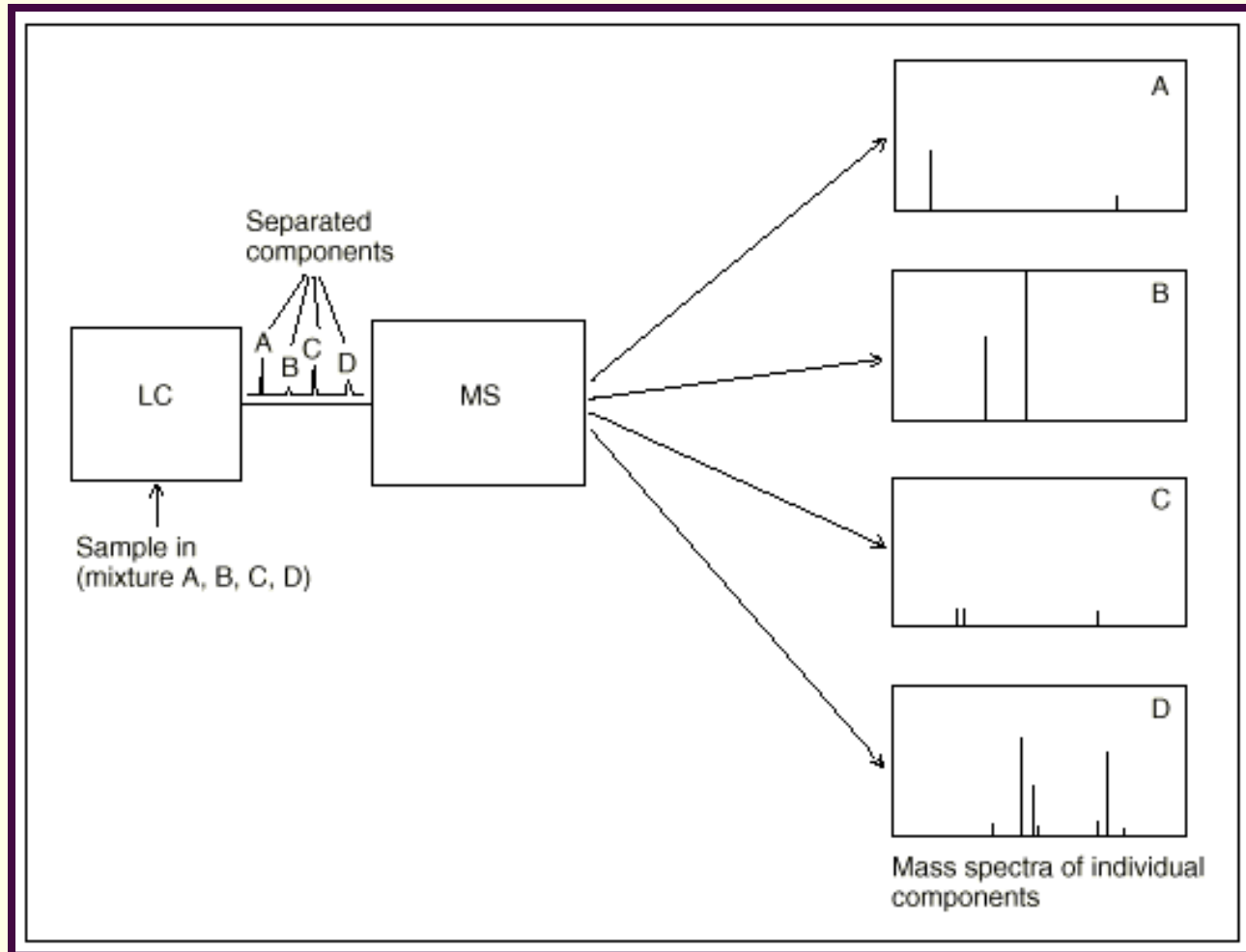
# Espectrometria de Massas



# Misturas em MS

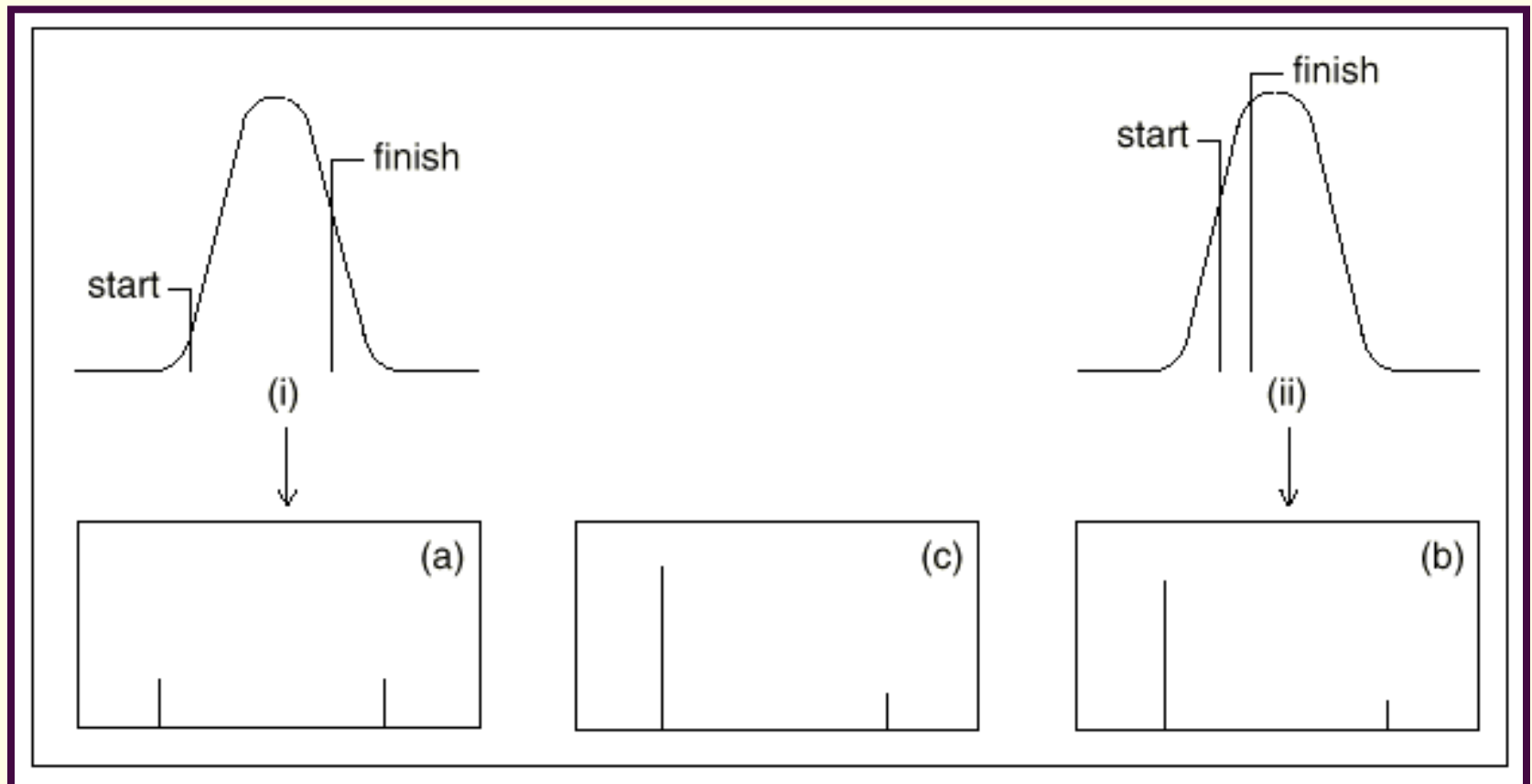


# Combinando LC com MS



# Aquisição dos Dados

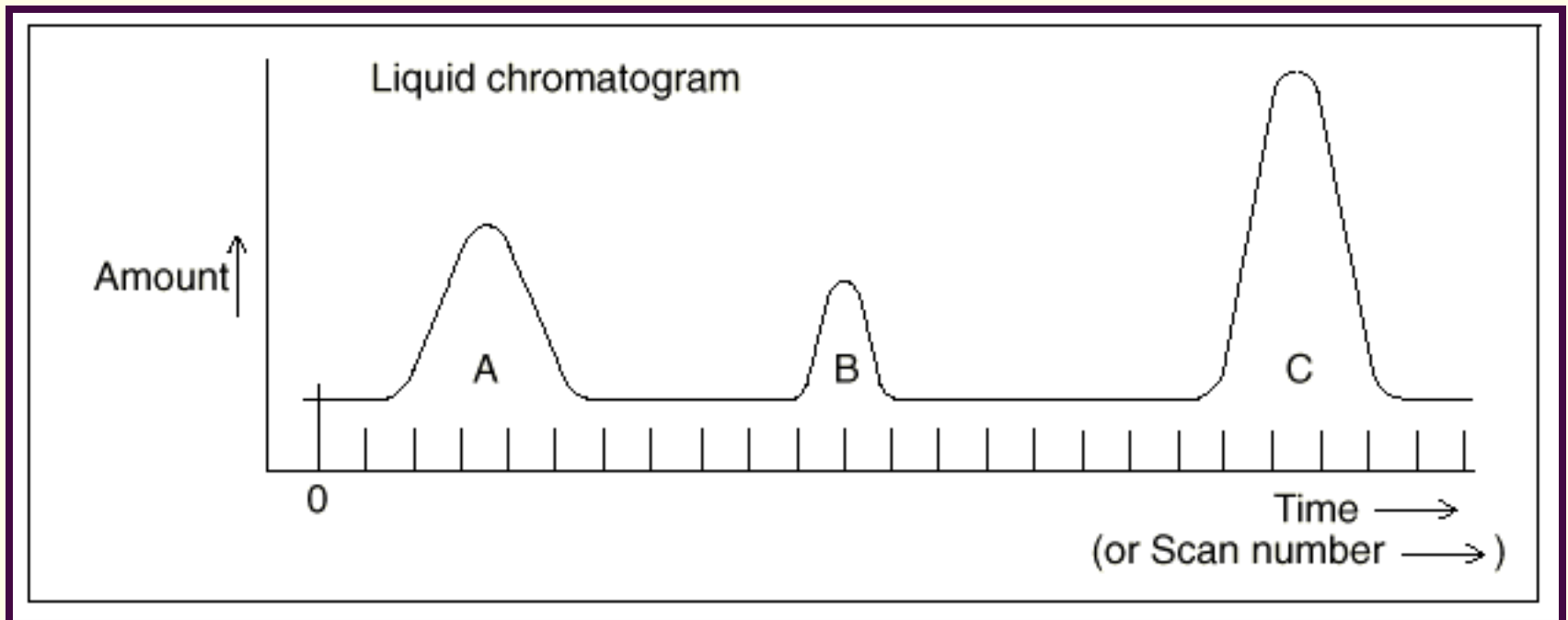
## Velocidade de varredura





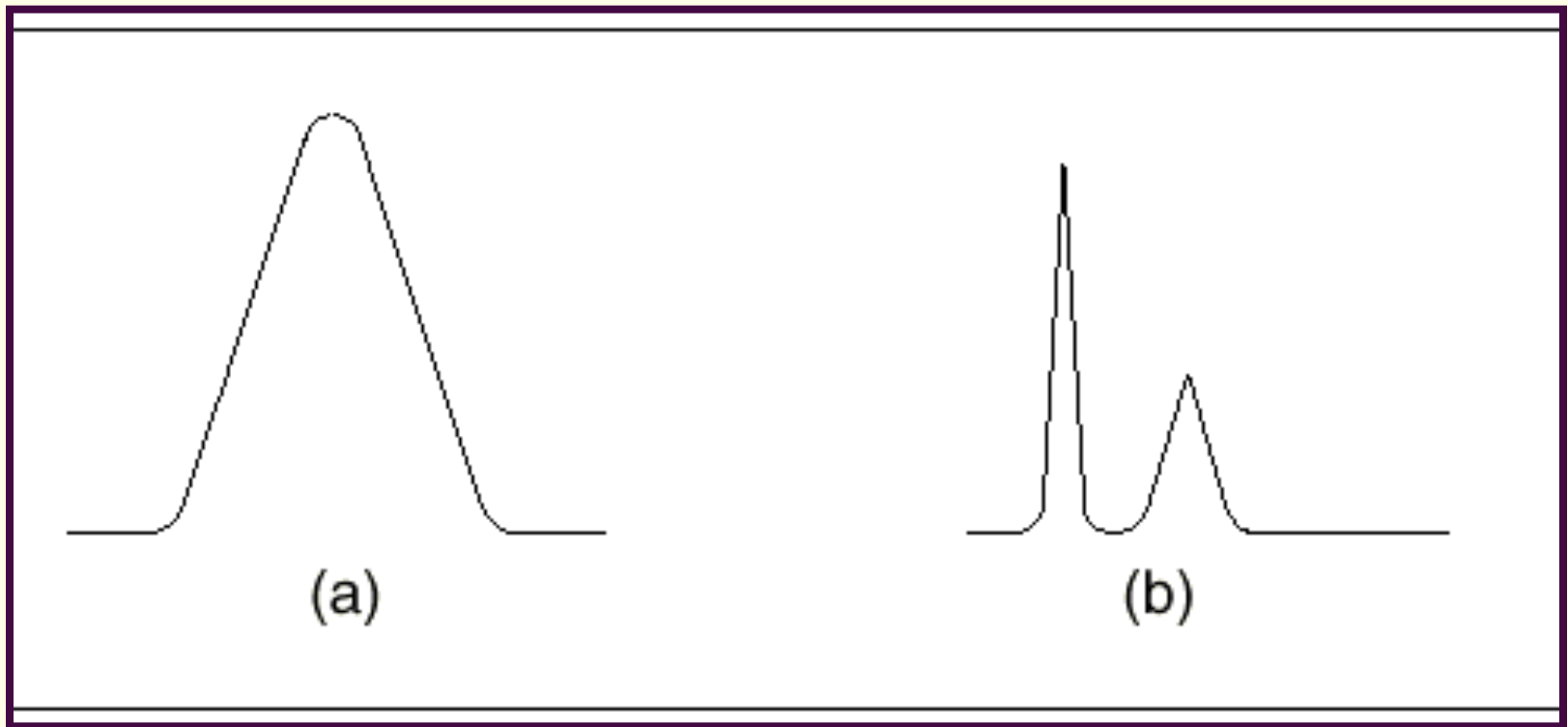
# Aquisição dos Dados

## Número de espectros por pico



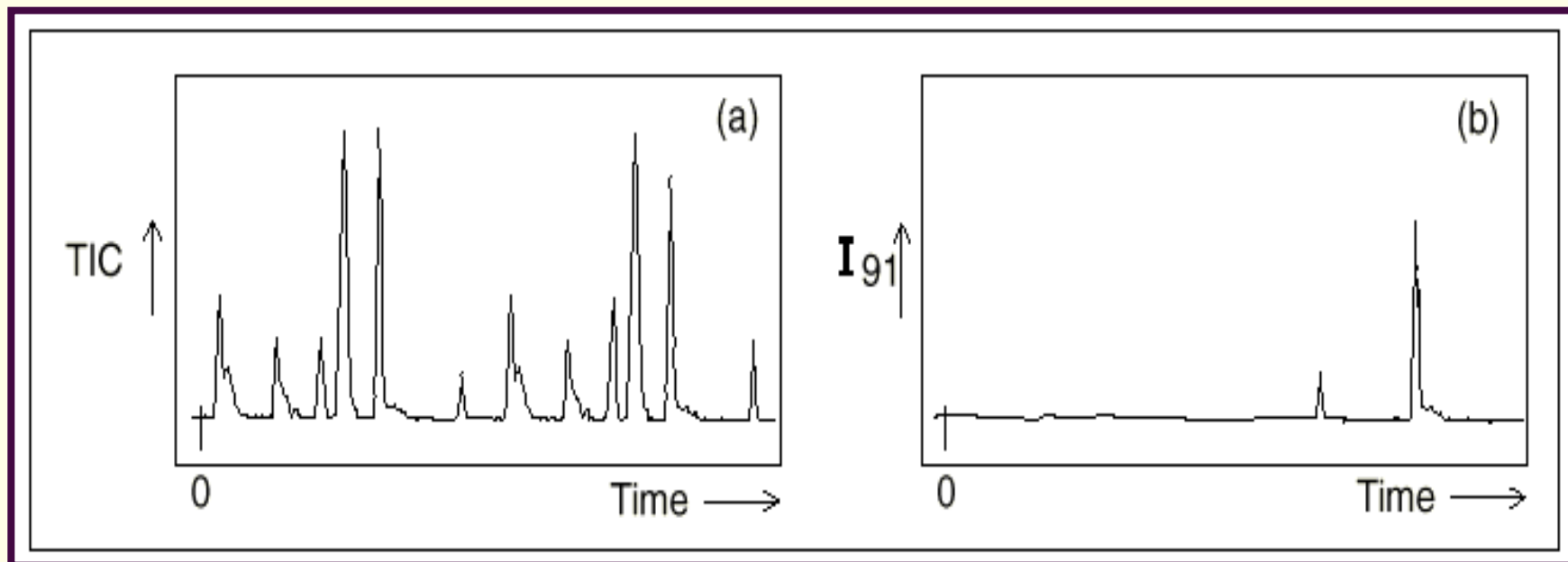
# Melhorando os Resultados

Obter a maior eficiência possível



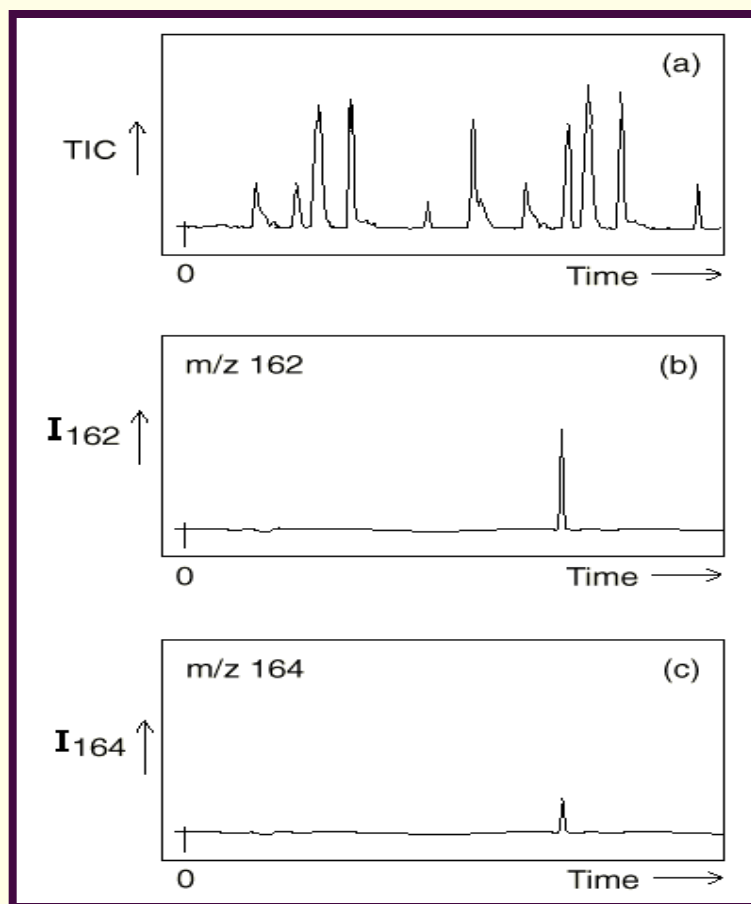
# Melhorando os Resultados

## Apresentação de cromatograma de íon selecionado



# Melhorando os Resultados

## Monitoramento de íon selecionado (SIM)



# Sumário

---

- O interfaceamento de LC com MS resulta em um instrumento poderoso de LC/MS que pode ser usado para análises de misturas complexas, originada de fontes mais variadas.
- Aplicações de interesse nas áreas de meio ambiente, arqueologia, medicina e forense, além de química e bioquímica.

