

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**
- **Analísadores de massa**
 - **Resolução e Exatidão de Massa**
- **Detectores**
- **MS/MS**



O que é a espectrometria de massas?

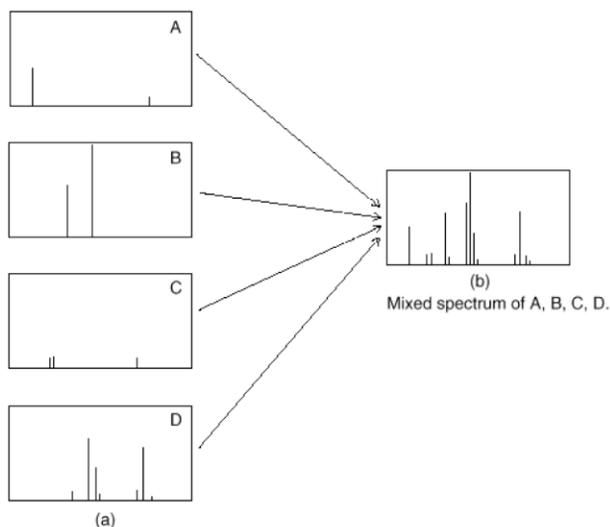
O que faz a MS?

Como funciona a MS?

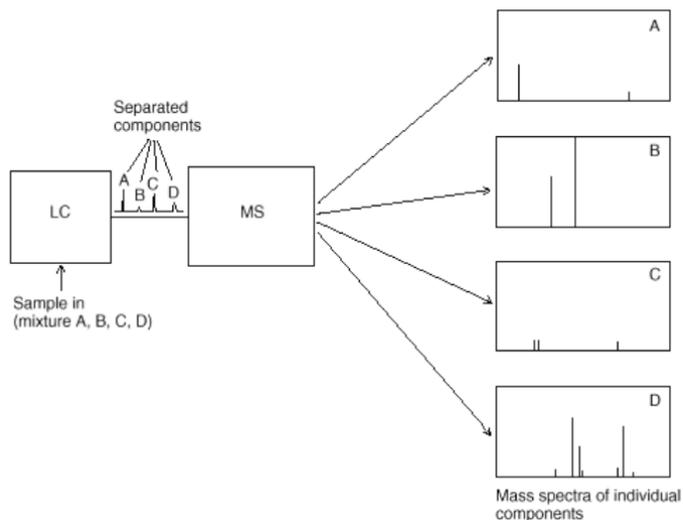
Em que a MS pode ser útil?



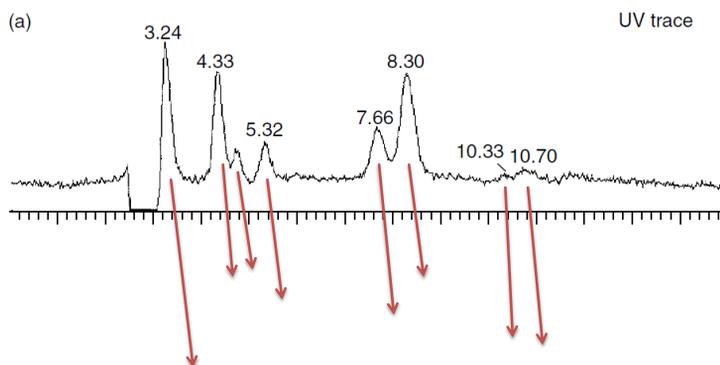
Misturas em MS



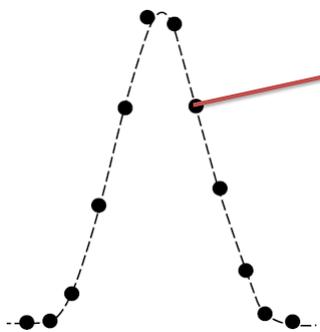
Combinando a cromatografia com a MS



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



O pico cromatográfico em MS



Contém toda a informação de MS:

