

Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos
Departamento de Química e Física Molecular

Disciplina: SQM0418 - Análise Instrumental II

Espectrometria de Massas (MS)

Álvaro José dos Santos Neto
CROMA-IQSC



2º semestre de 2015

Disciplina SQM0418 – Aula de Espectrometria de Massas – Prof. Alvaro J. Santos Neto

Espectrometria de Massas

Outline:

- **Introdução**
- **Sistemas de vácuo**
- **Fontes de Ionização**
- **Analisadores de massa**
 - **Resolução e Exatidão de Massa**
- **Detectores**
- **MS/MS**



O que é a espectrometria de massas?

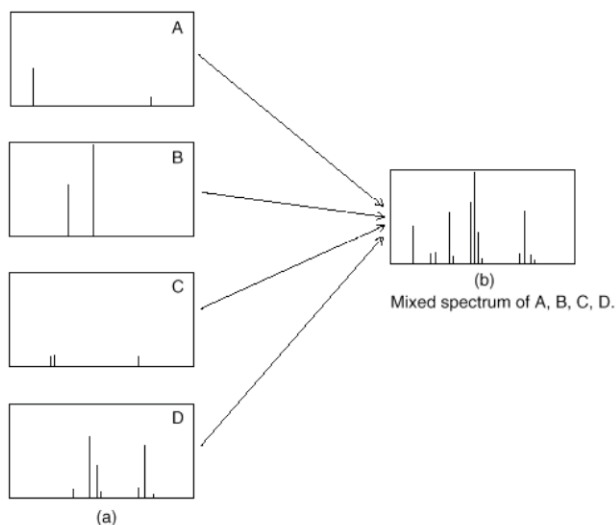
O que faz a MS?

Como funciona a MS?

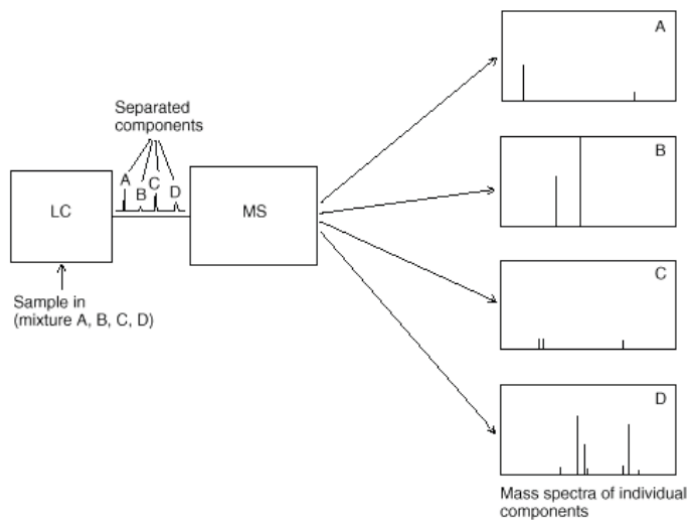
Em que a MS pode ser útil?



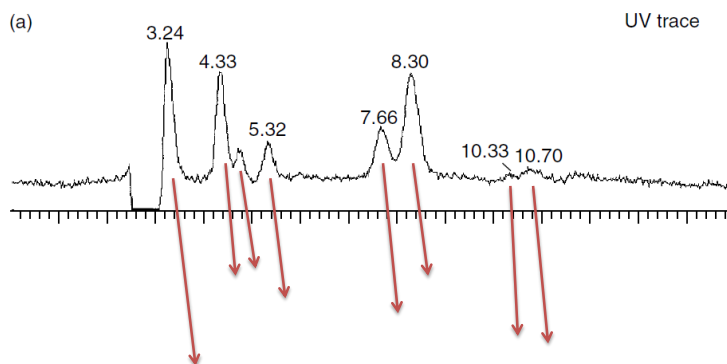
Misturas em MS



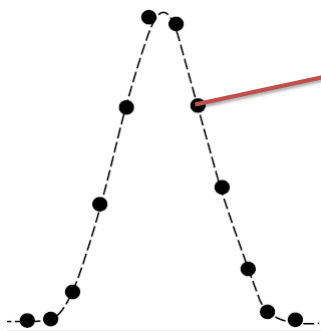
Combinando a cromatografia com a MS



Comparação entre cromatograma de LC-UV e LC-MS (modo TIC)



O pico cromatográfico em MS



Contém toda a informação de MS:

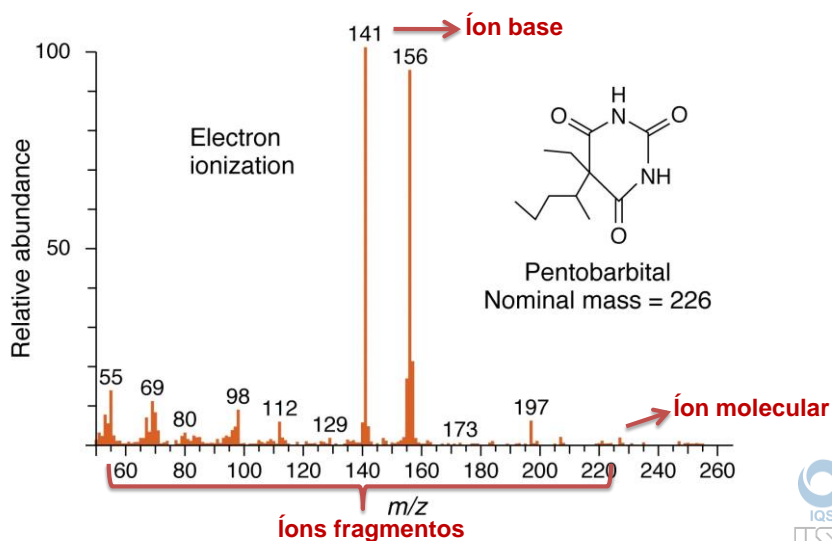
- Espectro completo (TIC)
- Ions selecionados (SIM)

Ou toda a informação de MS/MS:

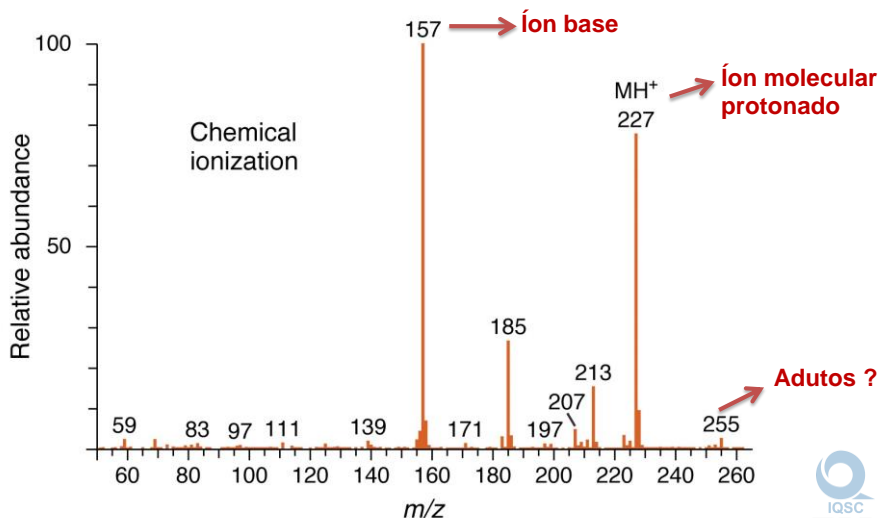
- Reações específicas (SRM)
- Perda neutra (*neutral loss*)
- Ions precursores
- Ions produtos



O Espectro de Massas



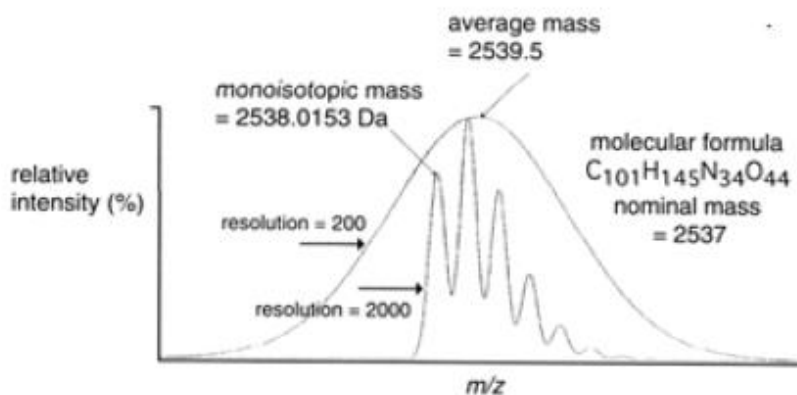
O Espectro de Massas



Diferentes termos em MS

- **Massa nominal:** a massa **calculada** para um íon levando em conta a **massa inteira do isótopo mais abundante** de cada elemento.
- **Massa monoisotópica:** a massa **calculada** a partir da **massa exata do isótopo mais abundante** de cada elemento.
- **Massa do íon mais abundante:** a massa correspondente ao **pico (íon) mais intenso** dentro do conjunto de picos isotópicos de um mesmo composto.
- **Massa média:** é a **média ponderada** de todos os picos isotópicos de um determinado composto.

Diferentes termos em MS



Etapas na análise por MS

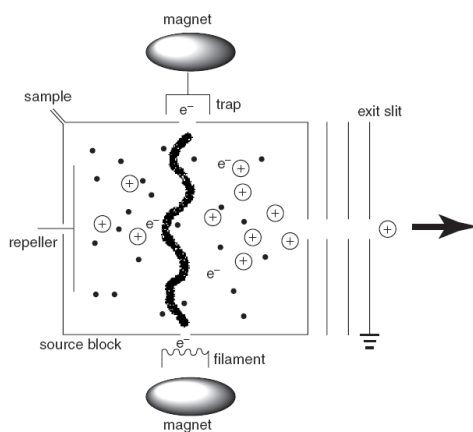
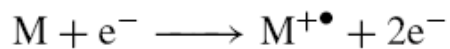
1. Ionização dos analitos
2. Seleção/Separação dos íons de acordo com m/z *
3. Detecção

OBS: etapas 2 e 3 necessitam de vácuo (etapa 1 apenas em alguns casos, e.g. GC-MS)

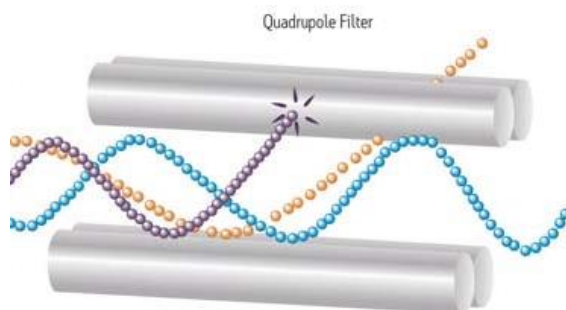
* Apesar do termo espectrometria de massas, sempre se mede o valor de m/z .