# **Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas —LC/MS**

- **Espectrometria de Massas**
- **Interfaces**
- **Analisadores de Massas**

# I. Espectrometria de Massas (MS)

---

- A espectrometria de massas é uma técnica analítica instrumental utilizada para a análise, em fase gasosa, de átomos ou moléculas de uma amostra que são ionizados e separados de acordo com a razão massa/carga quando submetidos a condições específicas de um campo elétrico e/ou magnético.

# I. Espectrometria de Massas (MS)

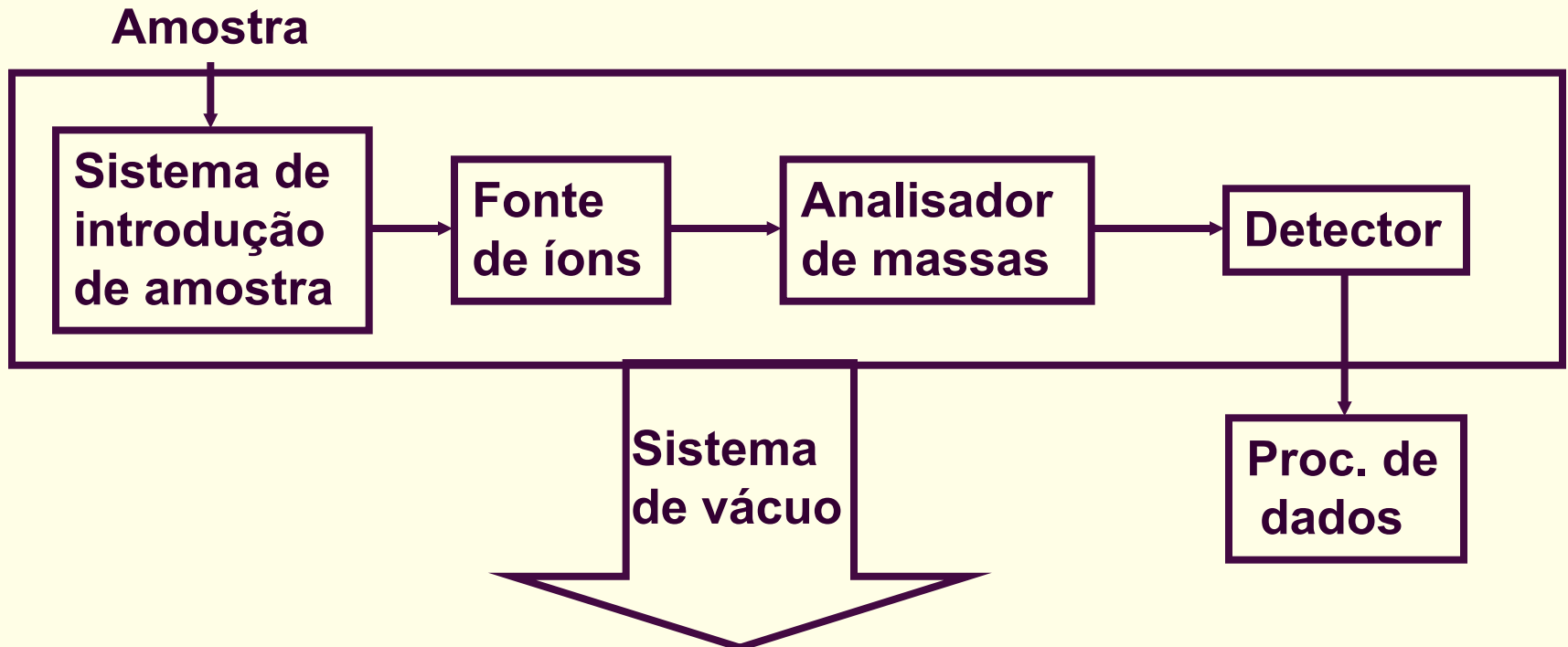
---

- A determinação da massa molecular;
- A caracterização estrutural;
- O estudo da reatividade em fase gasosa;
- A análise qualitativa e quantitativa dos componentes de uma mistura complexa;
- A estrutura de compostos inorgânicos, orgânicos e biológicos;
- A estrutura e composição de superfície sólida;
- A razão isotópica de átomos na amostra.