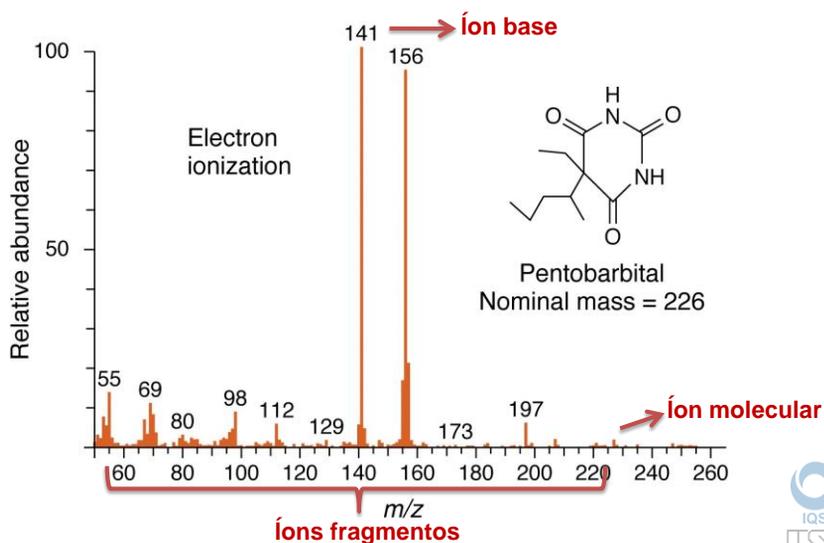
- Espectro completo (TIC)
- Ions selecionados (SIM)

Ou toda a informação de MS/MS:

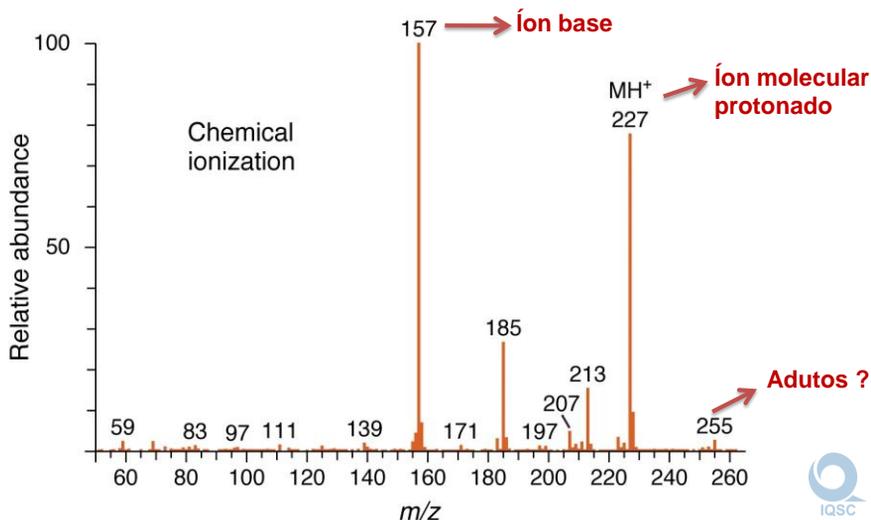
- Reações específicas (SRM)
- Perda neutra (*neutral loss*)
- Ions precursores
- Ions produtos