1. Ionização

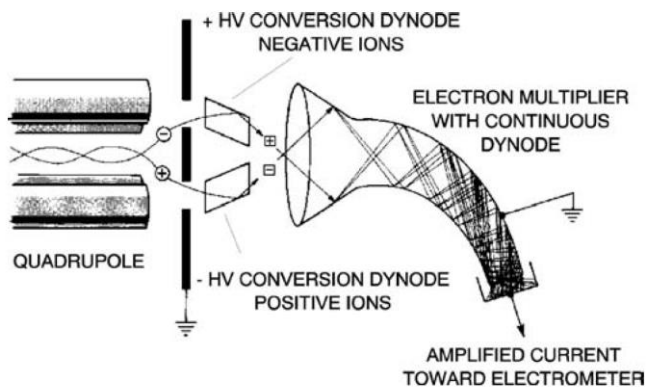


2. Análise/separação

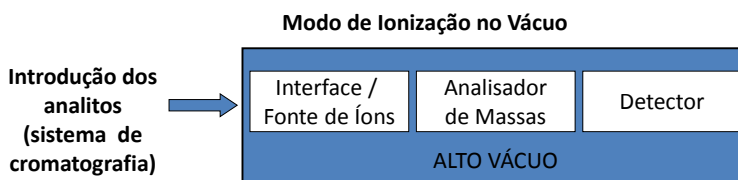


Fonte: http://www.waters.com/waters/pt_PT/What-Types-of-Instruments-Are-Used%3F/nav.htm?cid=10090937

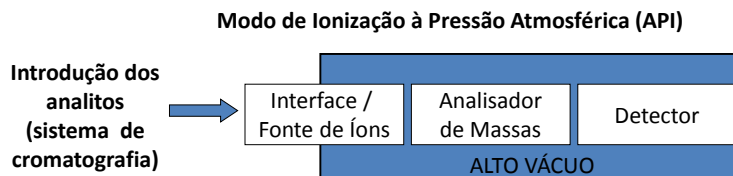
3. Detecção



Diagramas de blocos de um MS



Exemplos: EI, CI, PI, MALDI, TSI, FAB, SIMS, FI/FD



Exemplos: ESI, APCI, APPI, AP-MALDI, DESI, DART, EASI



Sistemas de vácuo

Bomba rotativa (*roughing* ou *rotary*)

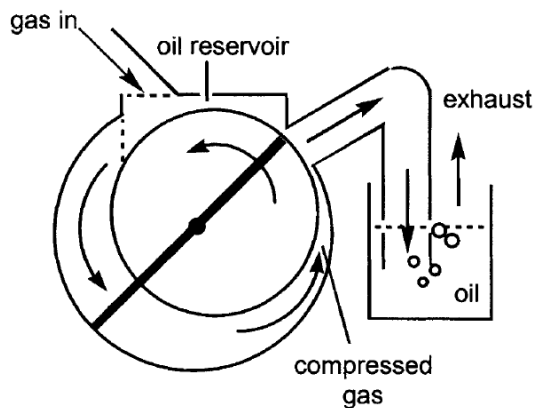


Figure 3.28 *Cross-section of a rotary vacuum pump*



Sistemas de vácuo

Bomba turbomolecular

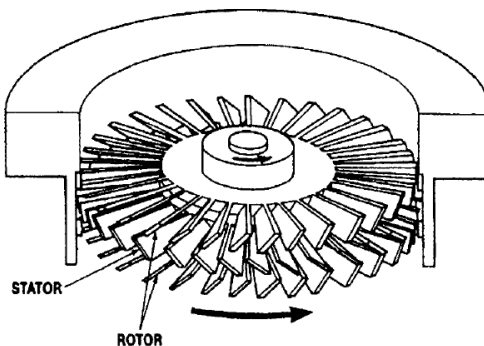
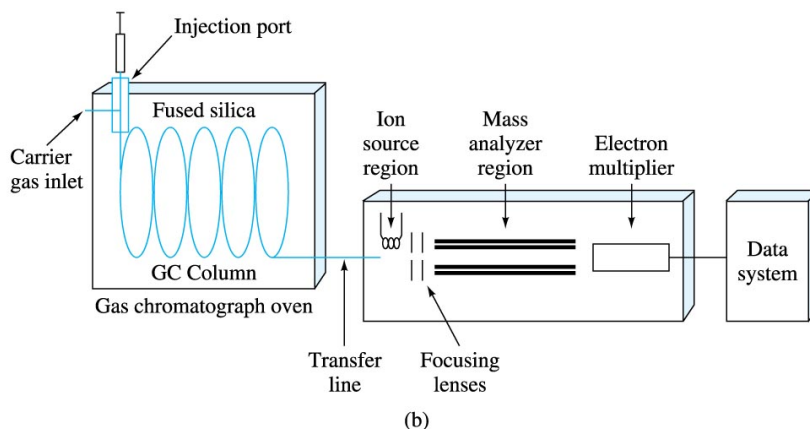


Figure 3.30 *View of the rotor of a turbomolecular pump*
(Source: J.T. Watson, *Introduction to Mass Spectrometry*, 3rd edition, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997, Figure 19.7, p. 431)



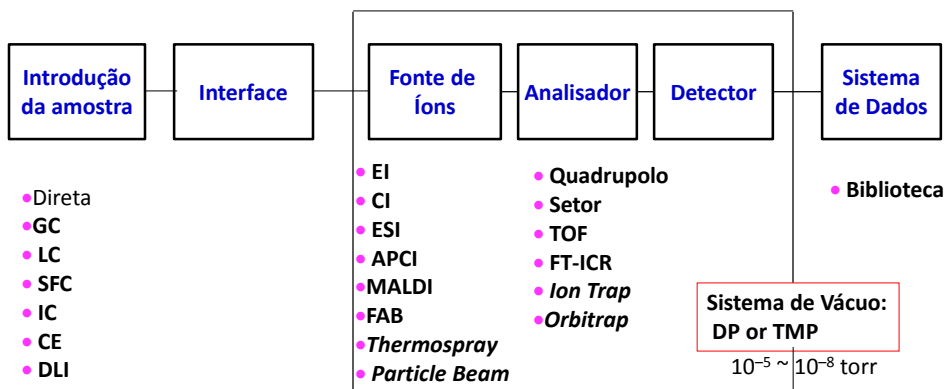
Esquema de um equipamento – GC-MS



© 2004 Thomson - Brooks/Cole



Tipos de componentes para um espectrômetro de massas



- Direta
- GC
- LC
- SFC
- IC
- CE
- DLI
- ICP
- Solid probe

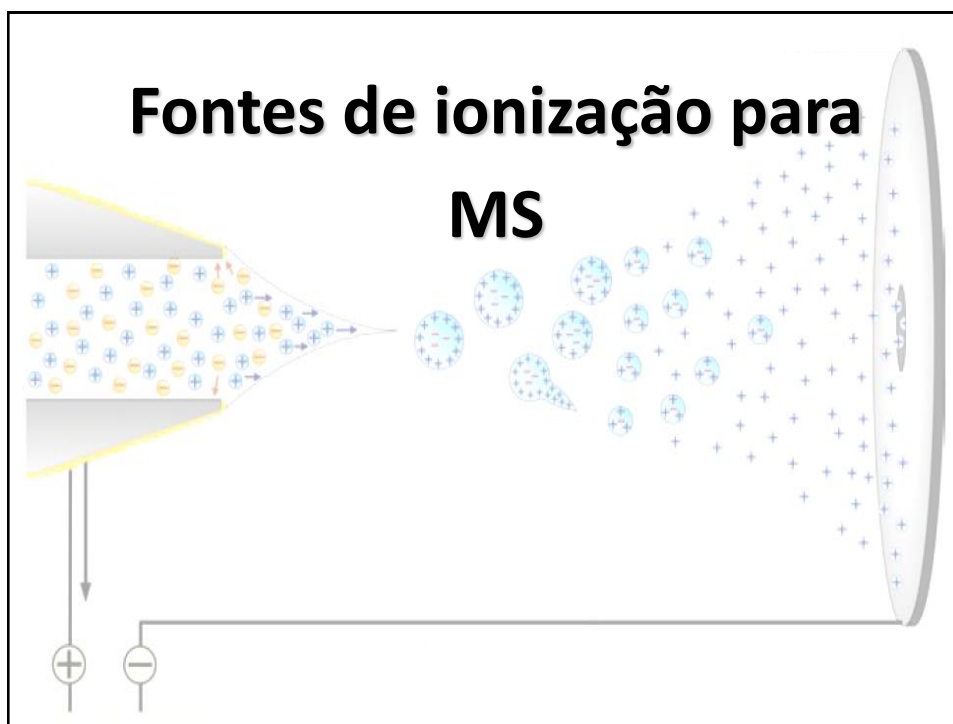
- EI
- CI
- ESI
- APCI
- MALDI
- FAB
- Thermospray
- Particle Beam

- Quadrupolo
- Setor
- TOF
- FT-ICR
- Ion Trap
- Orbitrap

- MS/MS – Q/TOF, TOF/TOF
- HRMS
- LRMS

- Biblioteca





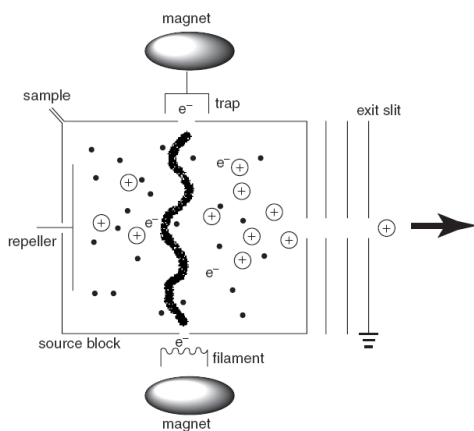
Disciplina SQM0418 – Aula de Espectrometria de Massas – Prof. Alvaro J. Santos Neto

Fontes de ionização para GC-MS

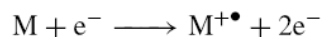
- Ionização por elétrons – EI
("Impacto de elétrons" – termo obsoleto*)
- Ionização Química – CI
 - Modo positivo
 - Modo negativo

* <http://goldbook.iupac.org/E01998.html>

Fonte de EI



- Filamento aquecido
- Energia: 70 eV
- Ionização intensa
 - “hard ionization”



Reações em EI

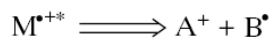
- Ionização / Excitação



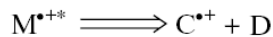
- Formação de íon molecular



- Fragmentação em íon + radical



- Fragmentação em íon radicalar + perda neutra



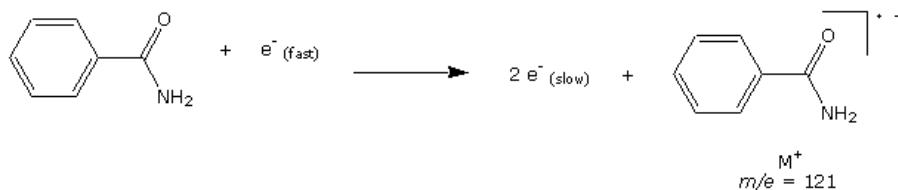
Alguns mecanismos na formação dos íons

Analito = AB

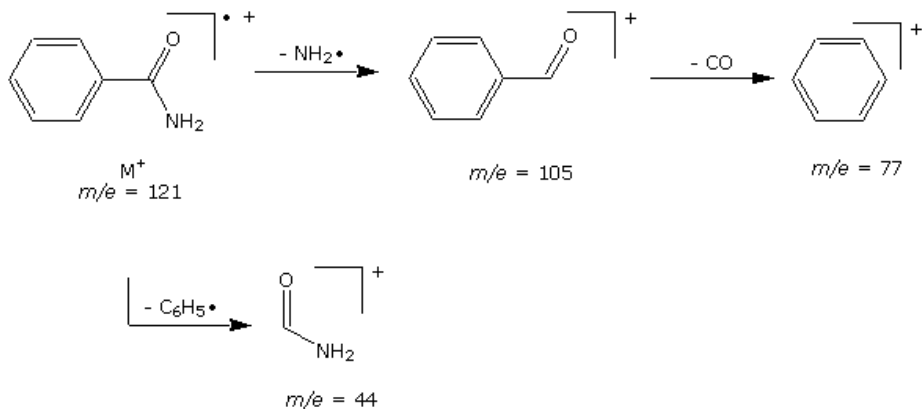
1. $AB + e^- \rightarrow A^+ + B^- + e^-$
2. $AB + e^- \rightarrow A^+ + B^\circ + 2e^-$
3. $AB + e^- \rightarrow [AB^{+\bullet}] + 2e^-$, seguido por: $[AB^{+\bullet}] \rightarrow AB^{+\circ}$ - íon molecular
4. $AB + e^- \rightarrow [AB^{2+\cdot}]^n + 3e^-$, seguido por: $[AB^{2+\cdot}]^n \rightarrow A^+ + B^+$
- pequena abundância
5. $AH + e^- \rightarrow AH^* + e^-$, seguido por: $AH^* + AH \rightarrow [AH+H]^+ + A^-$
- 'autoionização química'