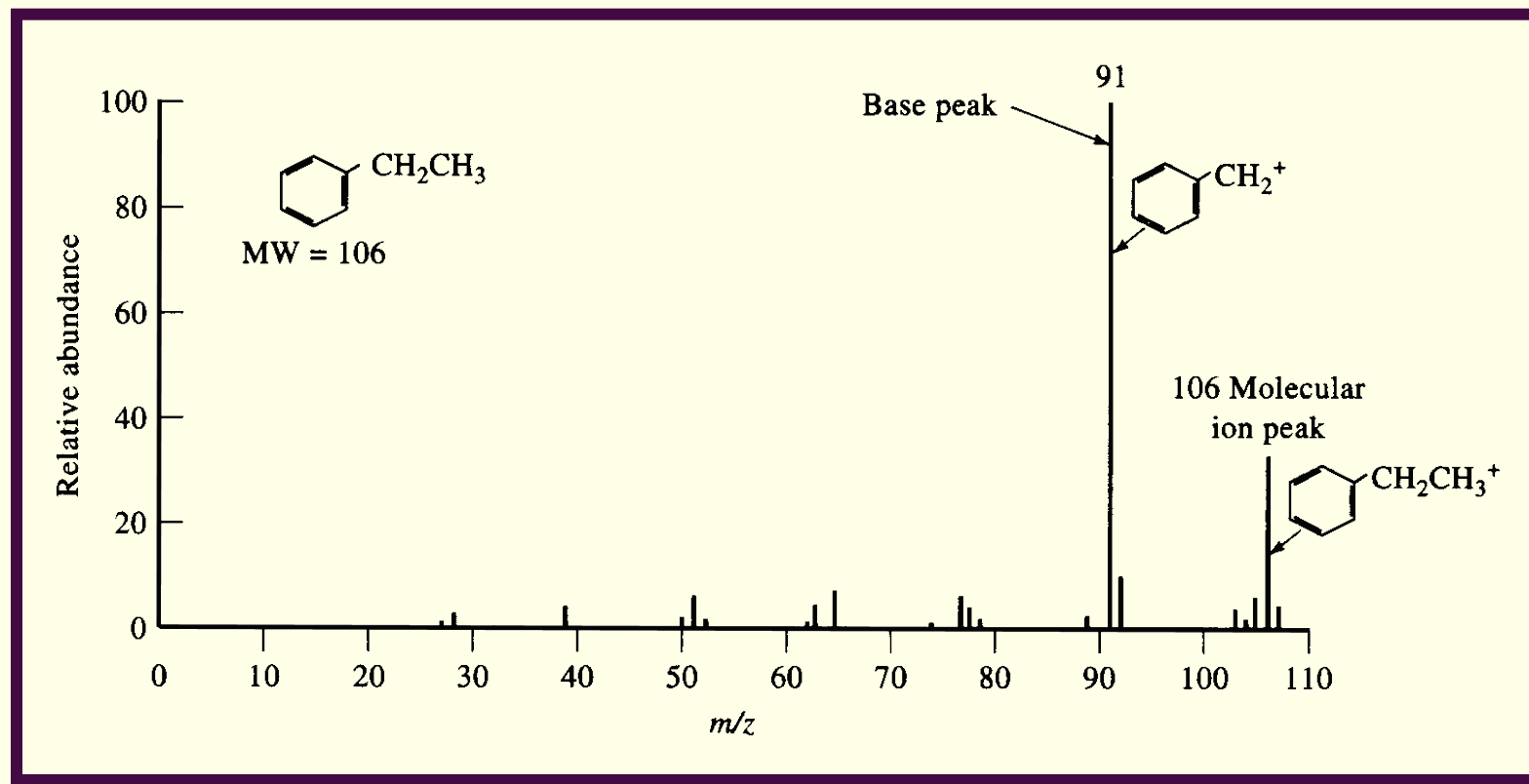


# II. O Espectrômetro de Massas

- Processo de ionização e/ou fragmentação
- Separação dos íons
- Detecção e análise



# Etil benzeno: MM = 106 Da



# Informações do Espectro de Massas

---

- Separação dos íons pela razão massa/carga
- Pico do íon molecular
- Pico do íon base (100%)
- Padrão de fragmentação
- Razão isotópica

# III. Fontes (Processos) de Ionização

<i>Tipo</i>	<i>Nome e Sigla</i>	<i>Agente Ionizante</i>
<i>Básico</i>		
Fase Gasosa	Impacto Eletrônico (EI)	elétrons energéticos
	Ionização Química (CI)	íons gasosos
	Ionização de Campo (FI)	eletrodo alta voltagem
Dessorção	Dessorção de Campo (FD)	eletrodo alta voltagem
	Ionização electrospray (ESI)	alto campo elétrico
	Ionização/dessorção à laser assistido por matriz (MALD/I)	feixe de laser
	Bombardeamento de átomos rápidos (FAB)	feixe átomos acelerados
	Ionização termospray (TS)	alta temperatura

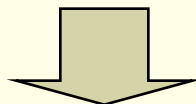
# Impacto Eletrônico ou Ionização por Elétrons

---

- A amostra passa por uma “cortina” de elétrons acelerados por um campo de 70 eV

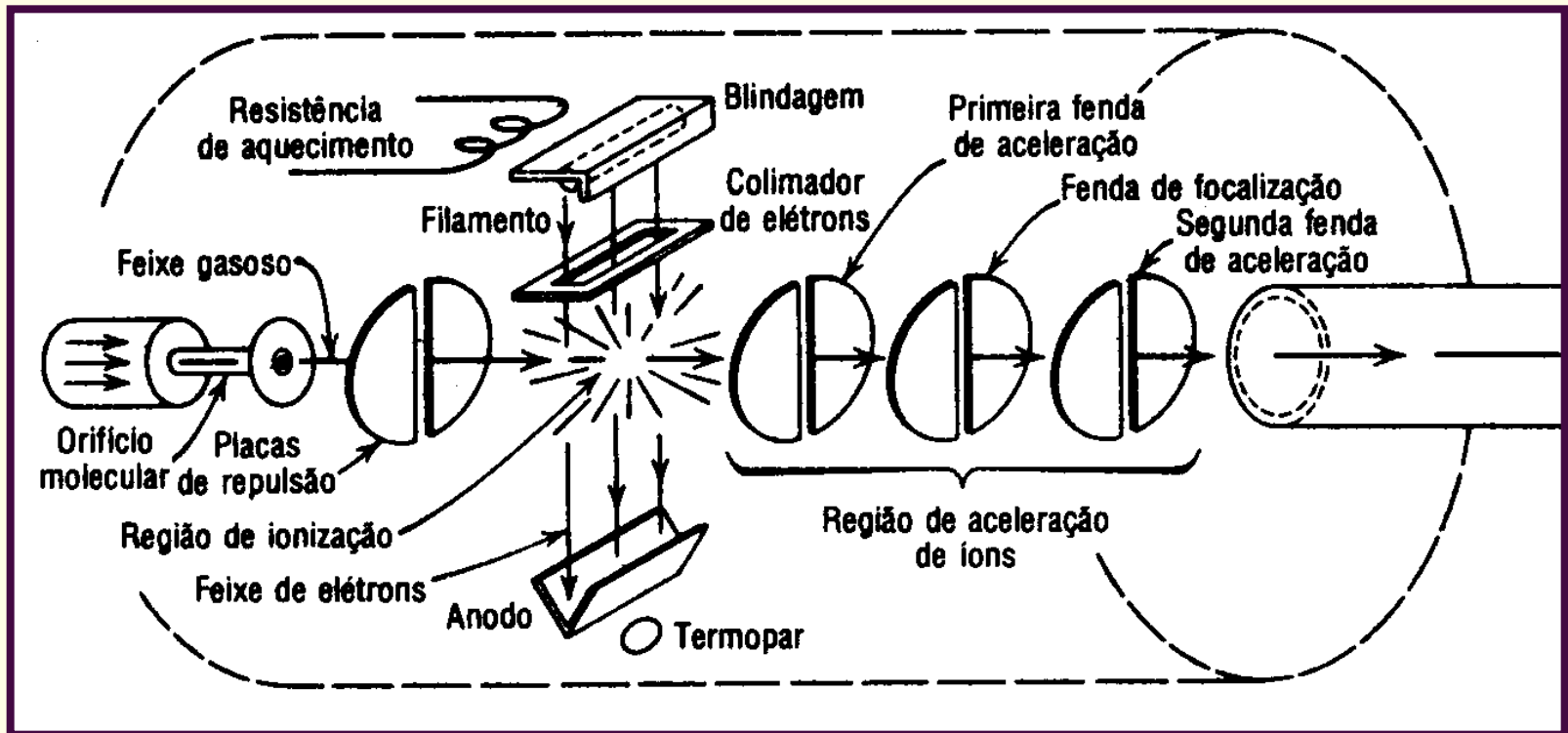
$$E = 70 \text{ eV} \approx 7 \times 10^3 \text{ kJ mol}^{-1}$$

- Energia de ligação típica  $\approx 200 - 600 \text{ kJ mol}^{-1}$



**Fragmentação**

# Impacto Eletrônico

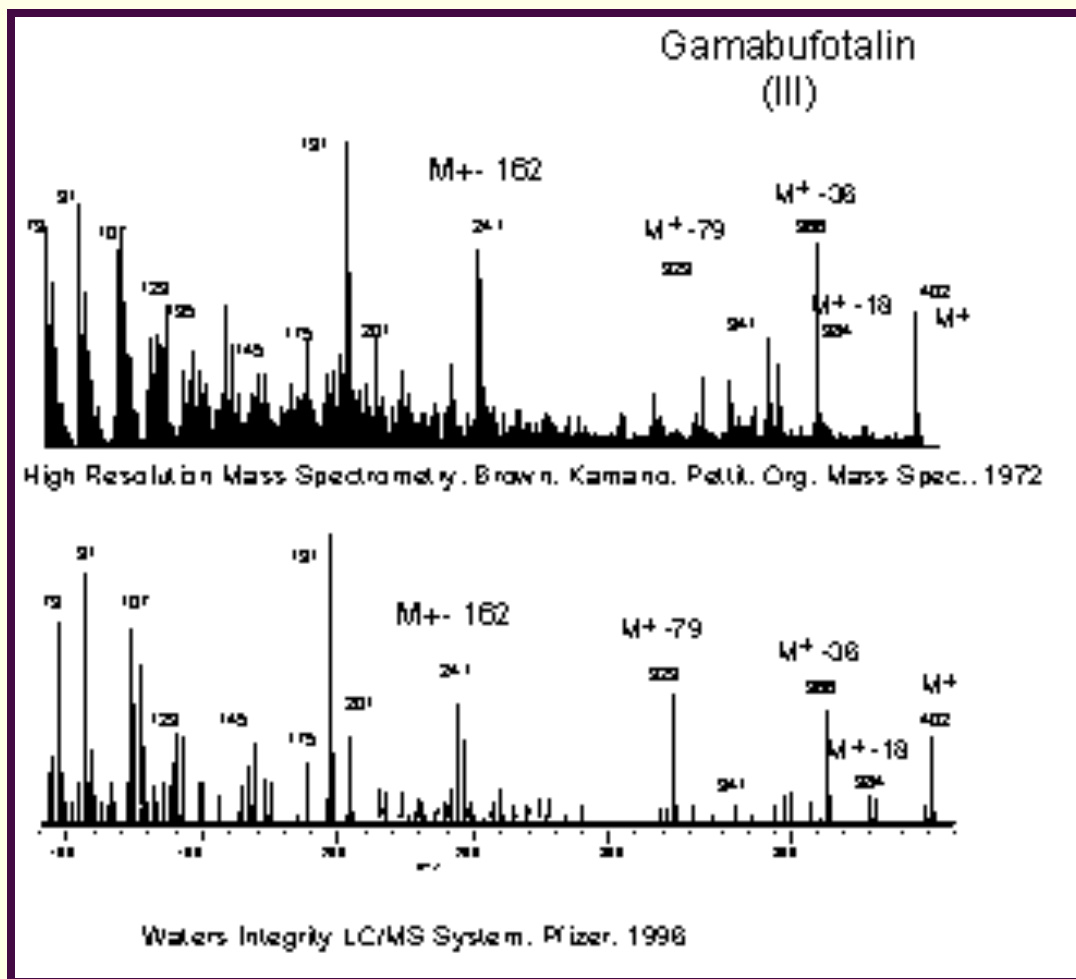


# Ionização por Elétron

---

- 😊 **Alta produção de íons - boa sensibilidade**
  - 😊 **Fragmentação auxilia na identificação**
  - 😐 **Requer amostra volátil**
  - 😞 **Pico íon molecular nem sempre é evidente**
- ⇒ **Uso de Ionização Química (CI):**
- ⇒ **produção de íon molecular e a fragmentação é mais amena**

# Reprodutibilidade de fragmentação





# Ionização à Pressão Atmosférica (API)

---

- Ionização Electrospray (ESI)
- Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI)