O Espectro de Massas



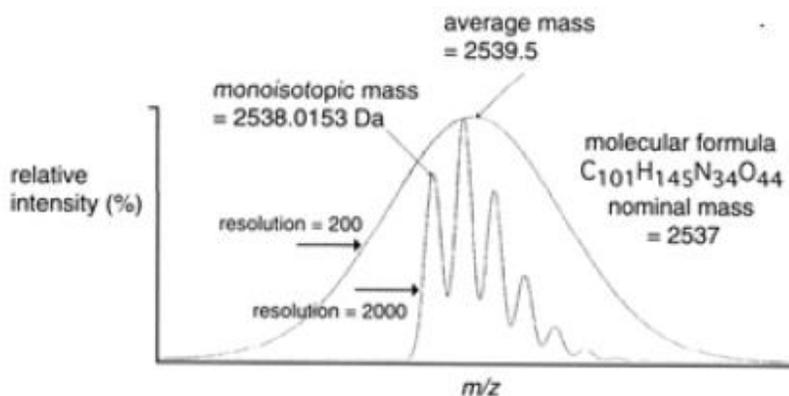
O Espectro de Massas



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

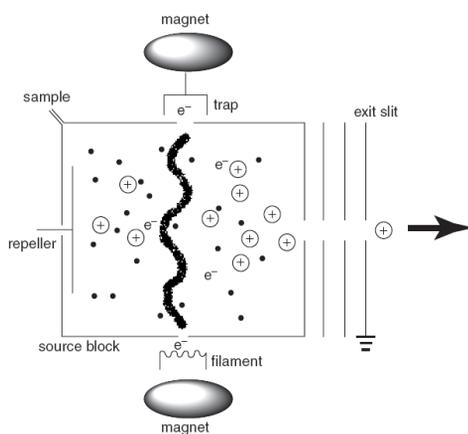
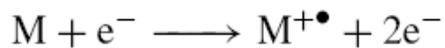
1. Ionização dos analitos
2. Seleção/Separação dos íons de acordo com m/z *
3. Detecção

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

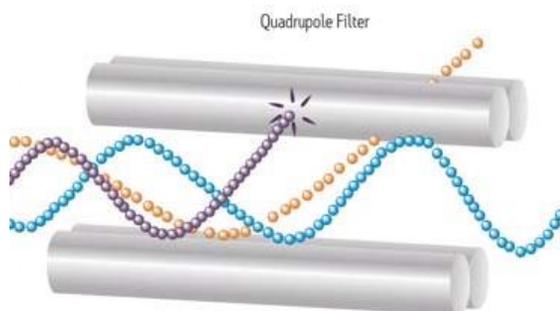
* Apesar do termo espectrometria de massas, sempre se mede o valor de m/z .



1. Ionização

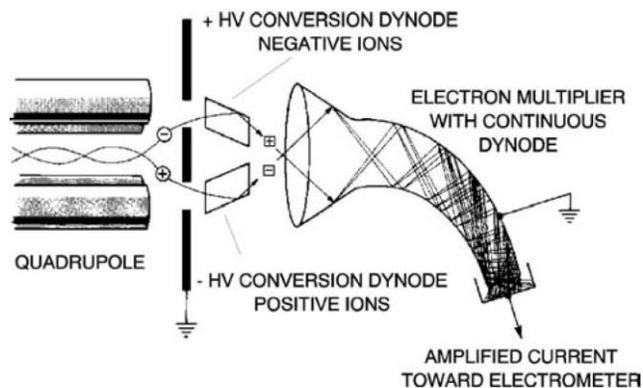


2. Análise/separação



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

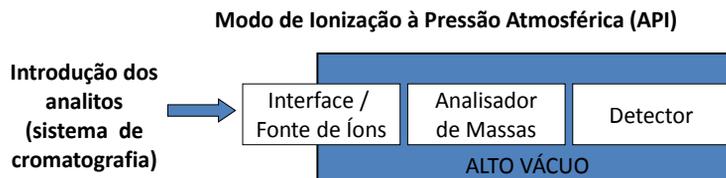
3. Detecção



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*)