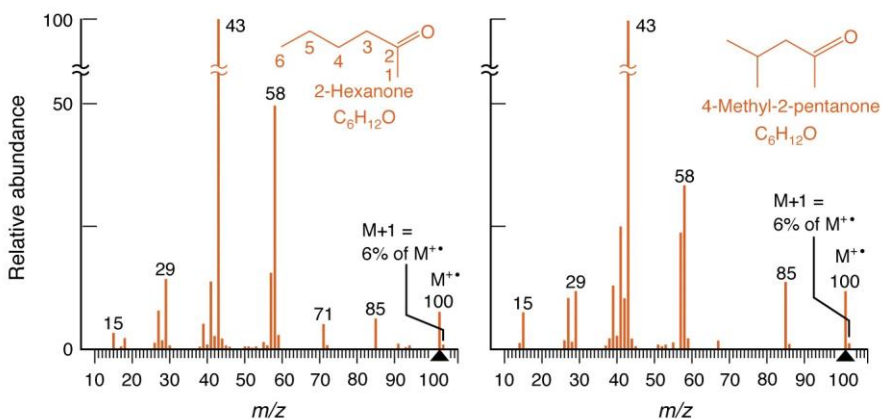
O processo de ionização em GC-EI-MS



O processo de fragmentação em GC-EI-MS



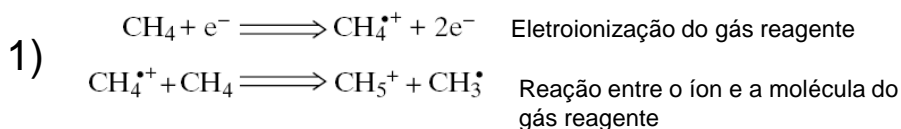
Espectro de massas por EI (70 eV) de duas cetonas isoméricas com composição $C_6H_{12}O$



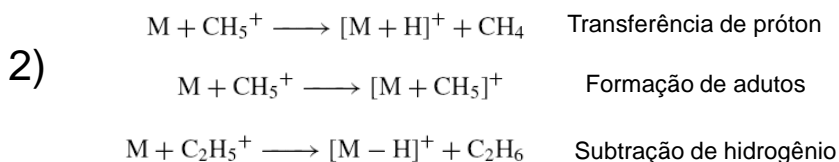
Fonte de CI

- Similar à fonte de EI, porém com gás reagente (metano, isobutano e amônia) e energia mais alta.
- Ionização branda (*soft ionization*)

Formação de íons reagentes



Reação com os analitos



Gases reagentes para CI

Metano:

- bom para a maioria dos compostos orgânicos
- usualmente produz adutos de $[\text{M} + \text{H}]^+$, $[\text{M} + \text{CH}_3]^+$ e $[\text{M} + \text{C}_3\text{H}_5]^+$
- os adutos não são sempre abundantes
- fragmentação razoável

Isobutano:

- usualmente produz adutos de $[\text{M} + \text{H}]^+$, $[\text{M} + \text{C}_4\text{H}_9]^+$ e alguma fragmentação
- os adutos são relativamente mais abundantes que em CI com metano
- não é tão universal quanto metano

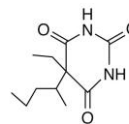
Amônia:

- fragmentação geralmente ausente
- compostos polares produzem adutos $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$
- compostos básicos produzem adutos $[\text{M} + \text{H}]^+$
- compostos não polares e não básicos não são ionizados

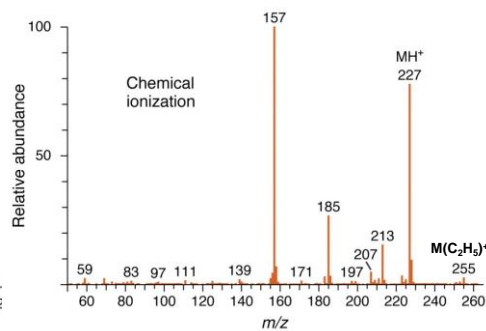
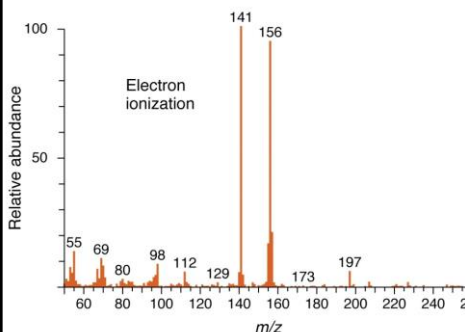


EI vs. CI

MM = 226 Da



Pentobarbital



Fontes de ionização para o LC-MS

- Ionização por *electrospray* – ESI (eletronebulização)
 - Modo ESI “puro”
 - Modo ESI “com assistência pneumática” – atualmente o mais usado
- Ionização Química a Pressão Atmosférica – APCI
- Fotoionização a Pressão Atmosférica – APPI

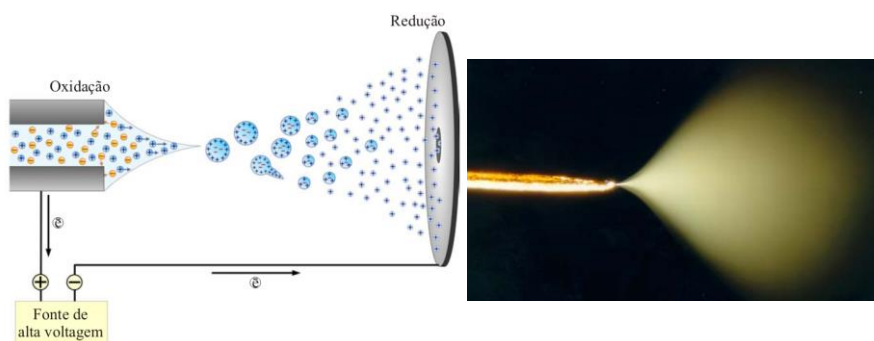


Escolhendo o modo de ionização

- **ESI:** solutos iônicos e polares (MM 100 - 150×10^3 daltons).
Moléculas maiores adquirem mais que uma carga.
- **APCI:** solutos de polaridade média e não-polares (MM 100-2000 daltons).
- **APPI:** mesmos solutos que APCI mas resposta melhor para moléculas de menor polaridade.



Acoplamento LC-ESI-MS

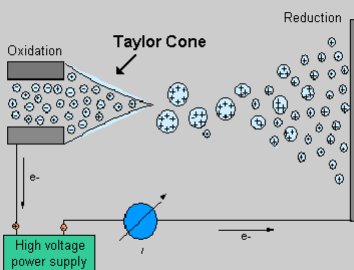


- Melhor opção para análise ácidos e bases fracas
- Mais compatível com baixas vazões

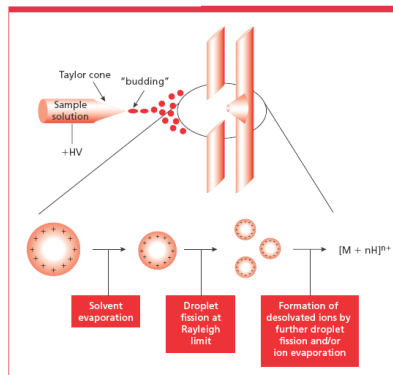


Electrospray – ESI (puro)

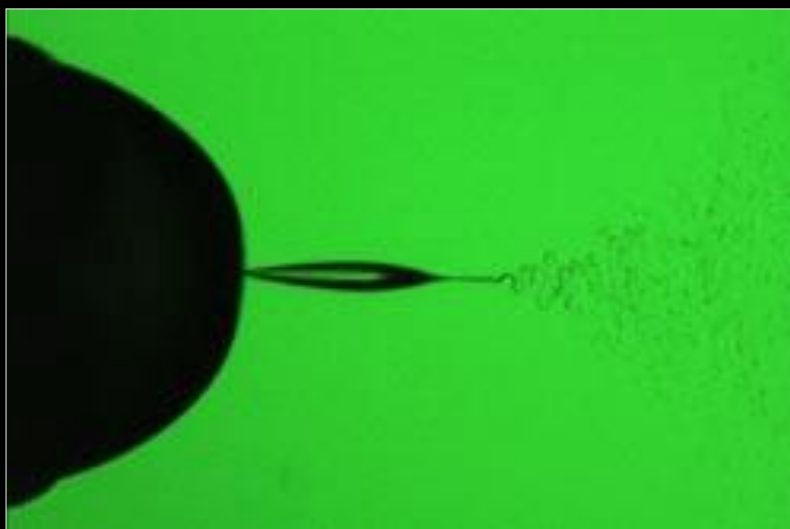
Ion Formation By ESI



Adapted from Kebarle and Tang, Anal. Chem., 65, 2, 972A-985A (1993)

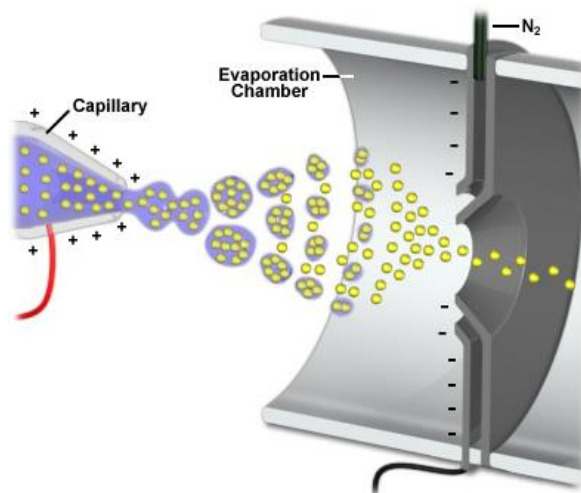


Electrospray - ESI



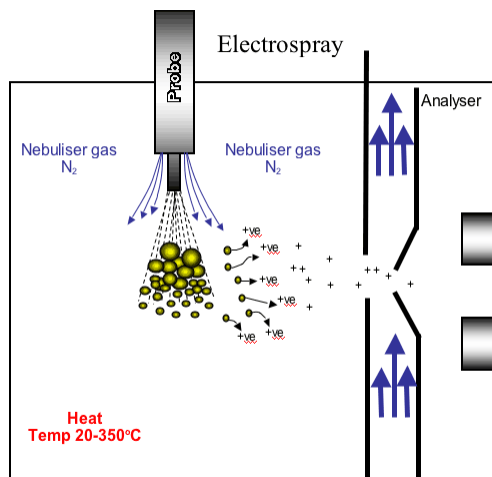
Electrospray – ESI

Vazões: 100 nL/min a 5 μ L/min



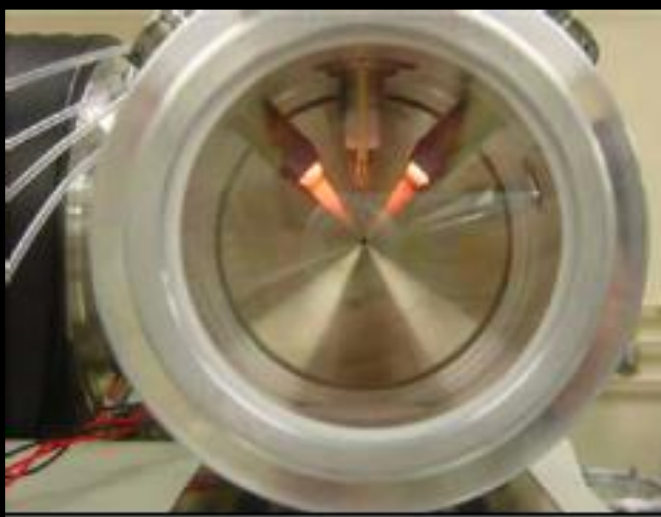
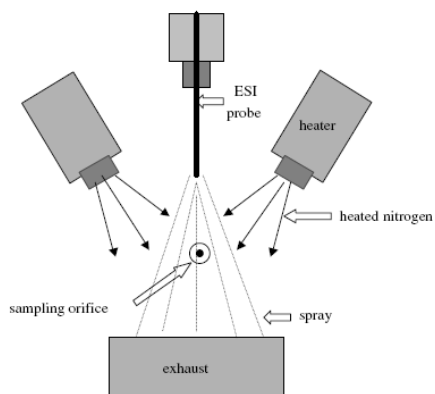
ESI com assistência pneumática (“IonSpray”)