# Vantagens API

---

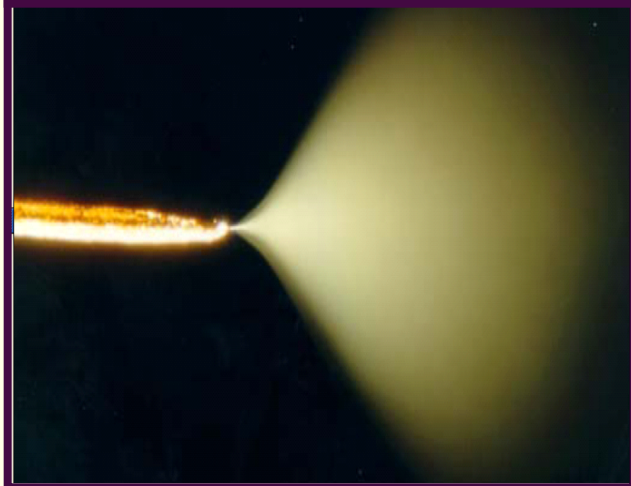
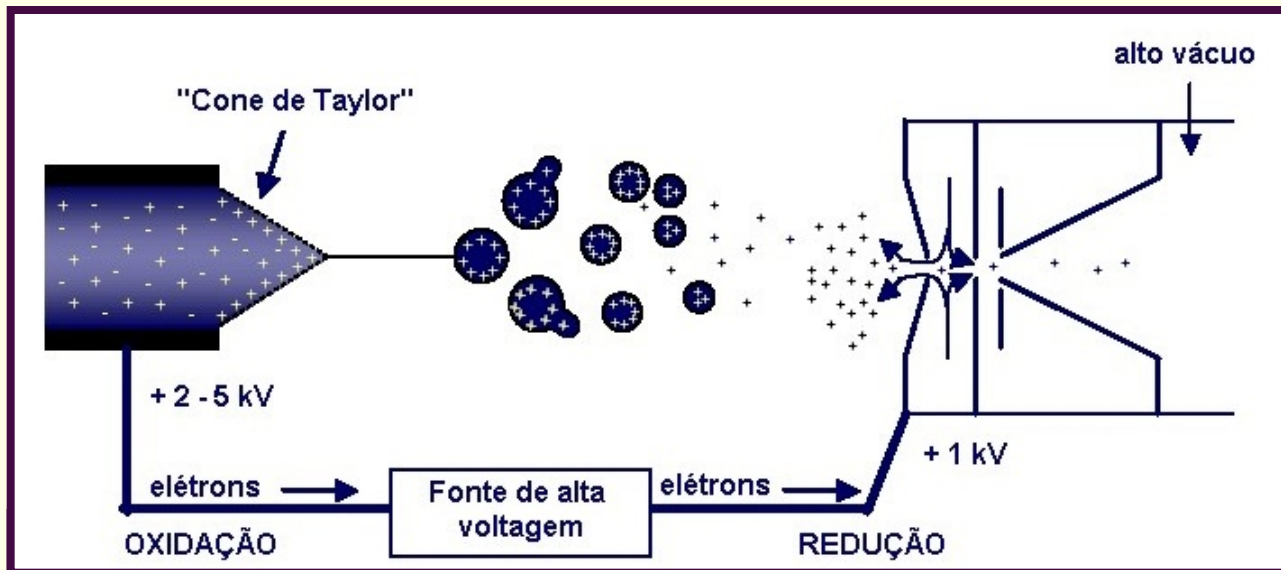
- **Informação sobre a massa molecular (MM) dos compostos, inclusive grandes biopolímeros.**
- **Sensível; MM obtida com concentrações baixas de analitos.**
- **A técnica é compatível com moléculas voláteis, não voláteis, polares e apolares.**
- **Excelente para confirmação de compostos conhecidos.**

# Ionização por Electrospray (ESI)

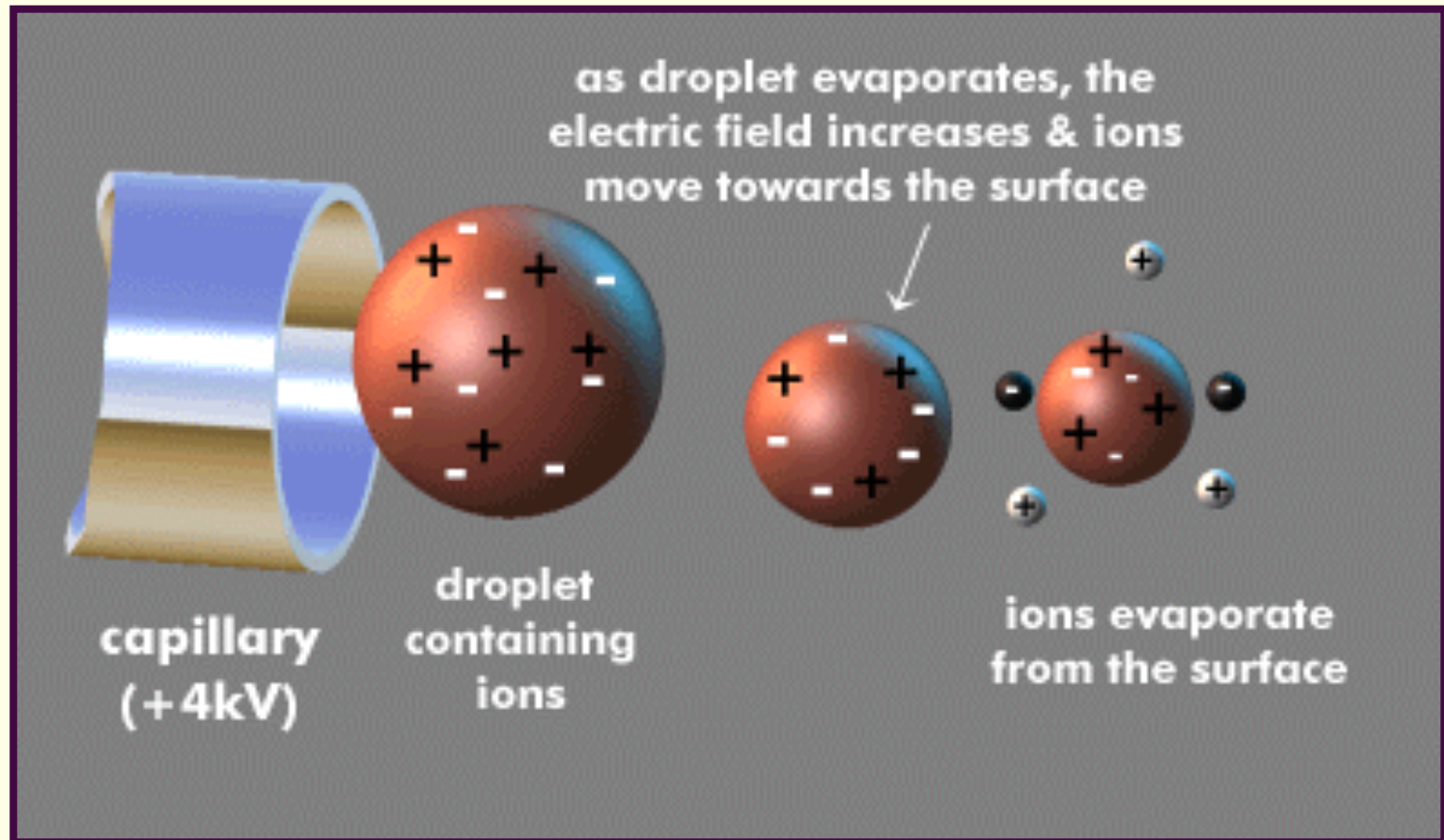
---

- Ionização à pressão atmosférica e temperatura ambiente
- Aplicação de campo elétrico de vários kV promove a ionização das gotículas do spray
- Um contra fluxo de gás secante reduz o tamanho das gotículas até o seu colapso eletrostático
- Produção de íons com elevado número cargas

# Interface ESI

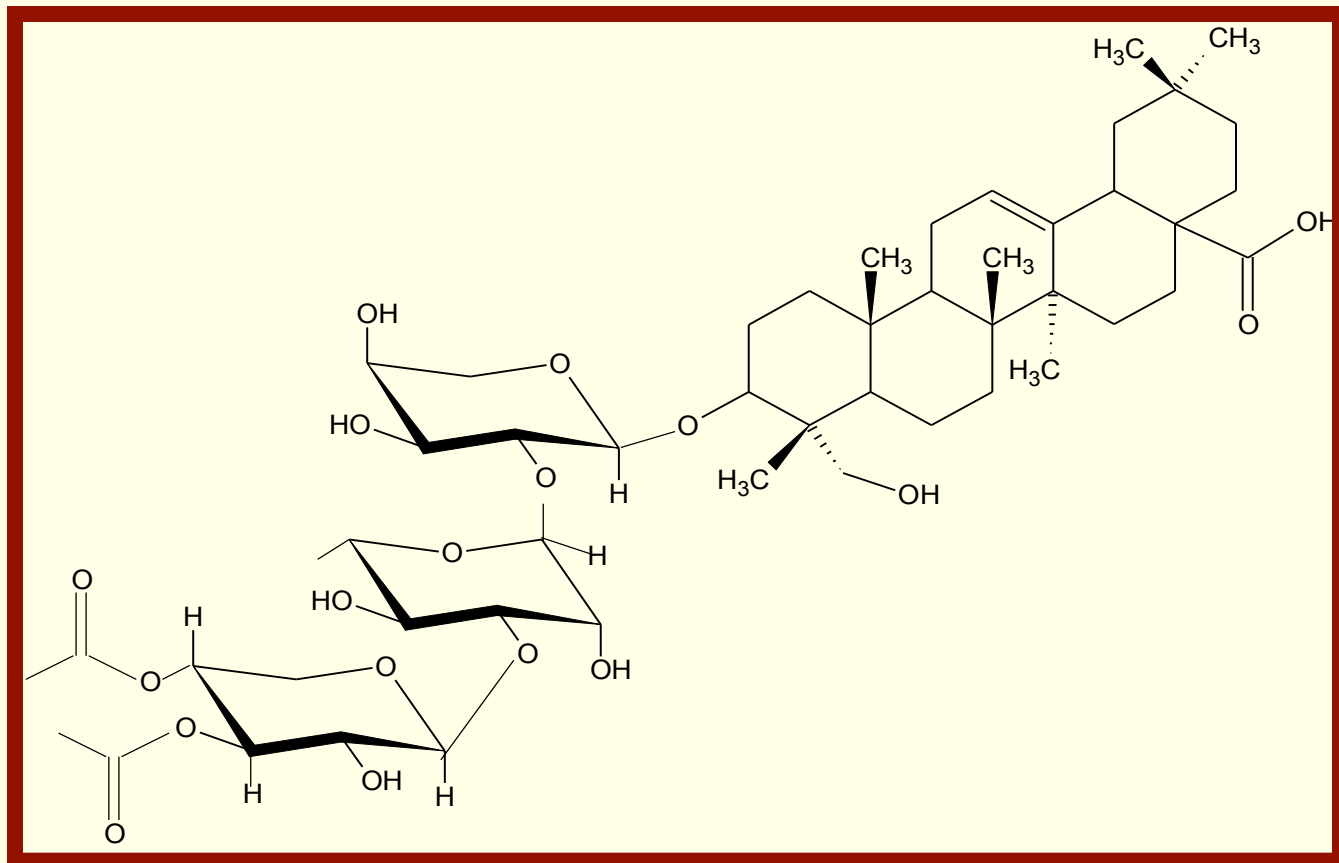


# Processo de Ionização



# Aplicações do ESI

- **Análise de compostos polares e com elevada massa Molecular. Por Exemplo: Saponinas**



# Monitoramento da composição de frações obtidas de extratos de *Sapindus saponaria*

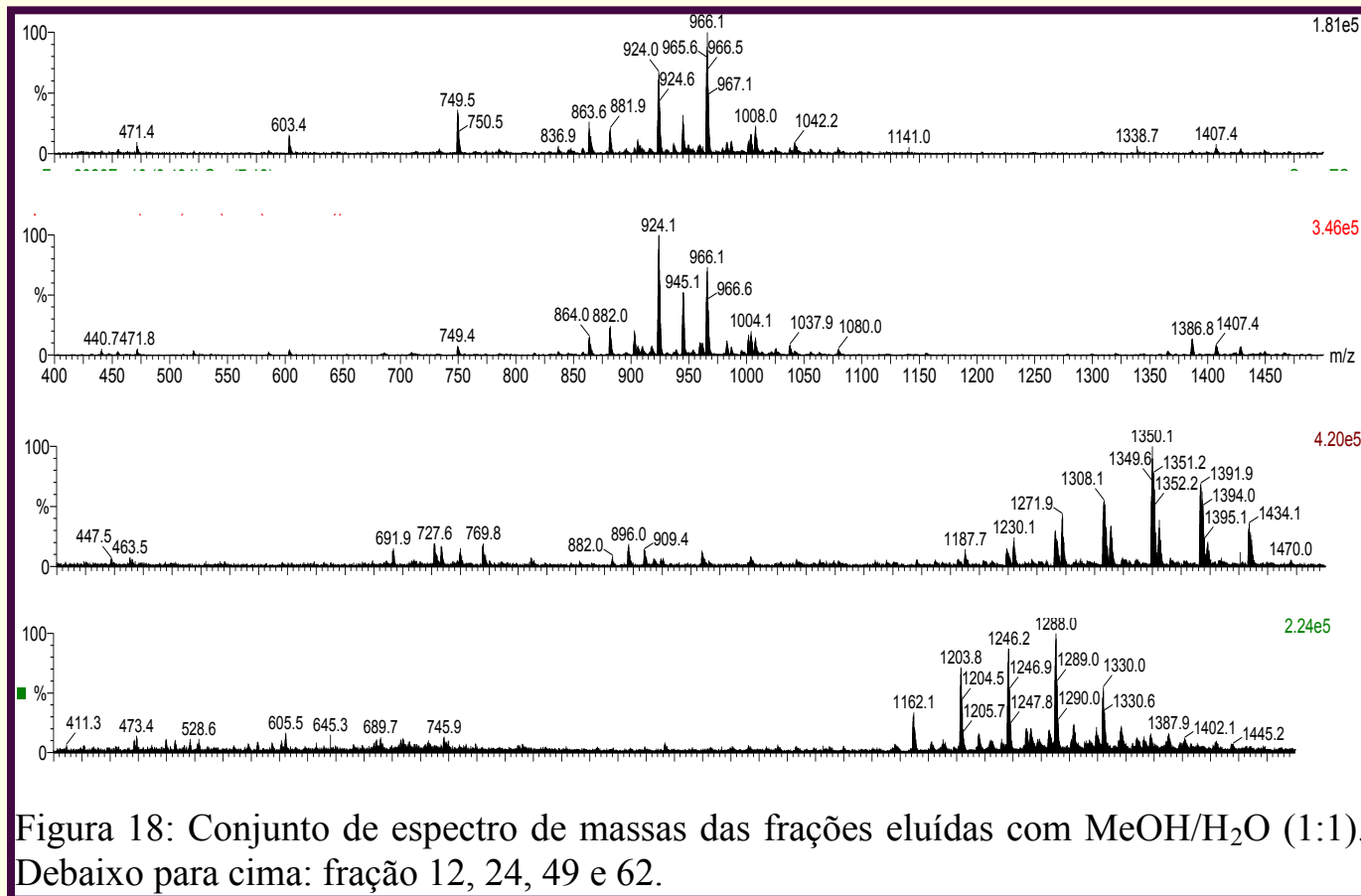


Figura 18: Conjunto de espectro de massas das frações eluídas com MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1). Debaixo para cima: fração 12, 24, 49 e 62.