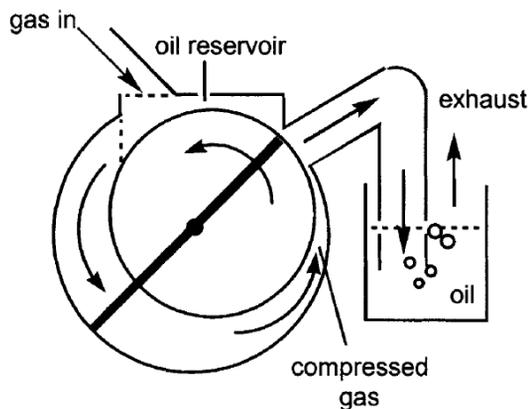


Figure 3.28 *Cross-section of a rotary vacuum pump*



Sistemas de vácuo

Bomba turbomolecular

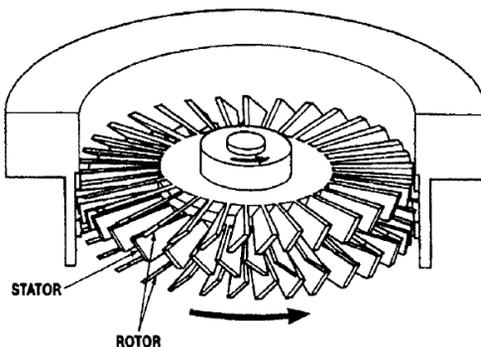
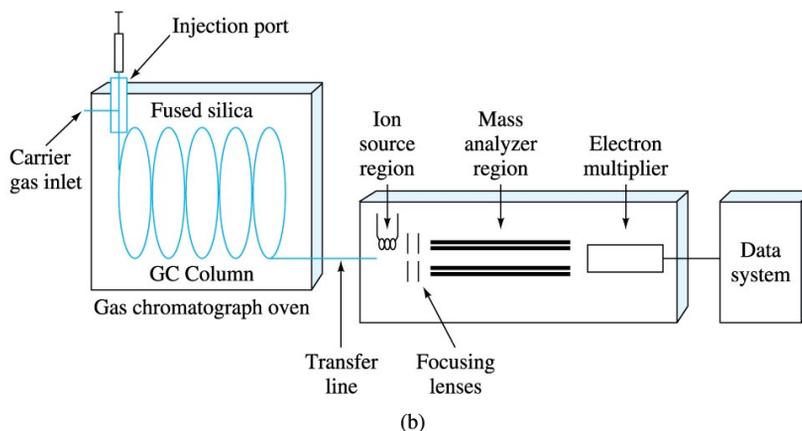


Figure 3.30 *View of the rotor of a turbomolecular pump*
(Source: J.T. Watson, *Introduction to Mass Spectrometry*, 3rd edition, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997, Figure 19.7, p. 431)



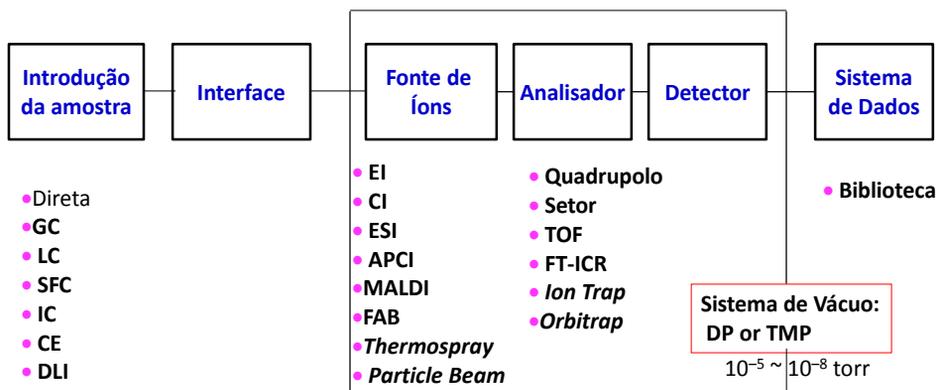
Esquema de um equipamento – GC-MS



© 2004 Thomson - Brooks/Cole



Tipos de componentes para um espectrômetro de massas



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

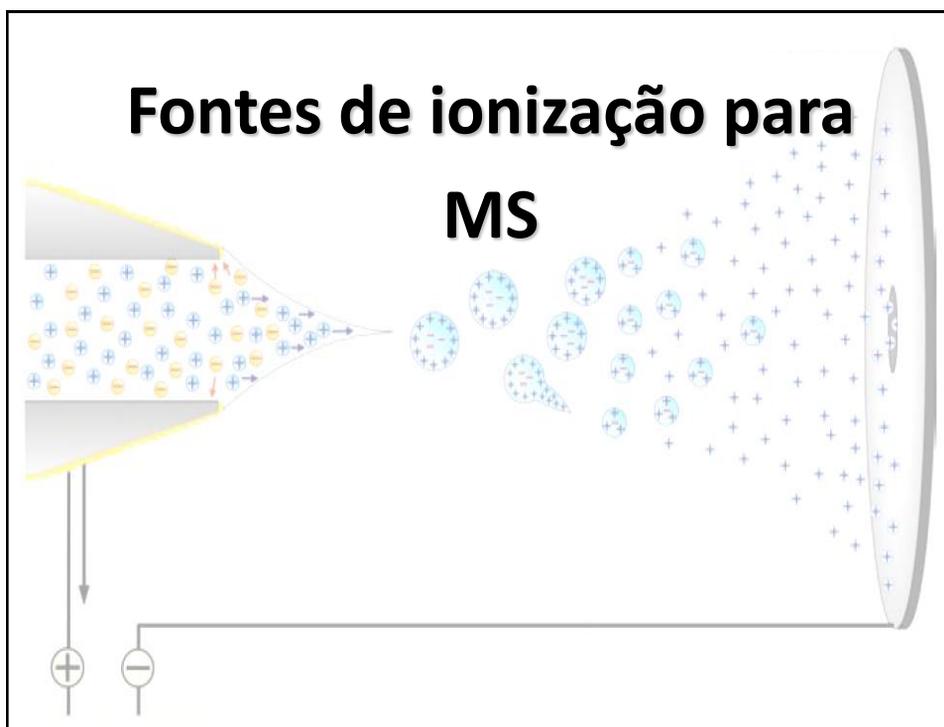
- EI
- CI
- ESI
- APCI
- MALDI
- FAB
- Thermospray
- Particle Beam