Vazões: 5 μ L/min a 0,2-1,0 mL/min



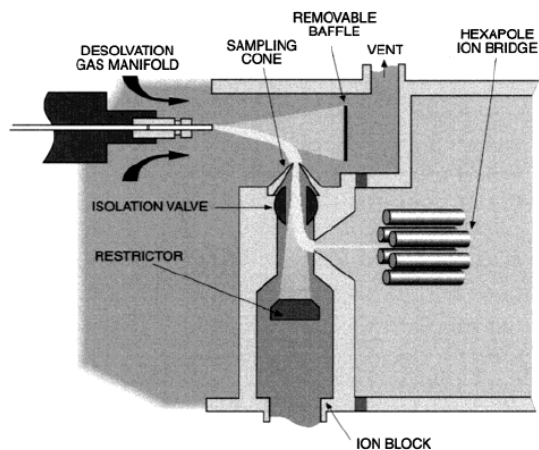
Electrospray – ESI

Vazões: até 3 mL/min (Fonte: “Turbo V” – T até 750 °C)



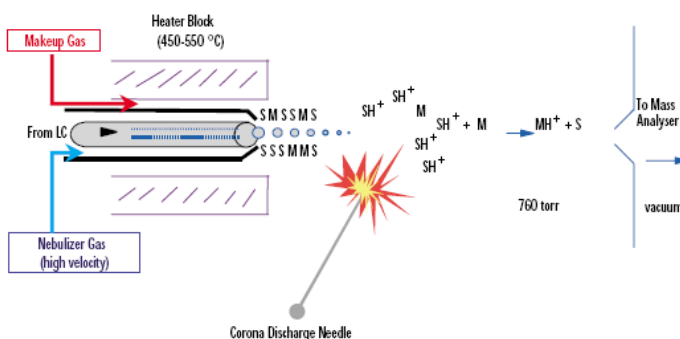
Electrospray – ESI

Fonte de ionização: “Z-Spray source”

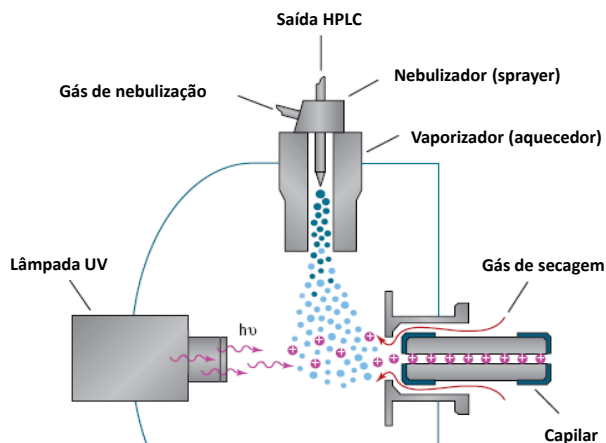


Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI)

Vazões: ~1,0 mL/min



Fotoionização a Pressão Atmosférica (APPI)

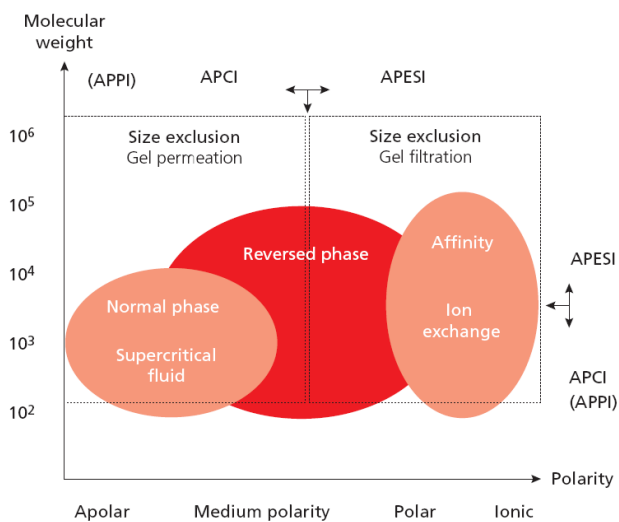


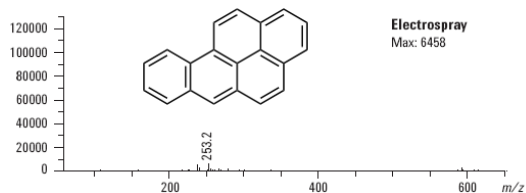
- Pode ser usado um dopante
Ex. Tolueno

Agilent Technologies, www.agilent.com/chem, 2001

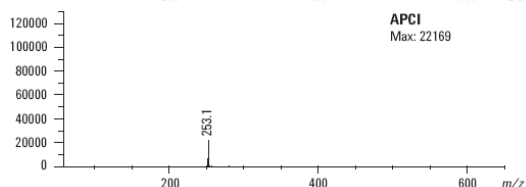


Escolha da técnica de ionização está intimamente relacionada ao modo de separação em LC.

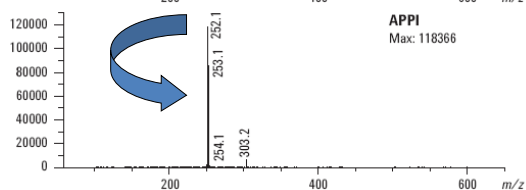




Baixa abundância do íon $[M+H]^+$ em m/z 253.



Íon $[M+H]^+$ mais abundante
Presença de M^+ em m/z 252
Isótopo C_{13} em m/z 254



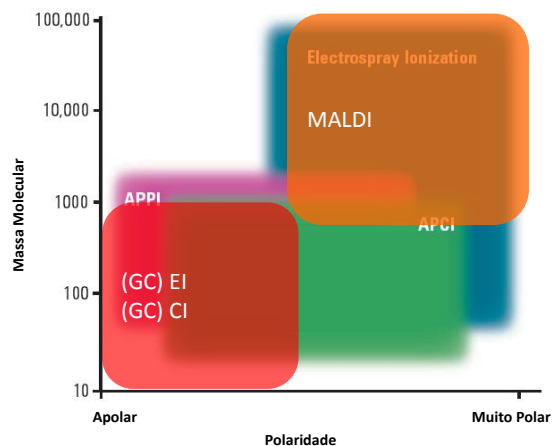
Abundância 5 x maior que APCI e
20 x maior que ESI.

Análise de benzo[a]pireno; 100 picomoles; modo positivo; injeção em fluxo.

Agilent Technologies, www.agilent.com/chem, 2001.

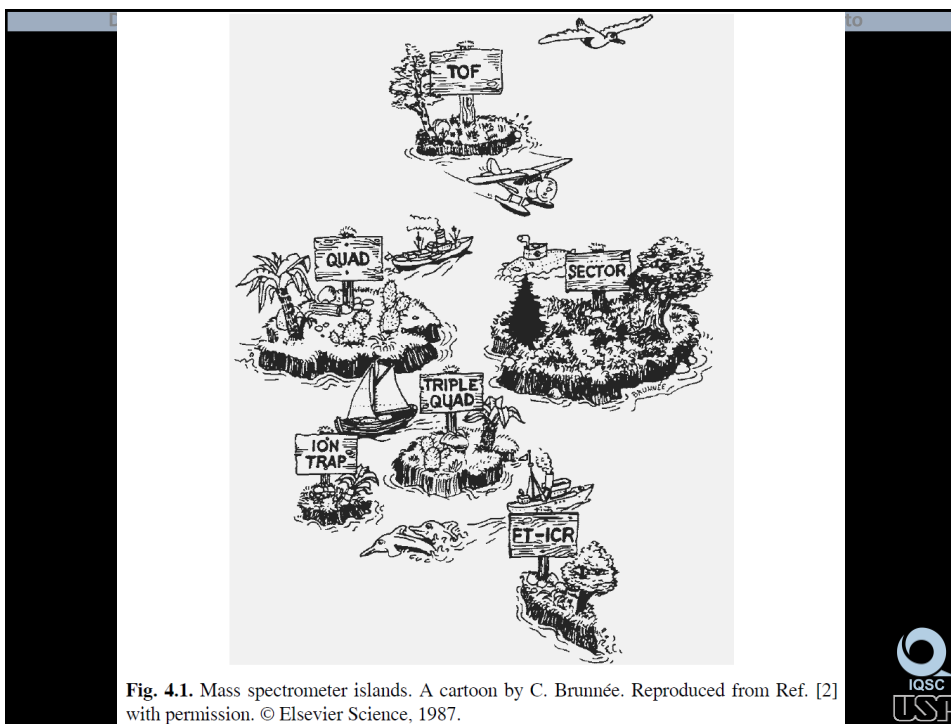


Modos de ionização para MS(/MS)



Fonte: Agilent Technologies, www.agilent.com/chem, 2001.

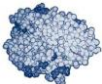
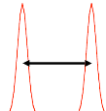

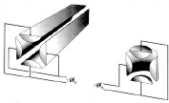
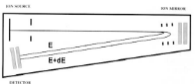

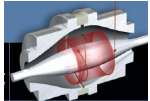
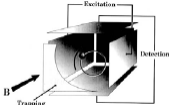





Disciplina SQM0418 – Aula de Espectrometria de Massas – Prof. Alvaro J. Santos Neto

Analísadores para MS

- Setor Magnético e Setor Eletrostático
- Quadrupolo
- *Ion Trap*
- Tempo de Voo
- FT-ICR
- (FT) Orbitrap

			$\Delta m/m$ (ppm)		Amostragem
	Q < 4.000 IT < 6.000	1.000 a 6.000	~ 200	\$ \$/ \$\$	cont. puls.
	Lin. = ∞ Reflec. < 40.000	< 5.000 10.000 a 60.000	~ 200 ~ 10	\$ \$\$	puls.
	< 20.000	~100.000	< 10	\$\$\$\$	cont.
	< 50.000	60.000 a 1.000.000	< 5	\$\$\$	puls.
	< 30.000	Até > 1.000.000	< 5	\$\$\$\$	puls. 

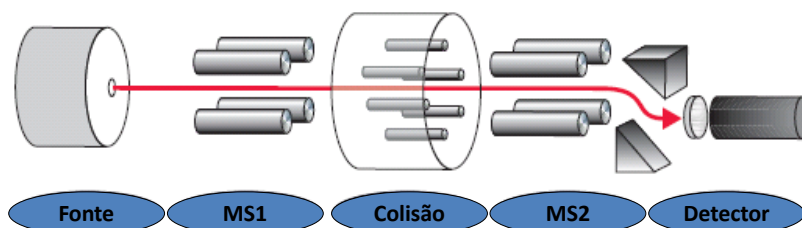
Disciplina SQM0418 – Aula de Espectrometria de Massas – Prof. Alvaro J. Santos Neto

Analísadores MS/MS

- Instrumentos para *Tandem MS*

- “Triplo” Quadrupolo (QqQ)
 - Ion Trap (IT)
 - Convencional (IT 3D)
 - Linear (LIT ou IT 2D)
 - Q-ToF / IT-ToF
 - Qq-LIT
 - LIT-Orbitrap
 - LIT-FTICR
- } Híbridos

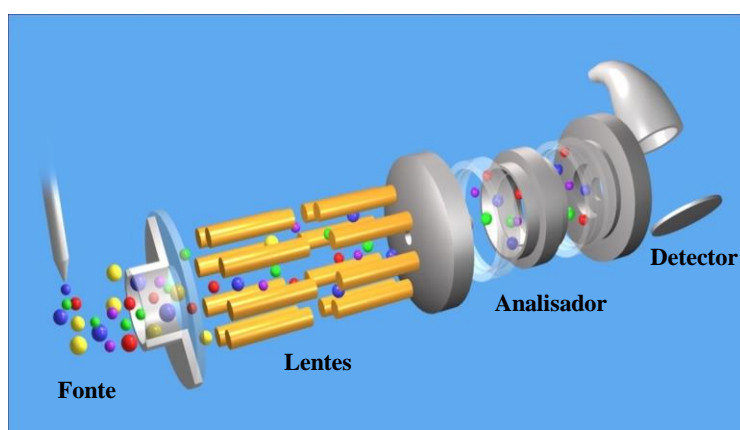
“TANDEM-IN-SPACE” – ex. QqQ



Esquema de um instrumento do tipo “triplo” quadrupolo (QqQ)