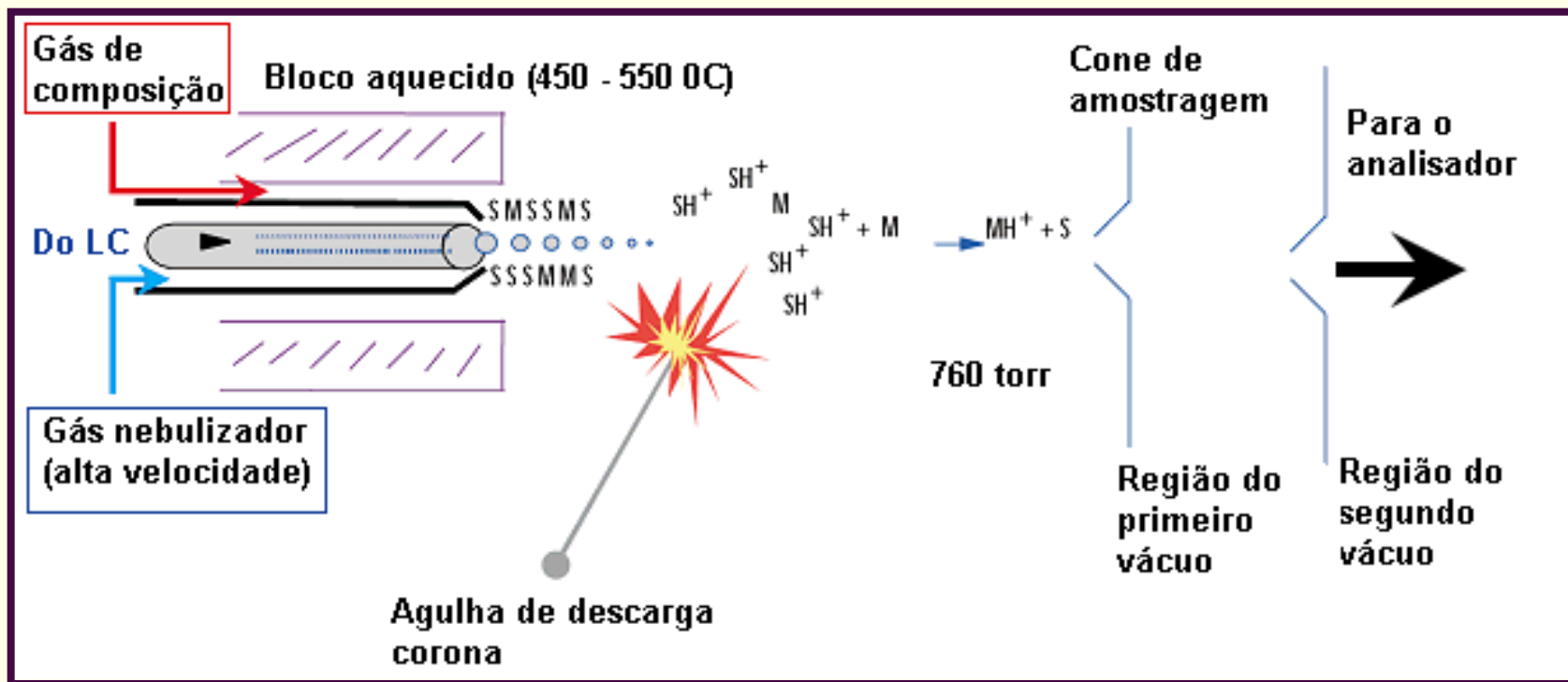
# Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI)

---

- Bastante similar a ESI
- Indicado para obtenção de MM de compostos conhecidos (confirmação de síntese de biblioteca combinatória), porém indução de fragmentação também é possível
- Compatível com grande faixa de fluxos de fase móvel
- Robusto para desenvolvimento de método



# Interface APCI



# Principais Diferenças entre APCI e ESI

---

- Mecanismo de Ionização:

- Enquanto ESI tem voltagem aplicada à ponta do spray, APCI apresenta um nebulizador aquecido e pneumáticamente assistido. A voltagem (~3 kV) é aplicada a uma agulha de metal na saída do spray.
- A descarga Corona ioniza as moléculas do solvente que por sua vez ionizam os analitos por transferência de prótons formando  $[M+H]^+$  ou  $[M-H]^-$

# Principais Diferenças entre APCI e ESI

---

## ■ Razão de Fluxo:

- APCI tolera fluxos na ordem de 0,2 a 2,0 mL/min, enquanto que ESI opera no máximo até 1,0 mL/min.
- ESI é melhor indicado para fluxos tão baixos quanto 5  $\mu$ L/min, compatível com acoplamentos capilares ( $\mu$ LC ou CZE).

# Principais Diferenças entre APCI e ESI

---

## ■ Fragmentação:

- Devido ao uso de aquecimento, APCI pode produzir alguma fragmentação, enquanto que ESI pode até formar alguns íons pseudo-moleculares.
- APCI não produz cargas múltiplas, portanto não é adequado para compostos de alta MM.

## ■ Sensibilidade:

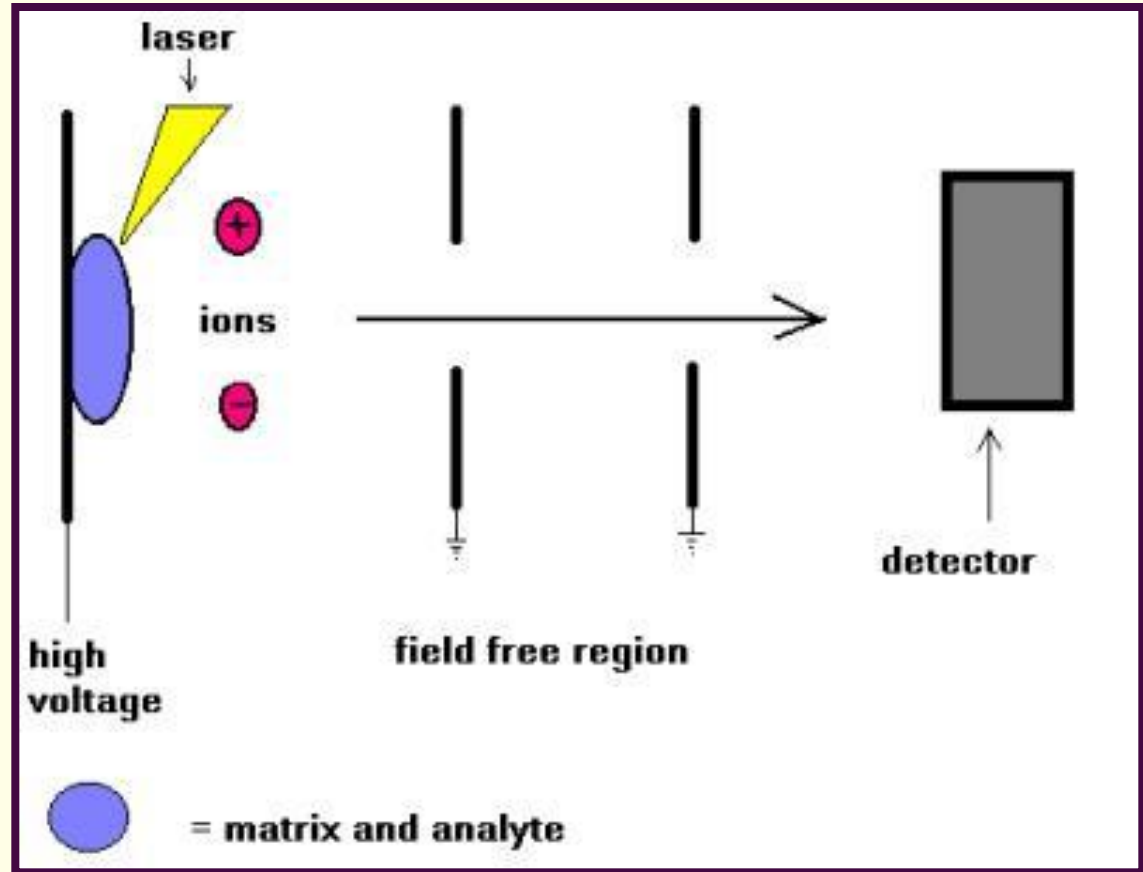
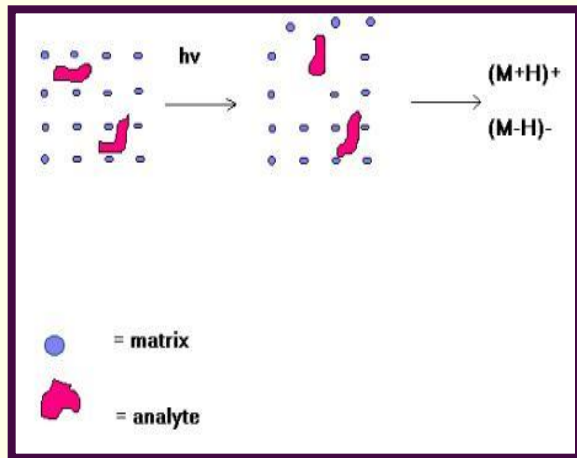
- Sem ser uma regra, APCI tende a render melhor sensibilidade para solutos menos polares.