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

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

- Biblioteca





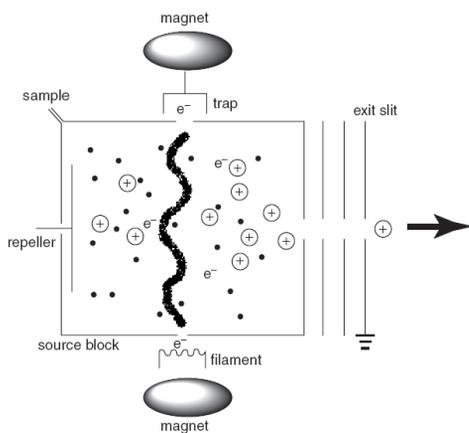
Disciplina SQM0418 – Aula de Espectrometria de Massas – Prof. Alvaro J. Santos Neto

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 $M + e^- \Longrightarrow M^{+\bullet} + 2e^-$
- Formação de íon molecular $M^{+\bullet} \Longrightarrow M^+$
- Fragmentação em íon + radical $M^{+\bullet} \Longrightarrow A^+ + B^\bullet$
- Fragmentação em íon radicalar + perda neutra $M^{+\bullet} \Longrightarrow C^{\bullet+} + D$



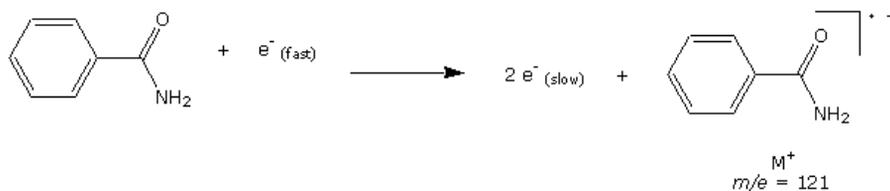
Alguns mecanismos na formação dos íons

Analito = AB

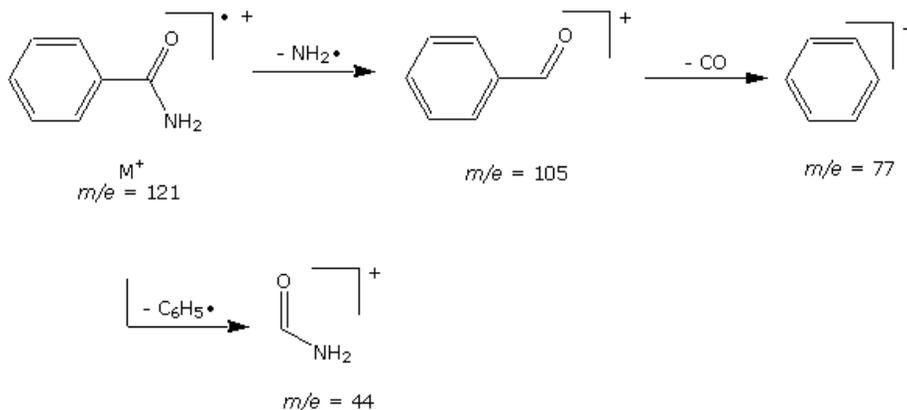
1. $AB + e^- \rightarrow A^+ + B^- + e^-$
2. $AB + e^- \rightarrow A^+ + B^- + 2e^-$
3. $AB + e^- \rightarrow [AB^{+\bullet}] + 2e^-$, seguido por: $[AB^{+\bullet}] \rightarrow AB^{+\bullet}$ - íon molecular
4. $AB + e^- \rightarrow [AB^{2+\bullet}] + 3e^-$, seguido por: $[AB^{2+\bullet}] \rightarrow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