“TANDEM-IN-TIME” – ex. Ion Trap

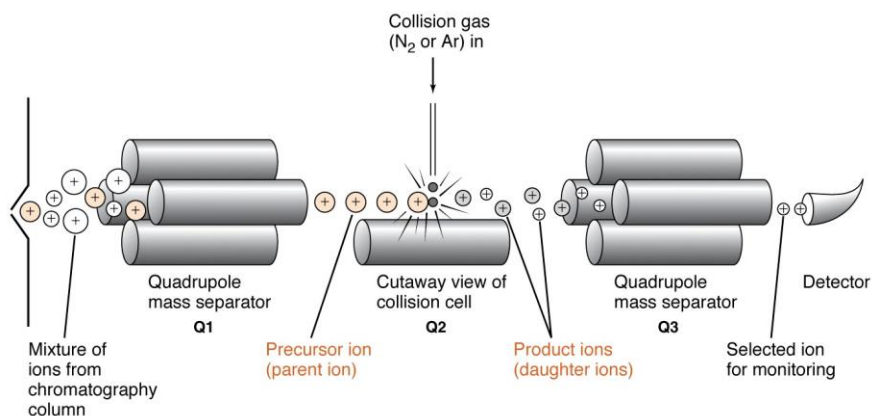


Esquema de um instrumento do tipo Ion Trap MS/MS

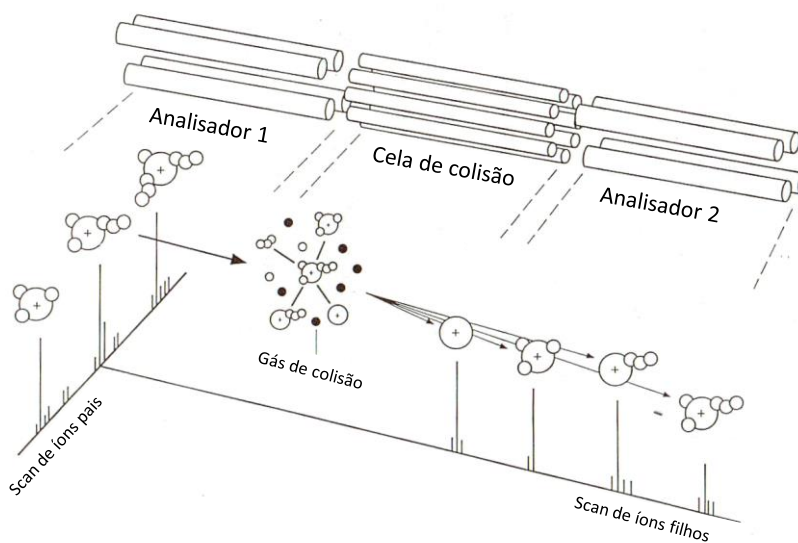


MS/MS (sequencial)

MSⁿ onde *n* indica o número de estágios de MS

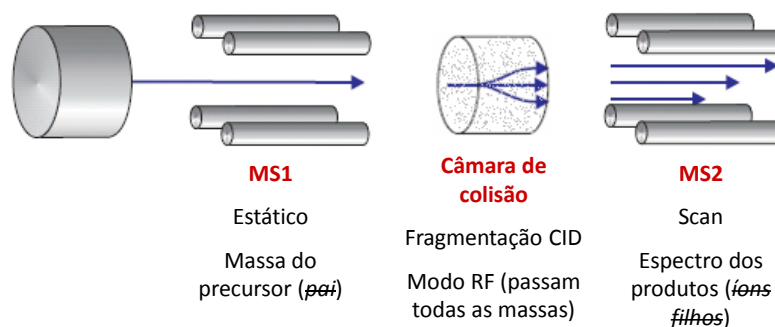


Princípio de operação



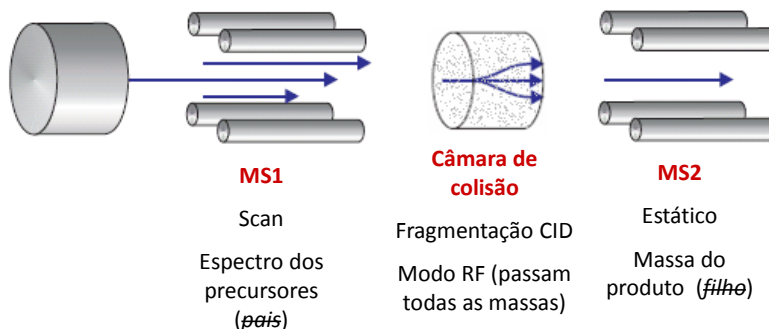
Modos de operação

- Espectro dos produtos ou "íons-filhos"



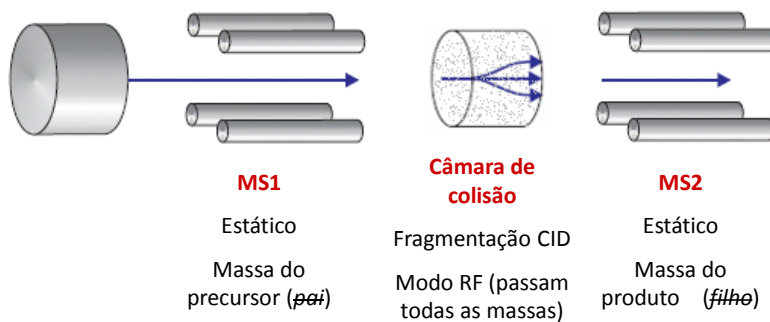
Modos de operação

- Espectro dos precursores ou "íons-pais"

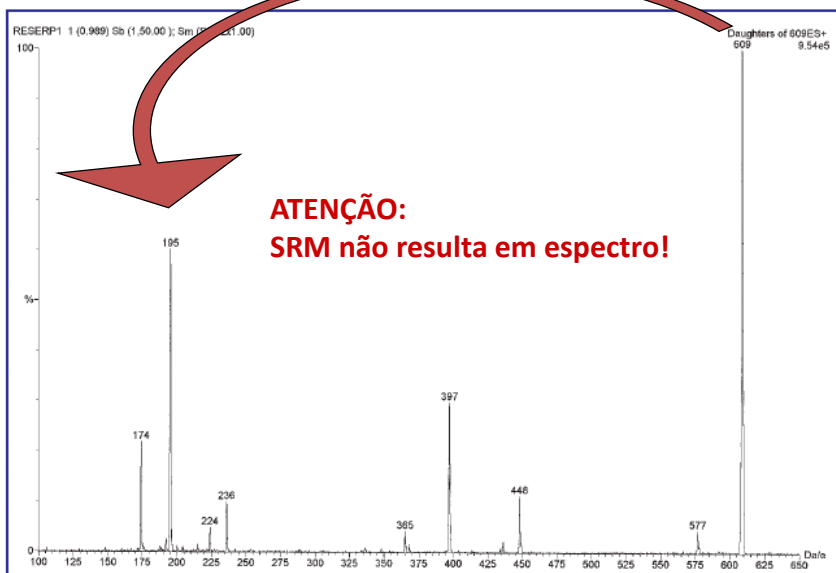


Modos de operação

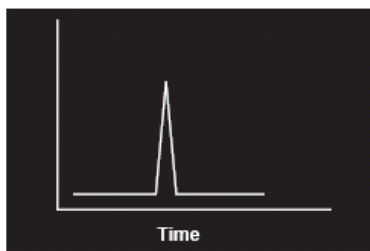
- Monitoramento de Reações Seleccionadas (SRM)



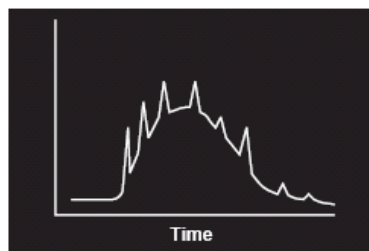
Ex: Monitoramento da transição: m/z 609 \rightarrow m/z 195 para a reserpina.



SIM vs. SRM



LC-MS/MS



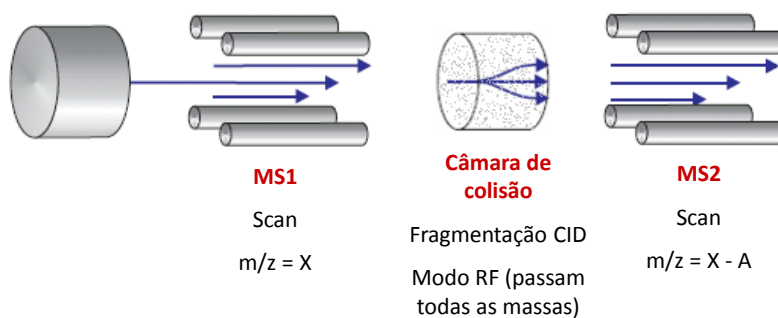
LC-MS

- Especificidade
- Relação S/N

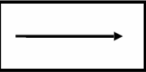

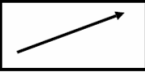

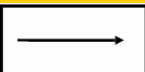
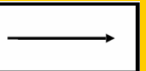





Modos de operação

-Perda Neutra (constante)



Resumo de modos de operação

	MS1	Cela de colisão	MS2
Espectro dos íons produtos	 <i>Seleciona precursor</i>	 RF apenas	 varredura
Espectros dos íons precursores	 varredura		 <i>Seleciona produto</i>
SRM	 <i>Seleciona precursor</i>		 <i>Seleciona produto</i>
Perda Neutra	 Sincronizado MS2		 Sincronizado MS1

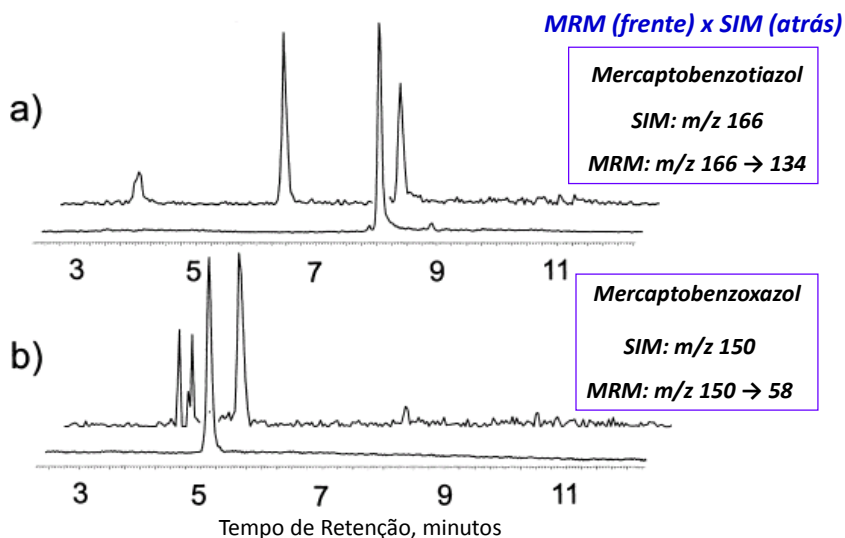


Vantagens do QqQ

- Alta especificidade, precisão e exatidão;
- Torna possível a análise de misturas complexas.
- Alta detectabilidade, principalmente no modo SRM, tornando possível a quantificação de espécies em baixíssimos níveis de concentração.
- **Desvantagem:** *baixa resolução (necessitando de uma separação cromatográfica eficiente) e limitado à 2 estágios de análise de massas (MS²).*



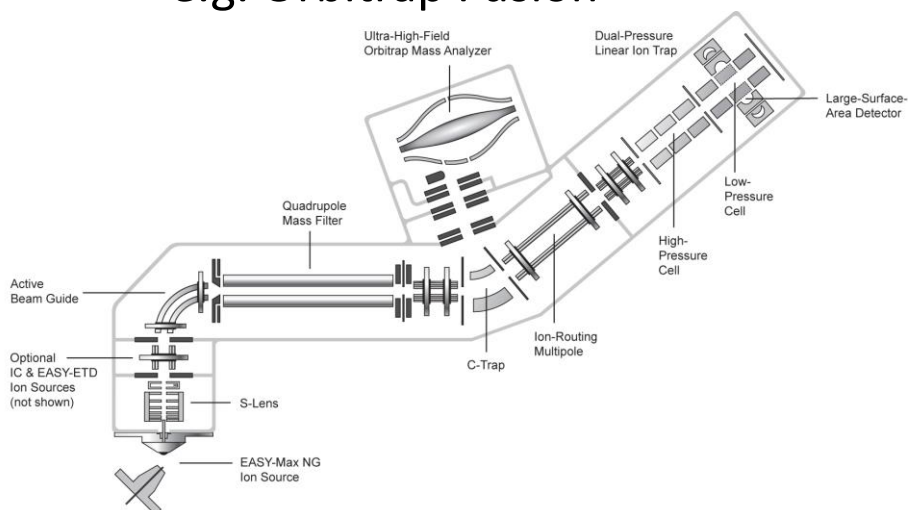
QqQ – Aplicação



Trends Anal. Chem., 2001, 20, 533-542.