# **Dessorção/Ionização à Laser Assistida com Matriz (MALDI/I)**

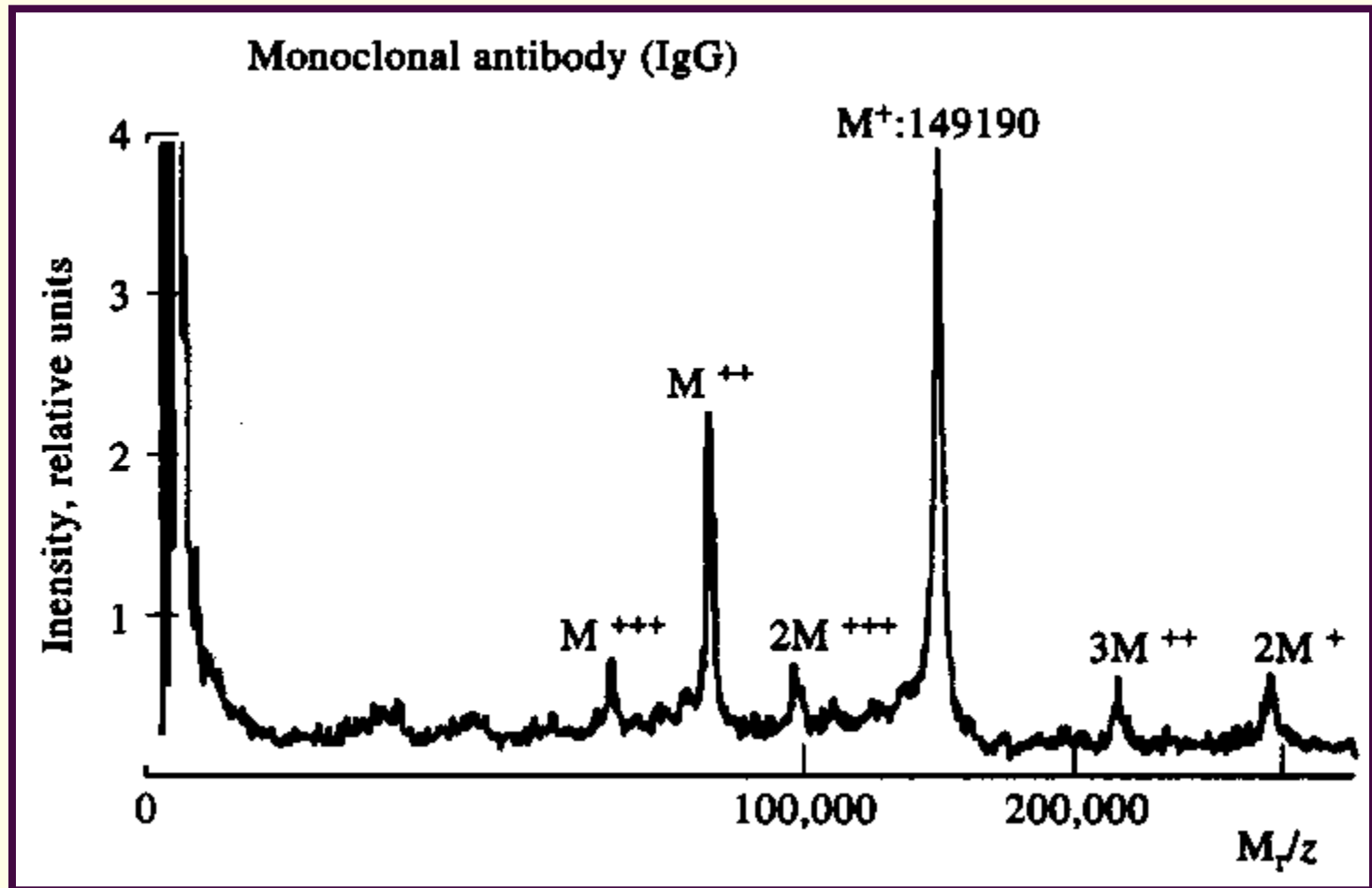
---

- **Processo de ionização branda.**
- **Apropriado para biomoléculas de elevado peso molecular.**
- **Pulso de laser incide sobre uma amostra co-cristalizada com uma matriz apropriada - derivados de ácidos benzóicos.**
- **Análise proteômica.**

# Dessorção/Ionização à Laser Assistida com Matriz (MALD/I)



# Espectro MALD/I



# IV. Analisadores de Massas

---

- **Setor magnético (B)**
- **Duplo foco (EB ou B<sup>2</sup>)**
- **Quadrupolo (Q)**
- **Tempo de voo (TOF)**
- **Captura de íons (MS<sup>n</sup>)**
- **Ciclotron de íons (ICR)**



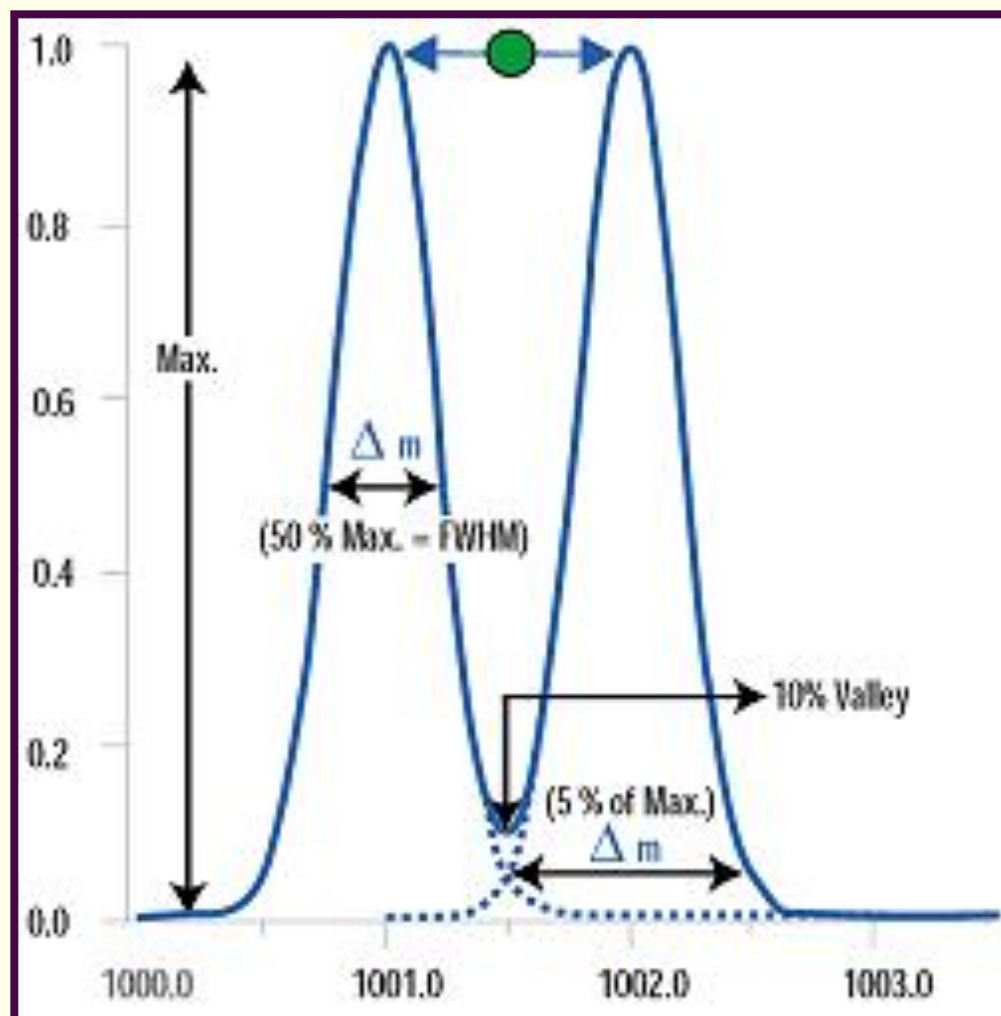
# Resolução em MS

Nome	Fórmula	Nominal	Exata	Média
Methyl Stearate	C19H38O2	298	298.2872	298.5114
Ubiquitin	C378H630N105O118S	8556	8560.6254	8565.873

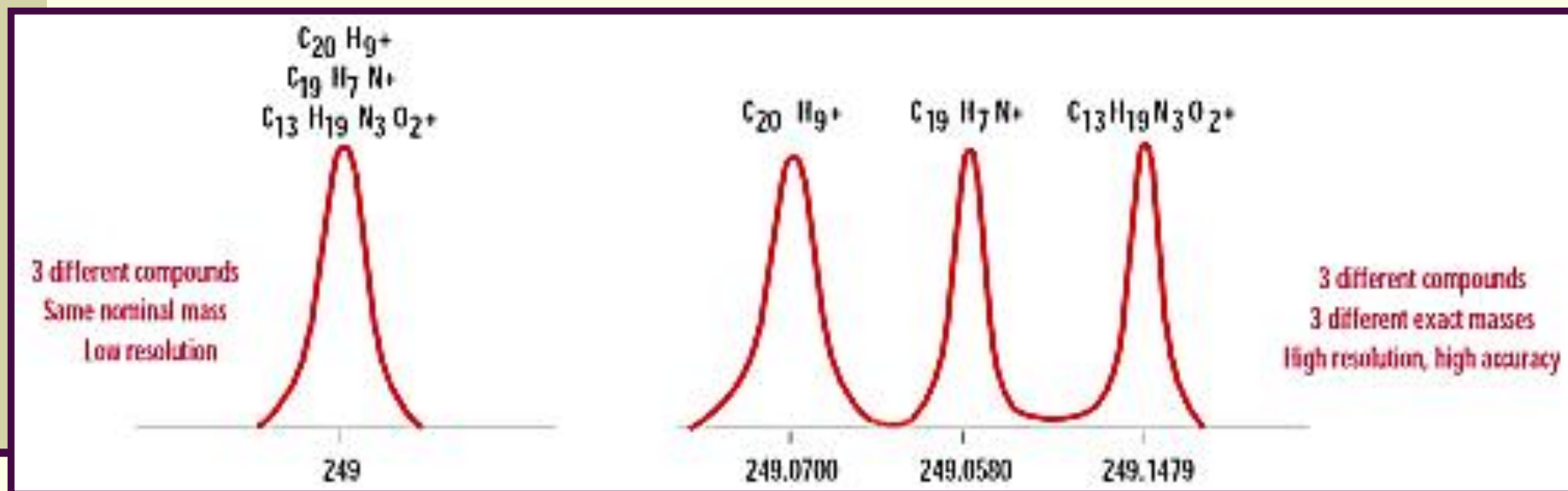
$$R_s = \frac{m}{\Delta m}$$

$$R_s = 4000 \Rightarrow 400,0 \text{ e } 400,1 \text{ (} 40,00 \text{ e } (40,01))$$