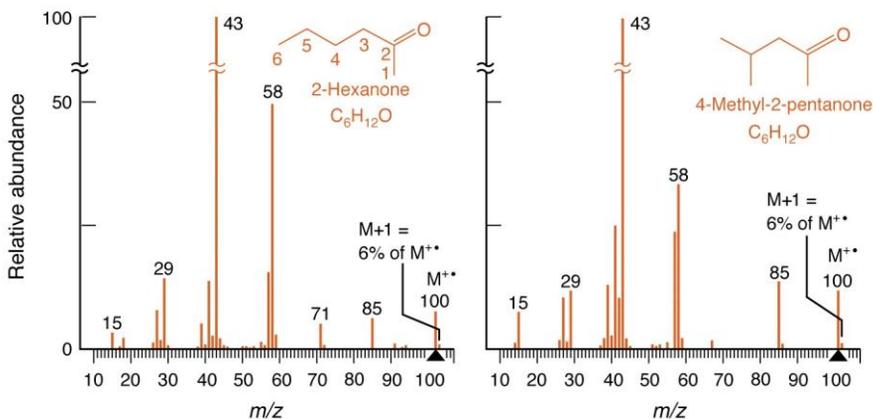
O processo de ionização em GC-EI-MS



O processo de fragmentação em GC-EI-MS



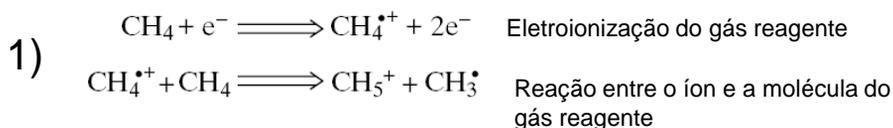
Espectro de massas por EI (70 eV) de duas cetonas isoméricas com composição $C_6H_{12}O$



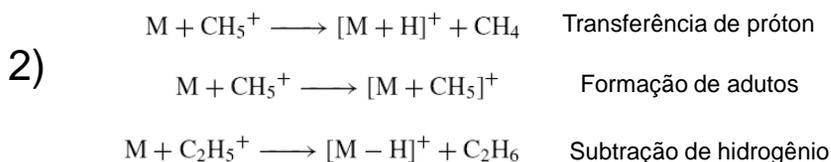
Fonte de CI

- 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

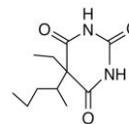
Amônia:

- 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

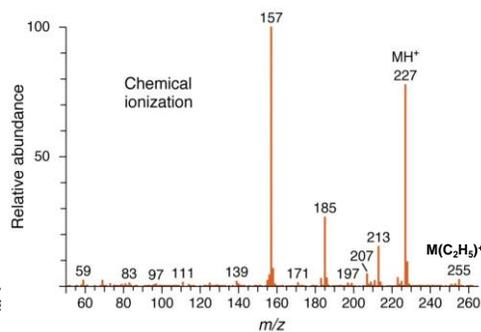
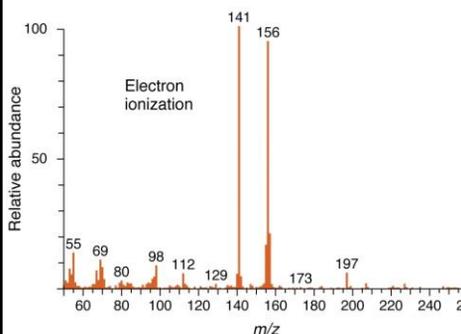