Analísadores híbridos e.g. Orbitrap Fusion



Fonte: <http://planetorbitrap.com/orbitrap-fusion#tab:schematic>



Analísadores para MS

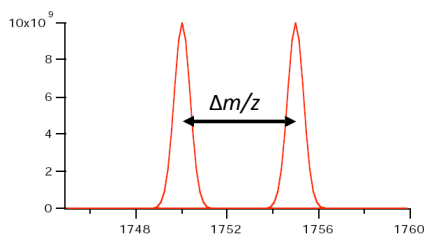
- Setor Magnético e Setor Eletrostático
- Quadrupolo
- *Ion Trap*
- Tempo de Voo
- FT-ICR
- (FT) Orbitrap



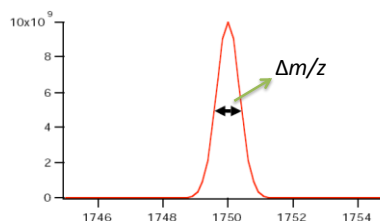
Definições de resolução em MS

- Resolução de Massa (*Mass Resolution*)
- vs.
- Poder de Resolução de Massa (*Mass Resolving Power – RP*)

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



Ex.: 10% do vale



FWHM = Full Width at Half Maximum

(Largura total da metade do pico)



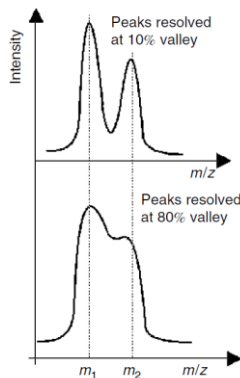


Figure 2.1
Diagram showing the concepts of peak resolution and valley.



Definições de exatidão em MS

- Massa exata (*exact mass*) = massa isotópica calculada
vs.
- Massa acurada (*accurate mass*) = massa medida com a
exatidão do equipamento

$$\text{Erro da medida (Dm)} = m_{\text{medida}} - m_{\text{exata}} \text{ (mDa)}$$

$$\begin{aligned} \text{Grau de Exatidão (Degree of accuracy)} \\ = 10^6 \times \Delta m / m_{\text{exata}} \text{ (ppm)} \end{aligned}$$



Exemplo



$$m/z = 28,006148$$



$$m/z = 27,994915$$

$$\Delta m = 0,011233$$

Requer grau de exatidão de pelo menos 200 ppm

$$\text{RP (10\% vale)} \approx 2.500$$

$$\text{RP (FWHM)} \approx 4.250$$

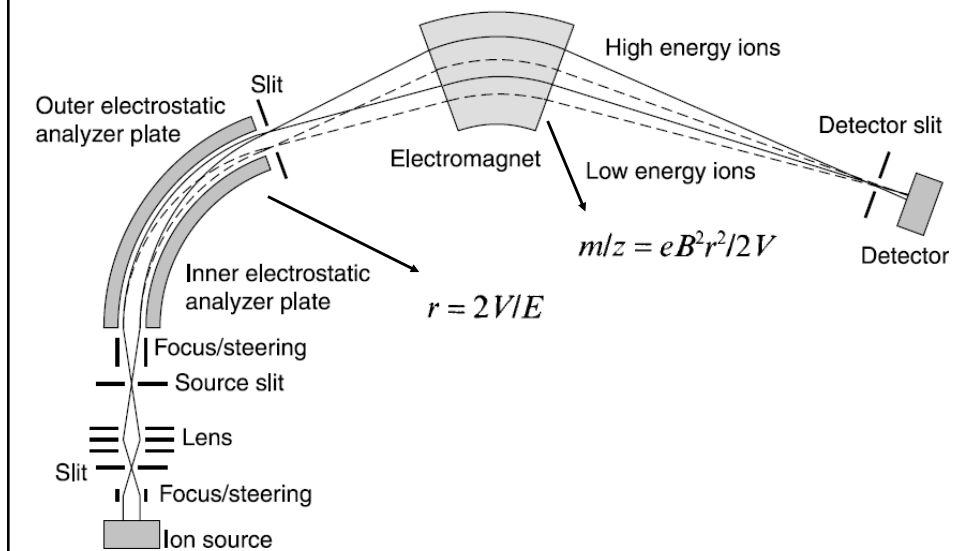


Analísadores para MS

- Setor Magnético e Setor Eletrostático
- Quadrupolo
- *Ion Trap*
- Tempo de Voo
- FT-ICR
- (FT) Orbitrap



Setor Magnético e Setor Eletrostático (Focalização Dupla)



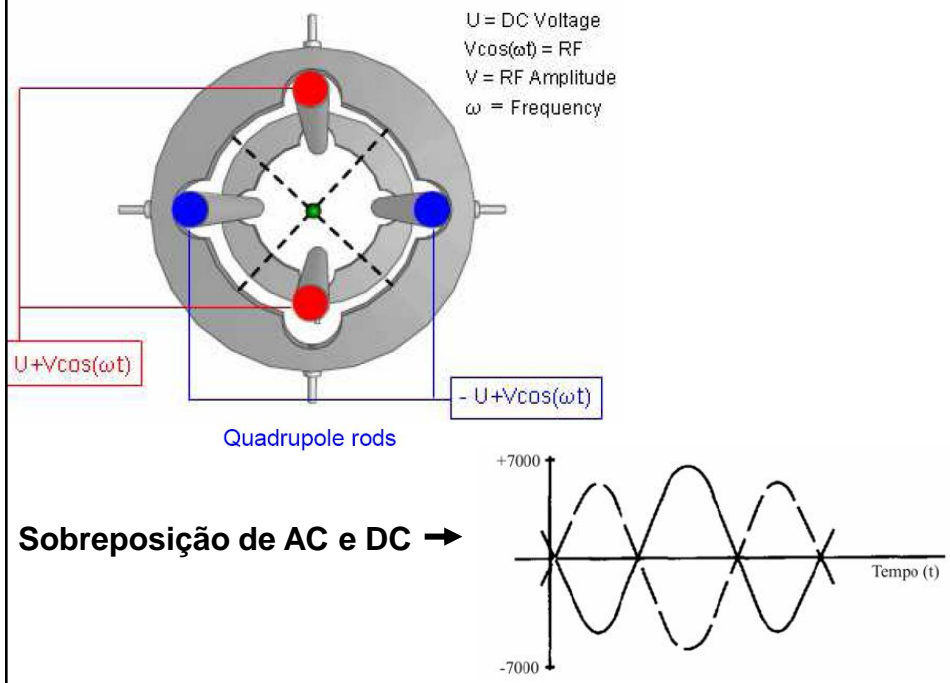
Focalização Dupla

- **Vantagens**
 - Alta resolução e exatidão
 - Excelente estabilidade = resultados quantitativos
- **Desvantagens**
 - Caro -- Difícil de usar
 - Velocidade de varredura limitada (histerese)
 - Detectabilidade é dependente da velocidade

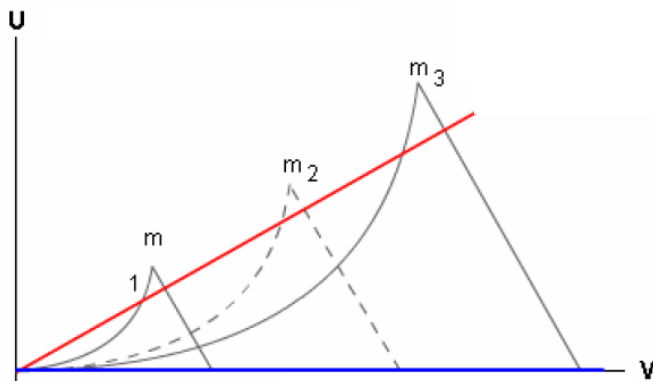
Quadrupolo



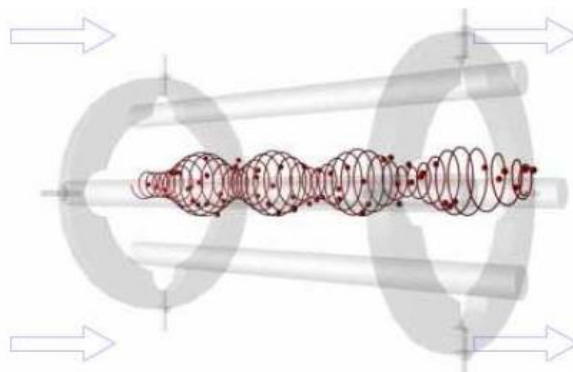
Fonte: http://www.waters.com/waters/pt_PT/What-Types-of-Instruments-Are-Used%3F/nav.htm?cid=10090937



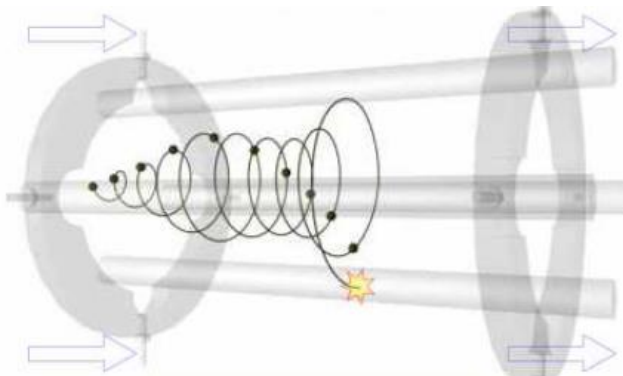
$$a = \frac{8zU}{mr_o^2 \omega^2} \quad q = \frac{4zV}{mr_o^2 \omega^2}$$



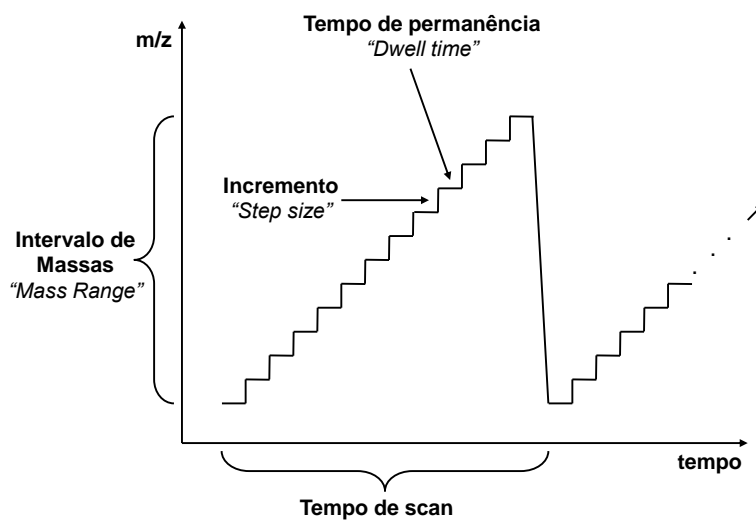
Trajétória de íon em movimento harmônico



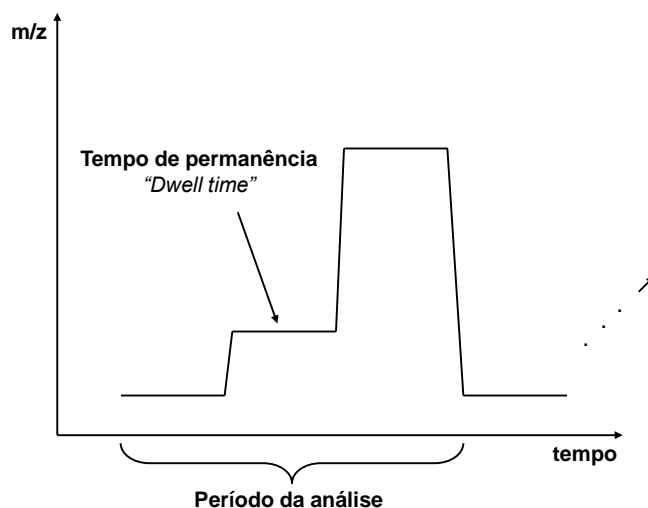
Trajétória de íon em movimento não harmônico