# Resolução em MS

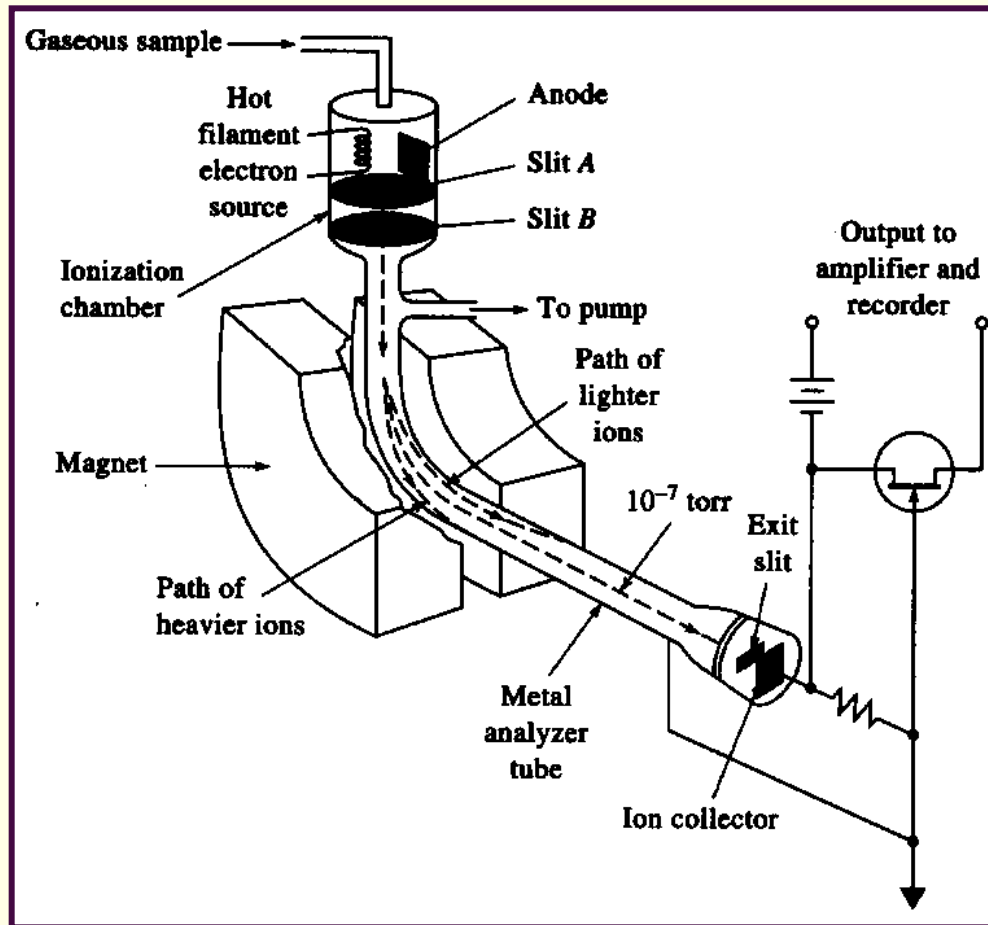


# Resolução em MS



**A resolução necessária depende da aplicação**

# Analizador tipo Setor Magnético



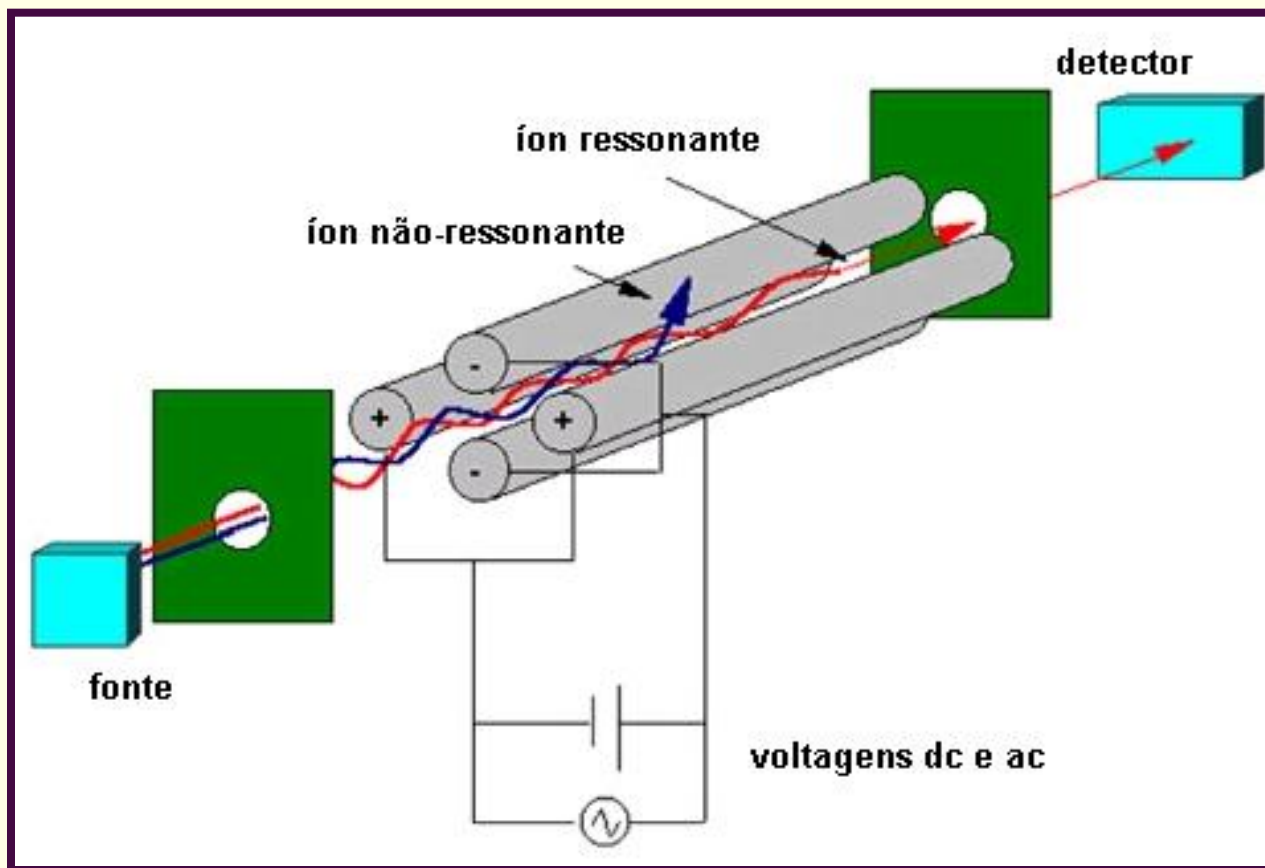
$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2 e}{2V}$$

# Analizador Quadrupolar (Q)

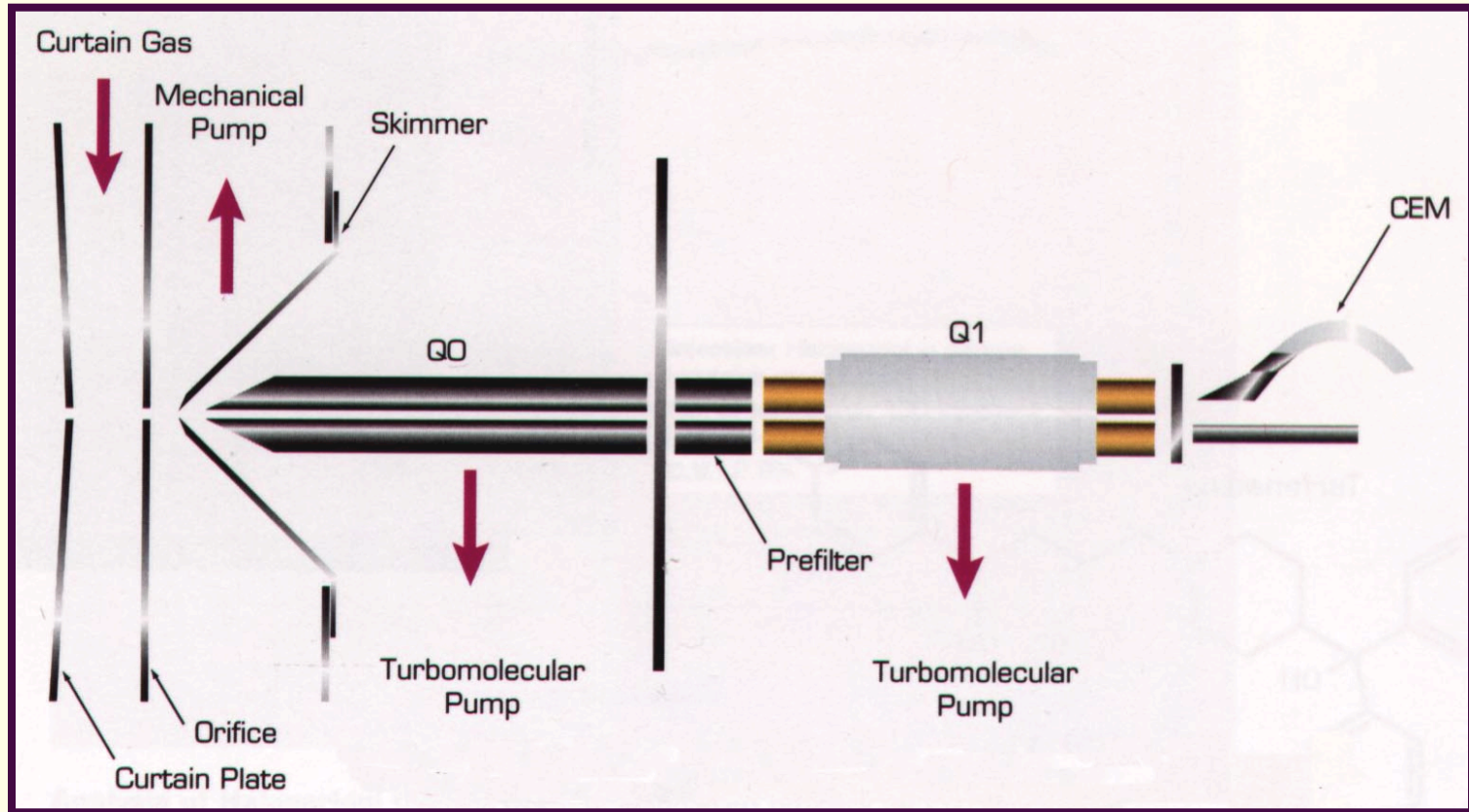
---

- **Analizador de varredura**
- **Normalmente é mais barato e robusto que setor magnético**
- **Conjunto de 4 pólos de sinais opostos, que alternam sinais de radiofrequência entre pares, permitindo que apenas um íon atinja o detetor de cada vez**

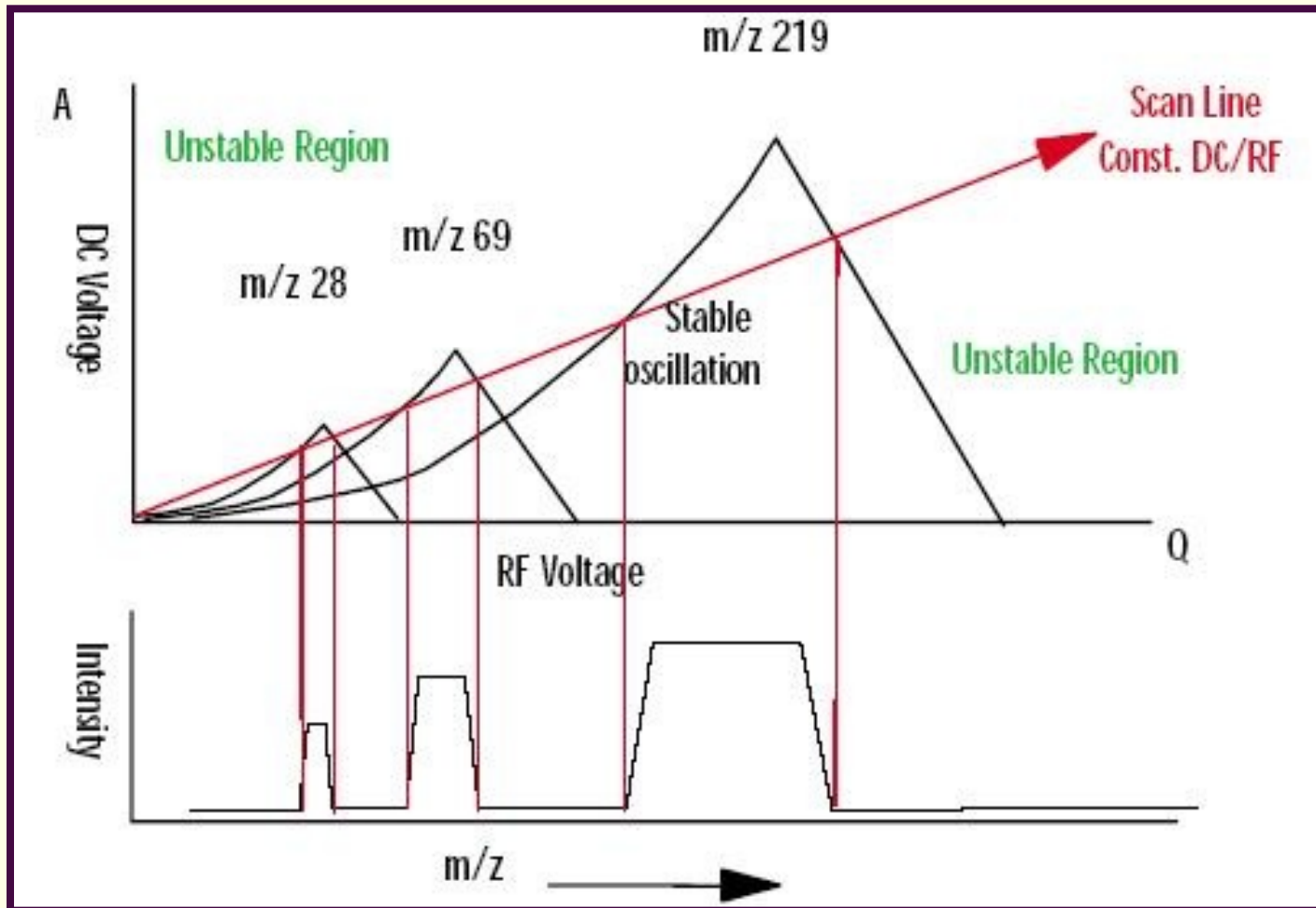
# Analizador Quadrupolar (Q)



# Analizador Quadrupolar (Q)



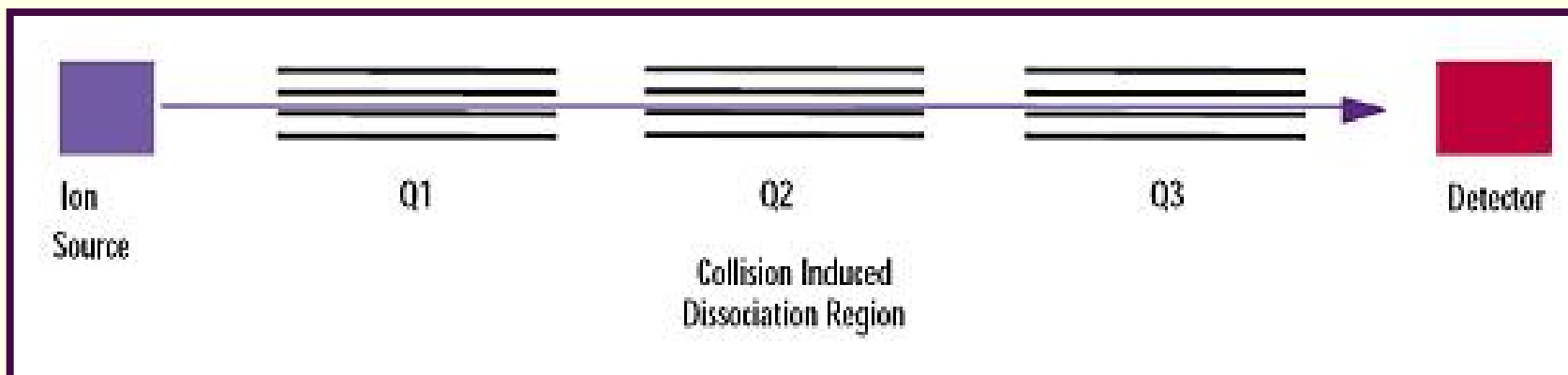
# Analizador Quadrupolar (Q)