EI vs. CI

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

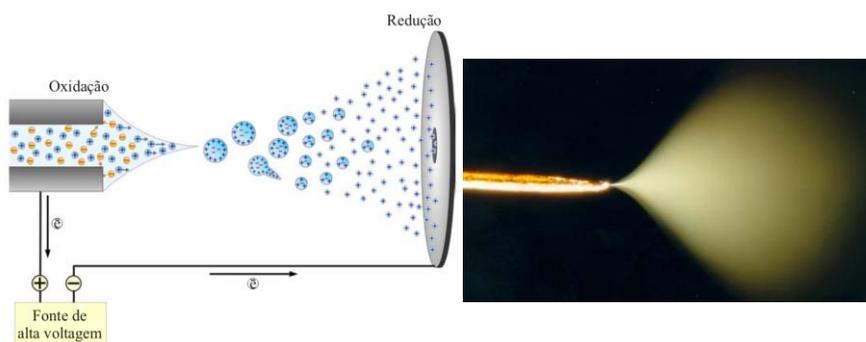


Escolhendo o modo de ionização

- **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

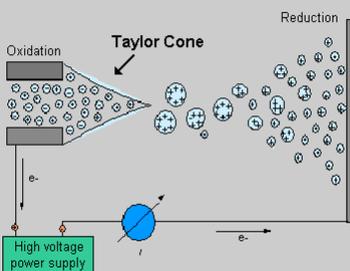


- Melhor opção para análise ácidos e bases fracas
- Mais compatível com baixas vazões

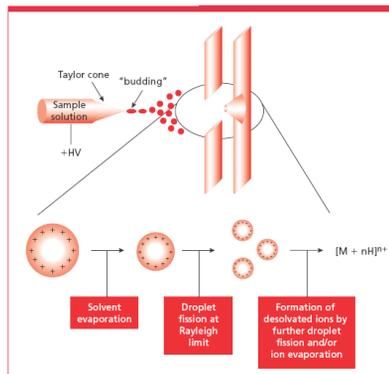


Electrospray – ESI (puro)