Modo Scan



Modo SIM



Características de um Quadrupolo

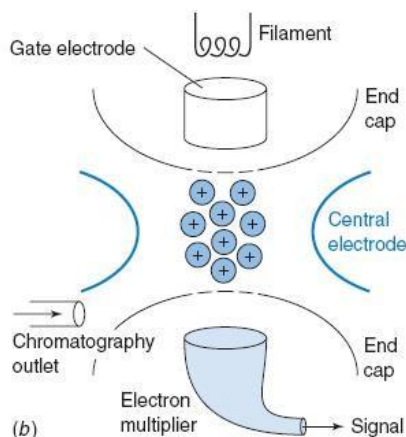
- $m/z < 4000$ Da/e
- Baixo RP: 1000-4000 (FWHM)
 - geralmente 0,7 a 1,0 Da
- Grau de Exatidão: 100 a 200 ppm
- Baixo custo
- Velocidade de varredura razoável
- Velocidade de varredura influencia na detectabilidade



Quadrupolo Aprisionador de Íons - *Ion trap*



(a)



(b)



Ion trap

$$a_z = -2a_r = - \frac{16eU}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2}$$

DC on the Ring

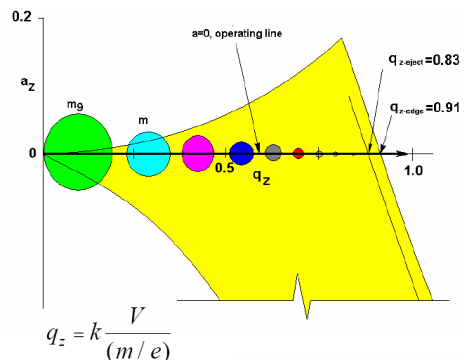
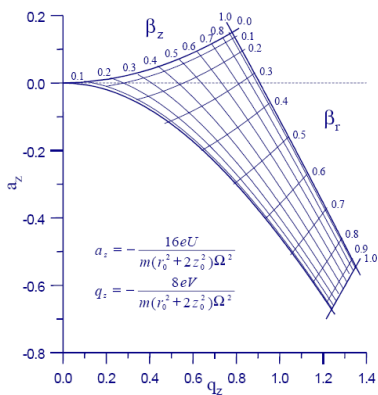
$$q_z = -2q_r = - \frac{8eV}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2}$$

RF on the Ring

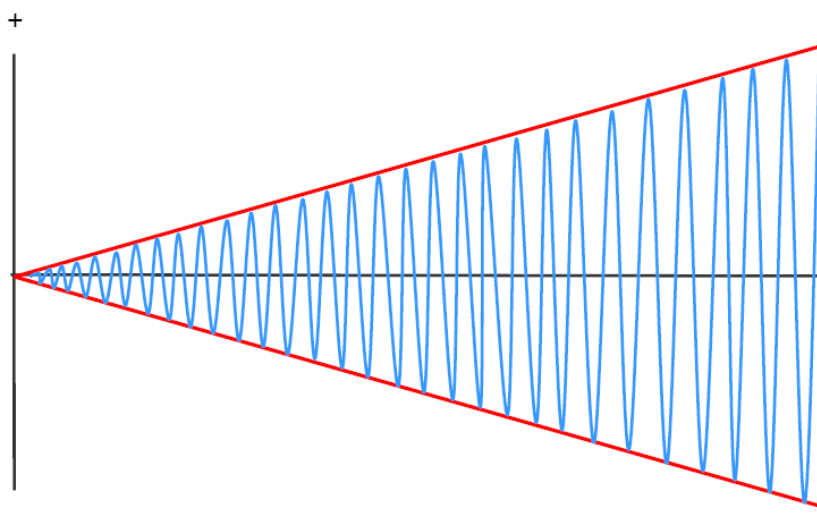
Mass Ring Parameters



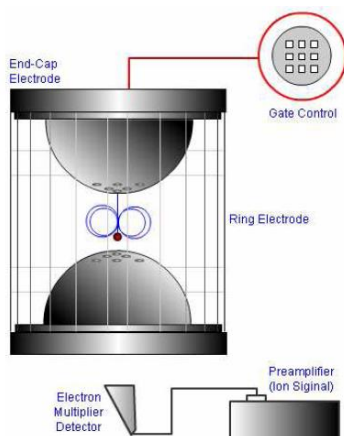
Ion trap



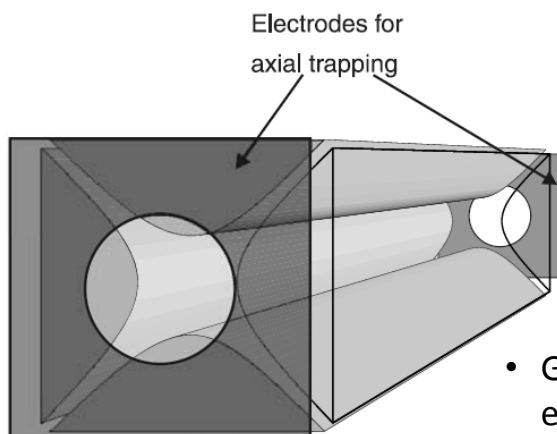
Varredura do potencial V



Varredura do potencial V



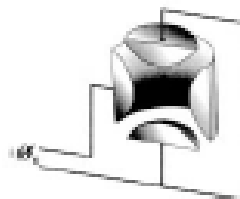
Ion trap linear - LIT



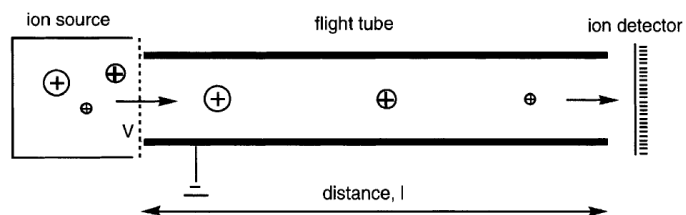
- Geralmente usado em equipamentos híbridos

Características de um IT

- $m/z < 6.000 \text{ Da/e}$
- RP: 1000 a 5000 (FWHM)
 - Geralmente 0,7 a 1,0 Da
- Grau de Exatidão: 200 a 300 ppm
- Baixo custo
- MS^n ($n < 4$ ou 5)
- *Charge-space effects*



Tempo de Voo - TOF

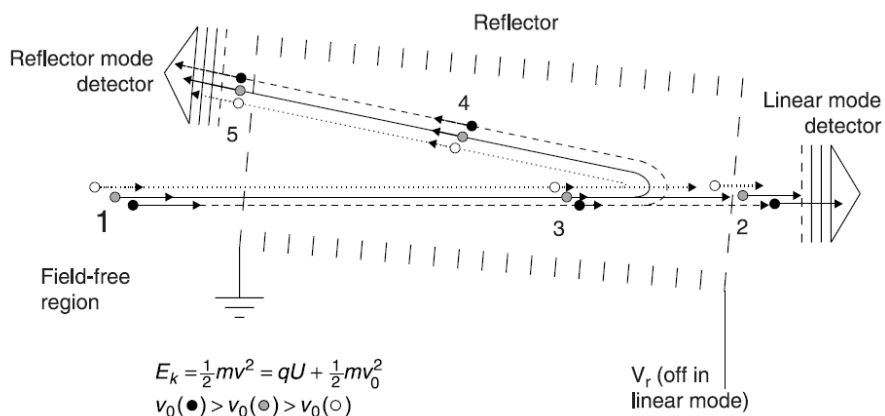


$$t = \frac{L}{v} = L \left(\frac{m}{2zeV} \right)^{1/2}$$

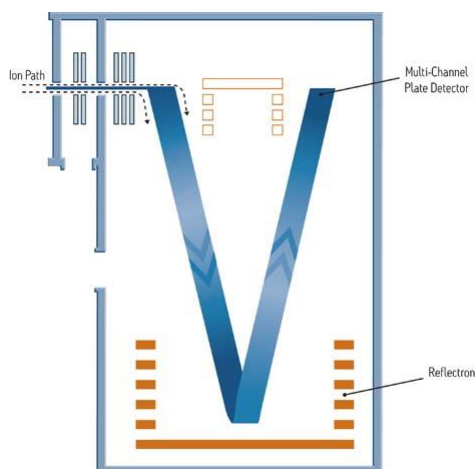
$$m/z = \frac{2eVt^2}{L^2}$$



TOF de alta resolução – *Reflectron*



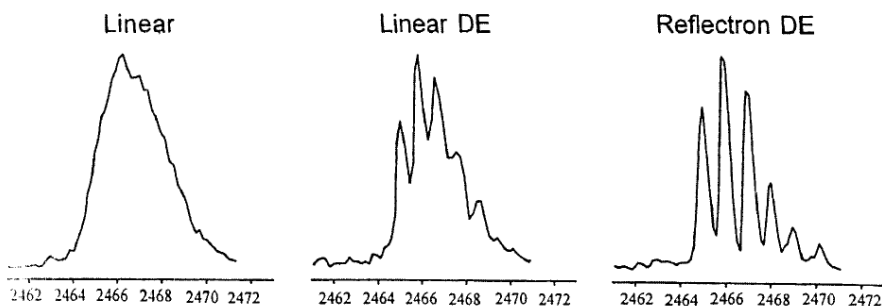
TOF de alta resolução – arranjo ortogonal + *reflectron*



Fonte: http://www.waters.com/waters/pt_PT/What-Types-of-Instruments-Are-Used%3F/nav.htm?cid=10090937



TOF de baixa e alta resolução

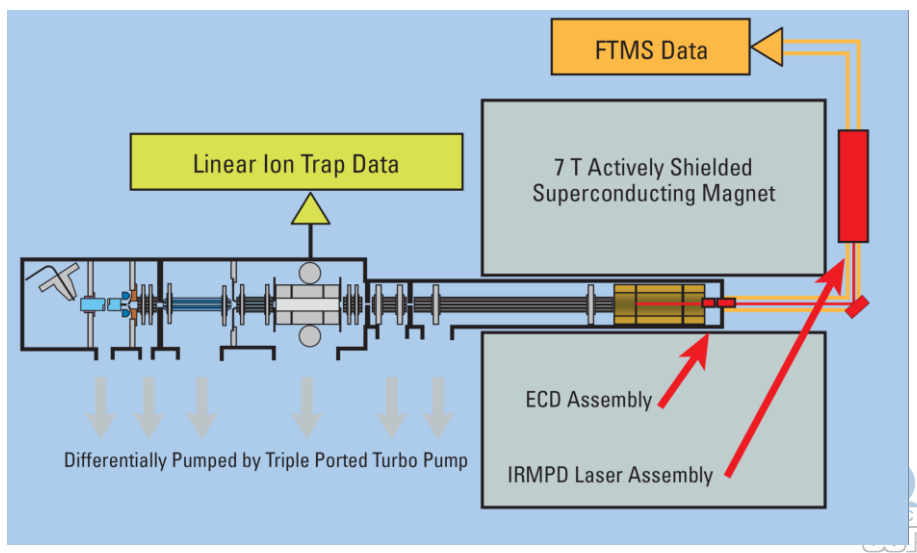


Características do TOF

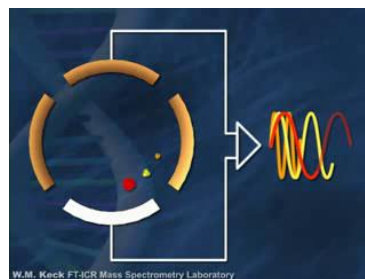
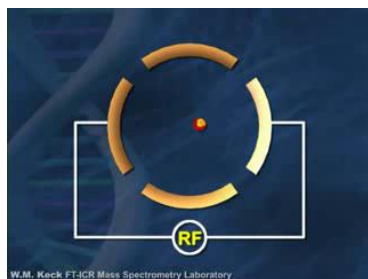
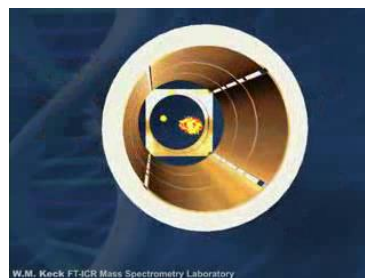
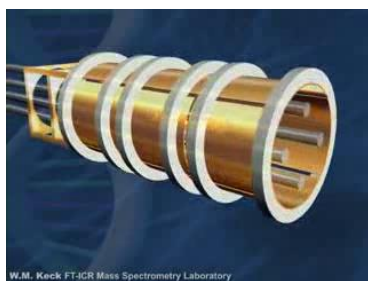
- Aquisição veloz do espectro com sensibilidade
- Virtualmente sem limite de massas (modo sem reflexão)
- Bom poder de resolução : 10.000 a 50.000 (FWHM)
 - para melhor RP: ortogonal, DE (*delayed extraction*) e refletor
 - geralmente < 20.000 (FWHM)
- Grau de Exatidão: 20 a 100 ppm
- Exige calibração interna para melhorar exatidão