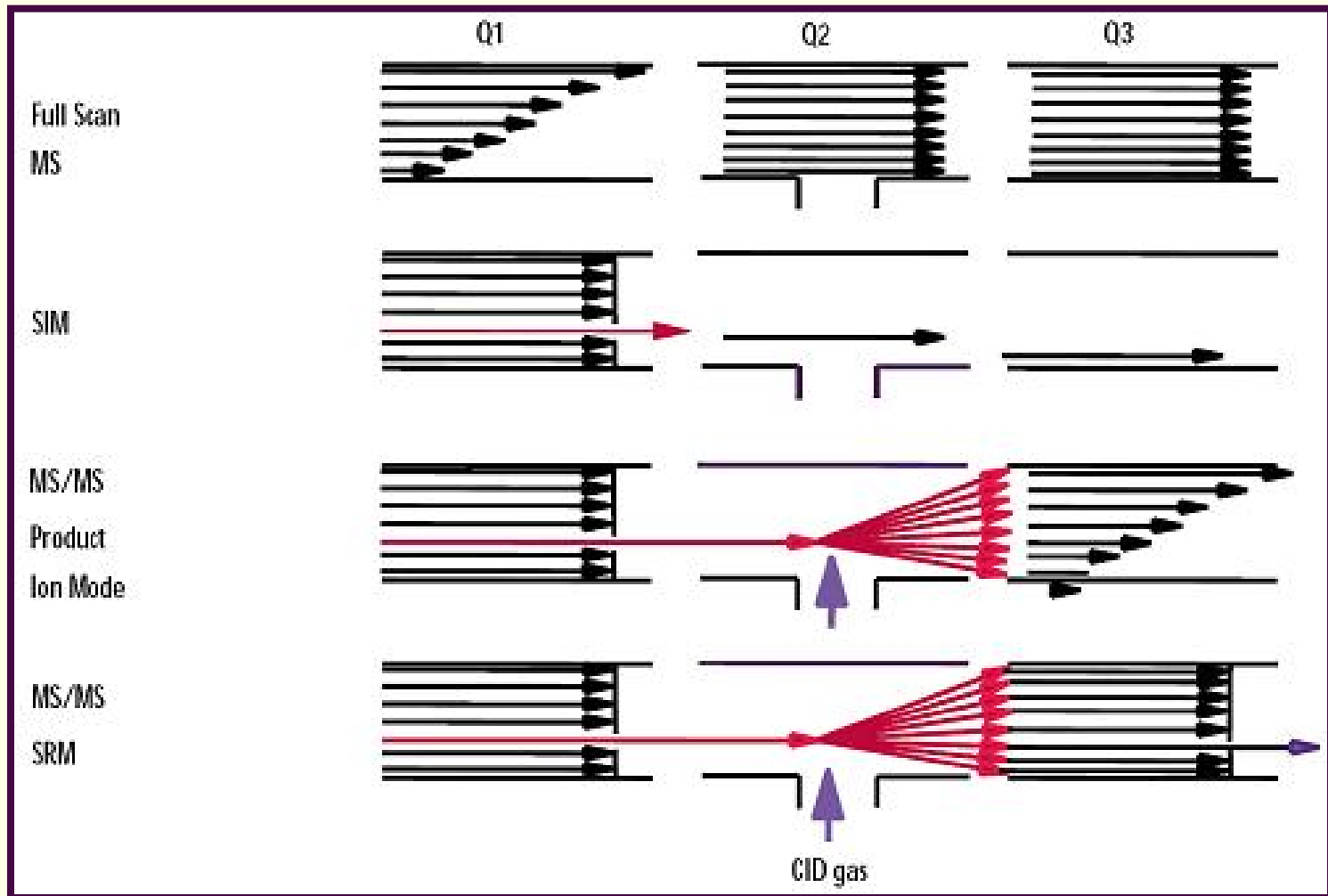


# Analizador Quadrupolar (Q)

## Experimentos de MS/MS com triplo quadrupolo

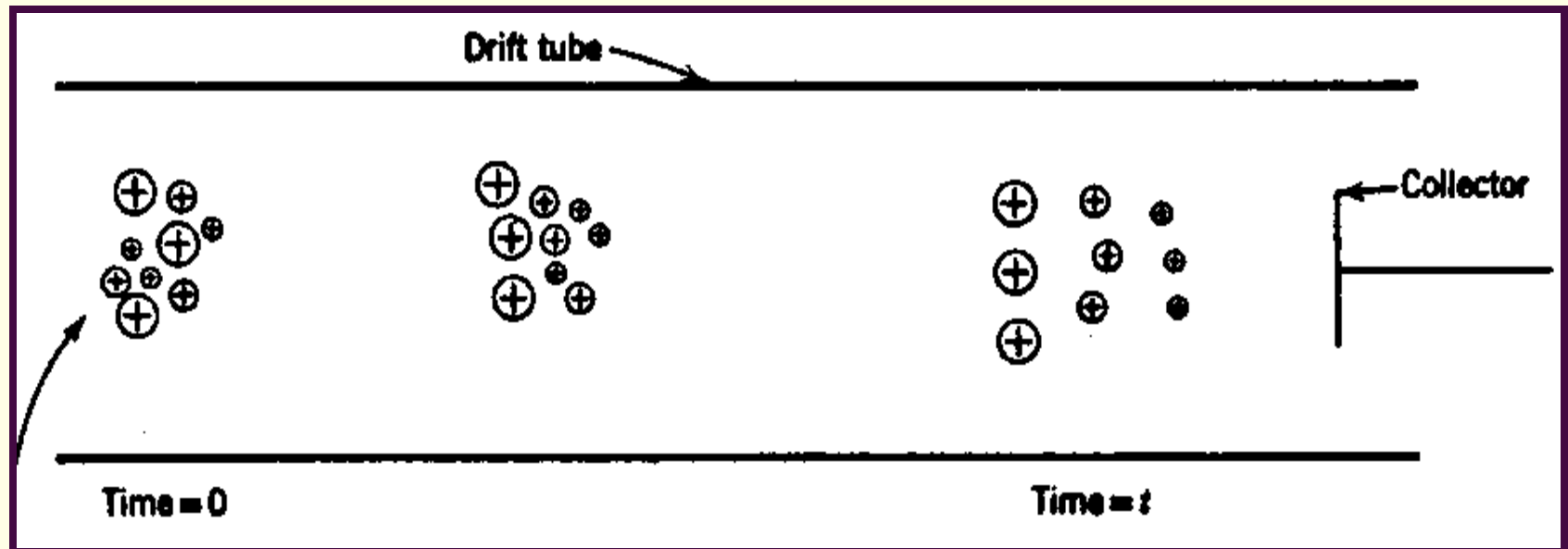


# Analizador Quadrupolar (Q)

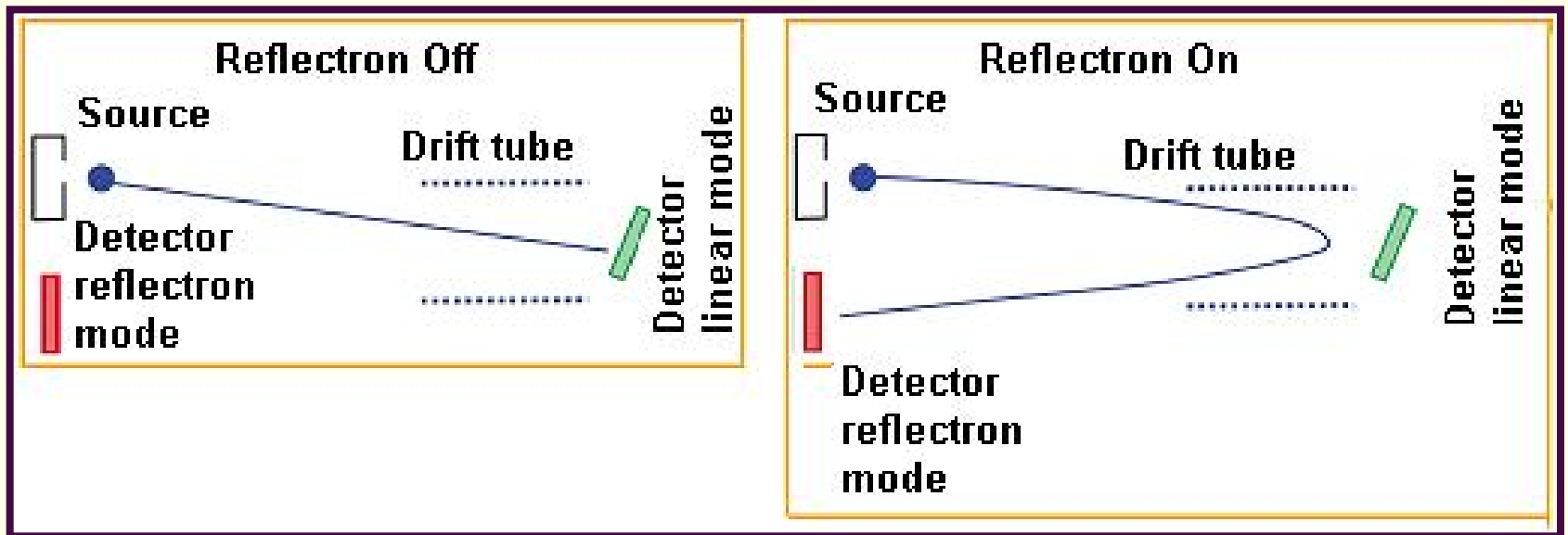


# Tempo de Vôo (TOF)

- Íons são produzidos em pulsos e injetados no tubo de deslocamento



# Tempo de Vôo (TOF)



# Tempo de Vôo (TOF)

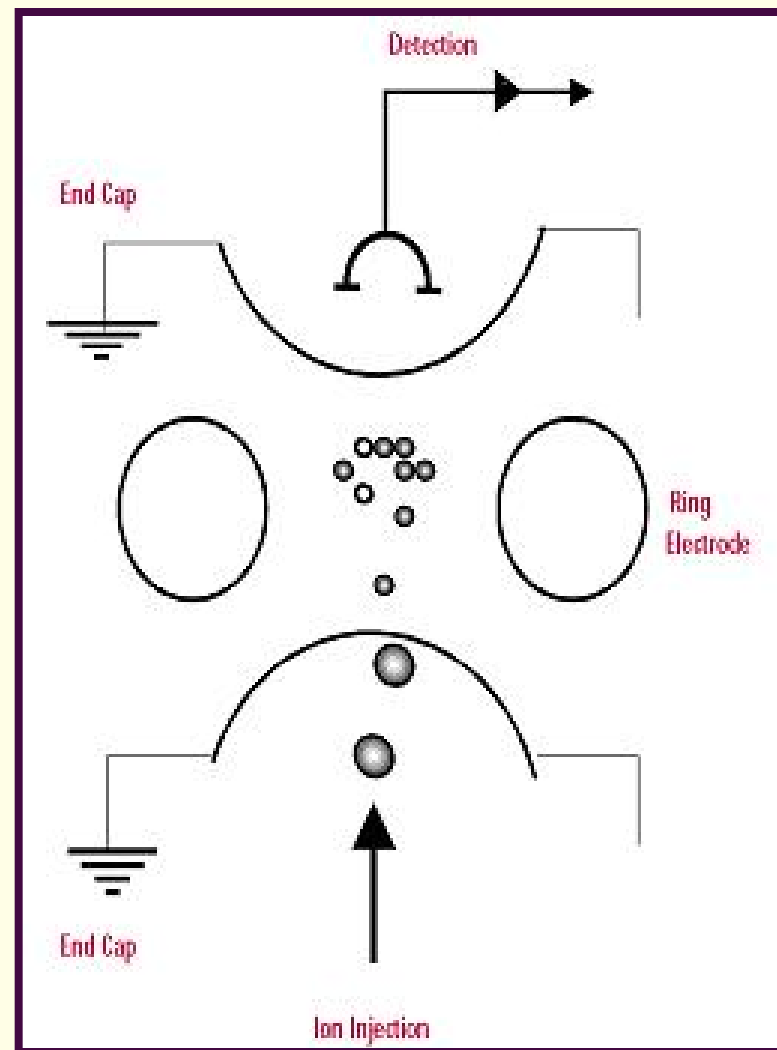
- Separação dos íons é temporal e depende da energia cinética dos fragmentos

$$t_f = d/v = d \sqrt{(1/2)V} \cdot \sqrt{m/z}$$

$$\frac{m}{z} = 1,9 \times V t^2 / d^2$$

# Analizador *Trap* iônico (*ion trap*)

- Compacto & robusto
- Funcionamento similar ao quadrupolo
- Capacidade de efetuar MS tandem temporal



# Analísador *Trap* iônico (*ion trap*)