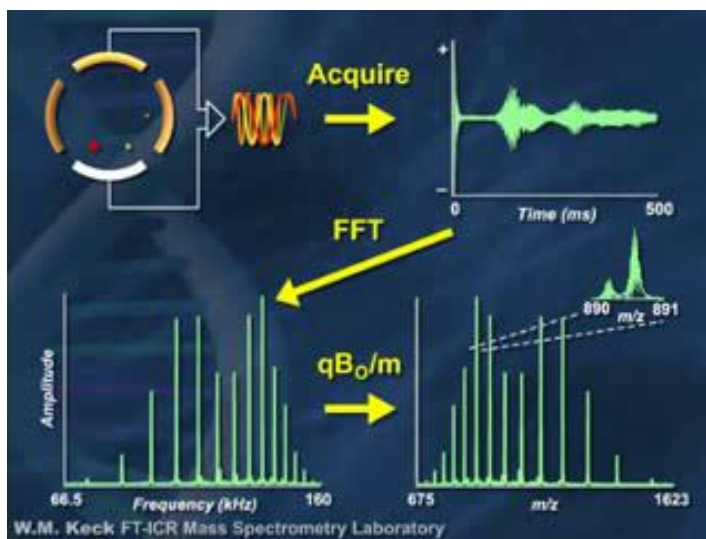
Ressonância Ciclôtrônica de Íons com Transformada de Fourier (FT-ICR)



FT-ICR

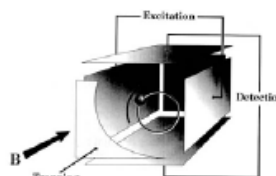


FT-ICR



Características de um FT-ICR

- m/z : < 4000 híbrido ou até 70.000 Da/e
- RP: 100.000 a 1.000.000 (FWHM)
- Exatidão: < 1 ppm (int) ou <1,2 ppm (ext)
- Custo alto
- Dificuldade de operação
- Manutenção

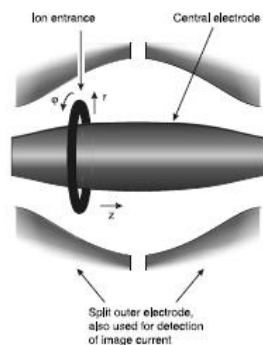
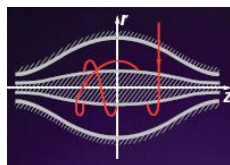
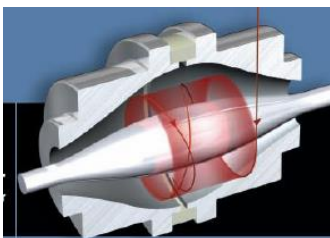


- 150 L He líquido (troca cada 100 dias)
- 100 L N₂ líquido (troca cada 7 dias)



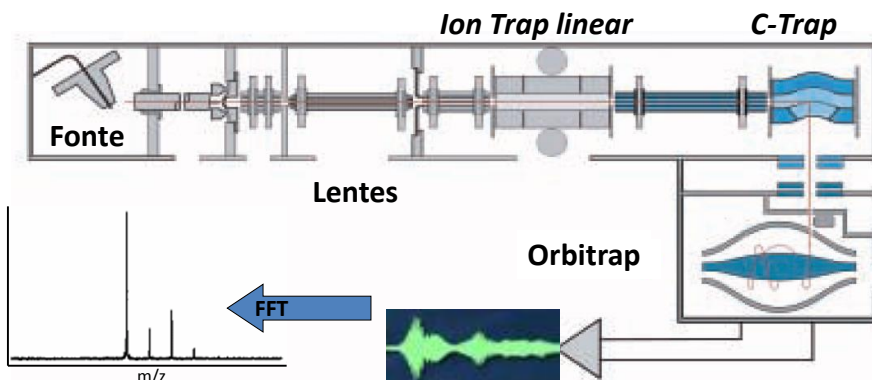
Orbitrap

- Aprisionador eletrostático orbital axialmente harmônico
- Também utiliza FFT
- Mais nova tecnologia de análise de massas (2002)



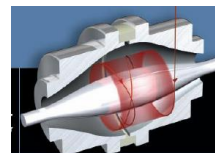
<http://planetorbitrap.com/g-exactive#.UoNbeBpwp28>

LTQ Orbitrap®



Características de um Orbitrap

- $m/z < 50000$ Da/e
- Resolução até 200.000 (FWHM)
 - Geralmente 60.000 ou 100.000
- Exatidão: 1 a 2 ppm (com PI)
- Custo relativamente alto

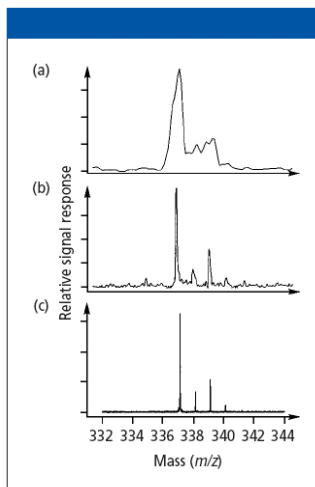


Qual a importância da Exatidão de Massa?

$m/z_{\text{medida}} = 282.1242$

(A)	(B)	(C)
$C_{16}H_{28}NO_3$	$C_{16}H_{16}N_3O_2$	$C_{14}H_{20}NO_3S$
282.2069	282.1242	282.1164
82.7 mmu	0.0	7.8 mmu
293 ppm	0.1 ppm	28 ppm

Qual o efeito da resolução do analisador?



Comparação de espectros de massas obtidos por diferentes analisadores:

a) Quadrupolo

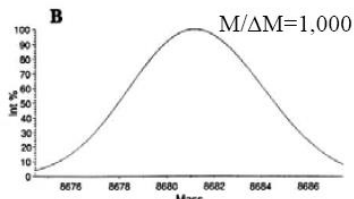
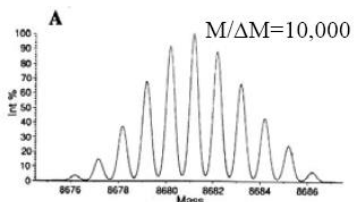
b) ToF

c) Transformada de Fourier

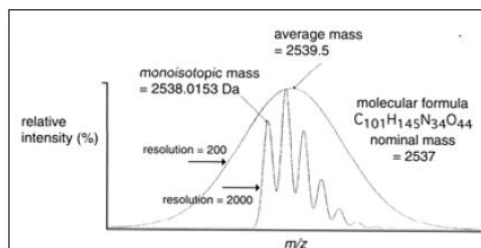
LC-GC., 2001, 19, 514-523.



Para que a resolução é importante?



Source: R. Caprioli, M. Sumec, M. Stoeckli: Mass Spectrometry



“Sem resolução boa não há exatidão adequada!”



Escolhendo o analisador em LS-MS

Function	Single Quad	Triple Quad	Ion Trap	TOF	0-TOF	Instrument need	Single Quad	Triple Quad	Ion Trap	TOF	0-TOF
	Quantitation – few compounds	■	■	■	■		■	Full scan sensitivity	■	■	■
Quantitation – many compounds	■	■	■	■	■	SIM or MRM sensitivity	■	■	■	■	■
High throughput quantitation	■	■	■	■	■	Specificity (MS/MS)	■	■	■	■	■
Metabolite identification	■	■	■	■	■	Mass resolution	■	■	■	■	■
Degradation products	■	■	■	■	■	Mass accuracy	■	■	■	■	■
Peptide sequencing/protein id	■	■	■	■	■	Quantitative accuracy	■	■	■	■	■
Polymer characterization	■	■	■	■	■	Linear dynamic range	■	■	■	■	■
Data dependent operation	■	■	■	■	■	Mass range	■	■	■	■	■
Characterize FAST LC peaks (1-3 s peak widths)	■	■	■	■	■	Scan speed	■	■	■	■	■
						Low cost	■	■	■	■	■

Best chance of success
 Chance of success
 Good chance of success
 Not recommended

Fonte: Agilent Technologies
 Publication #: 5989-5848EN

Detectores – Multiplicadora de elétrons com dinodo discreto

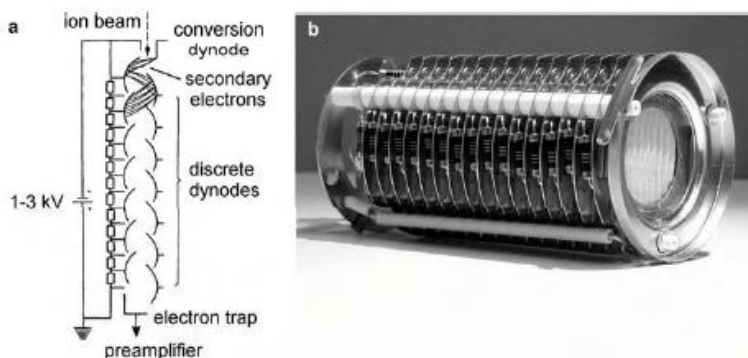


Fig. 4.57. Discrete dynode electron multipliers. (a) Schematic of a 14-stage SEM. (b) Photograph of an old-fashioned 16-stage Venetian blind-type SEM clearly showing the resistors and ceramics insulators between the stacking dynodes at its side. (a) Adapted from Ref. [238] by permission. © Springer-Verlag Heidelberg, 1991.

Detetores – Multiplicadora de elétrons contínua - *channeltron*

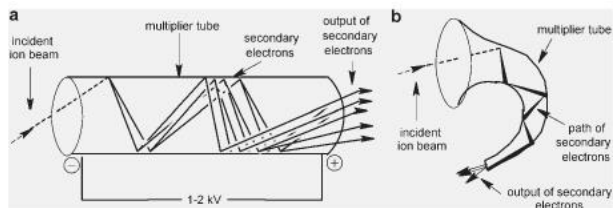


Fig. 4.58. Schematic of linear channel electron multiplier (a) and curved channel electron multiplier (b). By courtesy of Waters Corporation, MS Technologies, Manchester, UK..

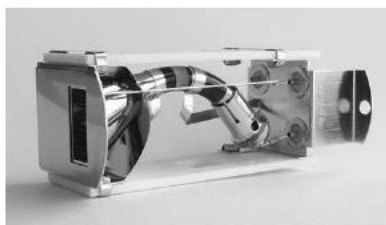


Fig. 4.59. Photograph of a channeltron multiplier.

Detetores – Placas com microcanais – *microchannel plates*

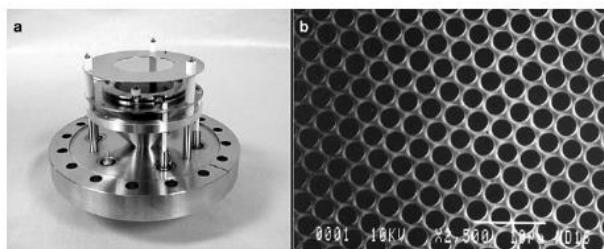


Fig. 4.60. MCP detector (shimmering surface) mounted on top of a flange (a) and SEM micrograph of a high resolving MCP showing channels of 2 μm diameter (b). By courtesy of (a) R.M. Jordan Company, Grass Valley, CA and of (b) Burle Industries, Baesweiler.

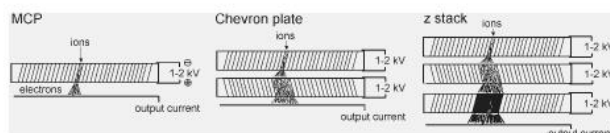


Fig. 4.61. Stacking of MCPs to increase gain. From left: single MCP, Chevron plate, and z-stack configuration. Note the loss of spatial resolution upon stacking.