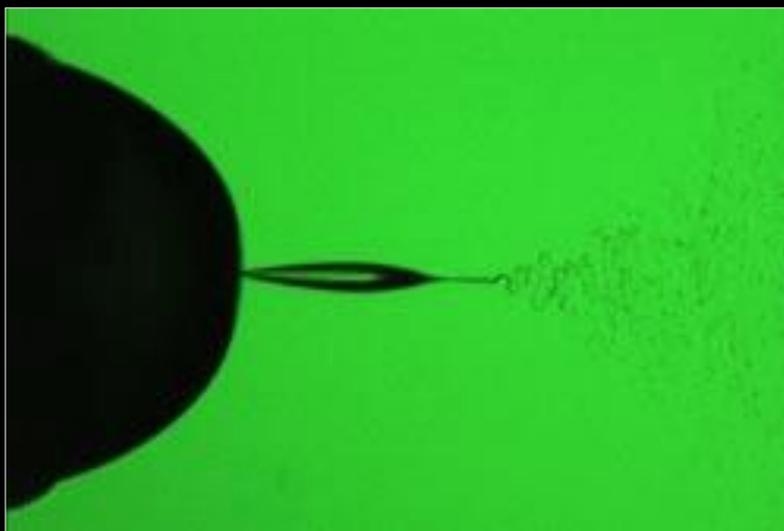
Ion Formation By ESI



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

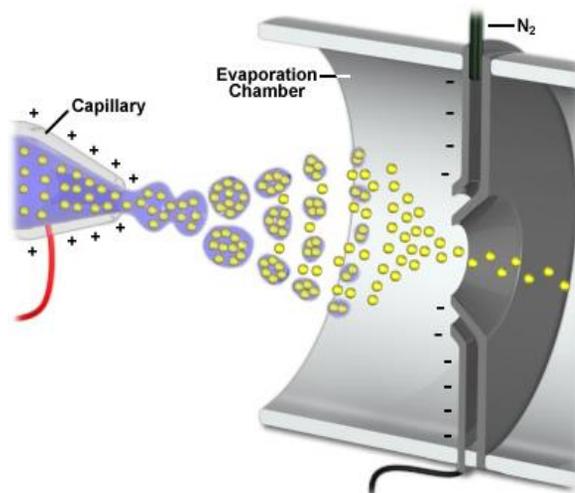


Electrospray - ESI



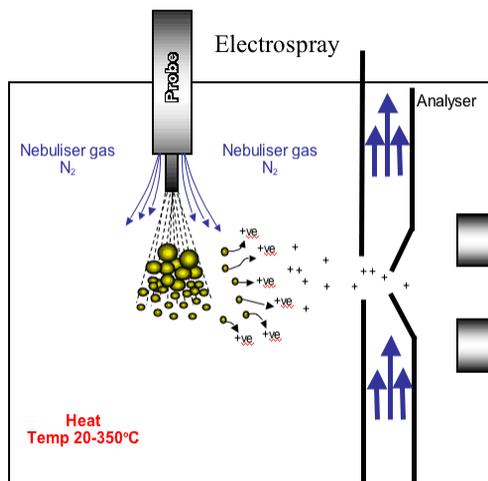
Electrospray – ESI

Vazões: 100 nL/min a 5 μ L/min



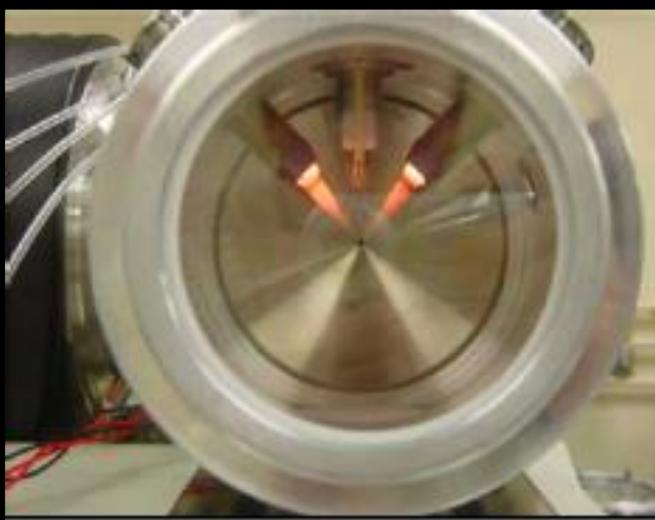
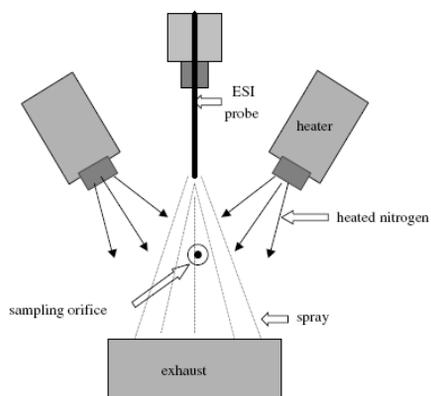
ESI com assistência pneumática (“IonSpray”)

Vazões: 5 μ L/min a 0,2-1,0 mL/min



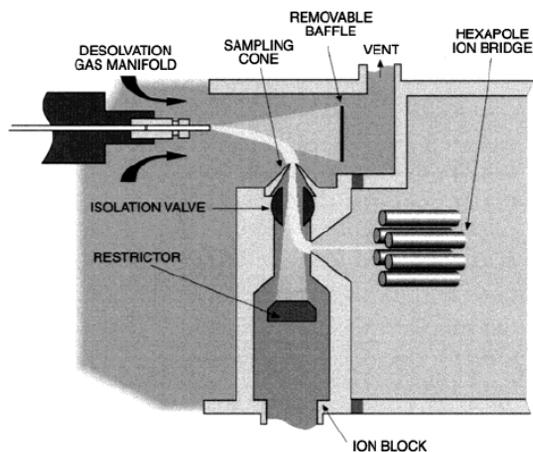
Electrospray – ESI

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



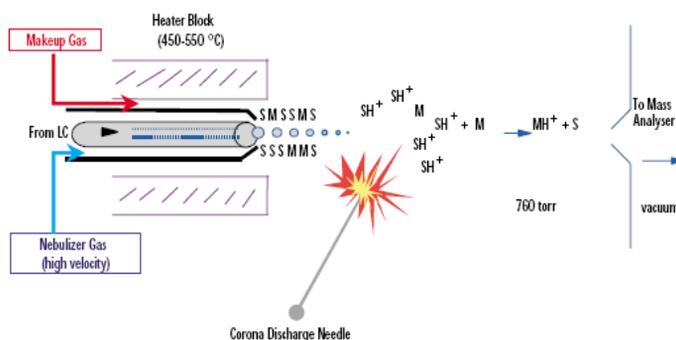
Electrospray – ESI

Fonte de ionização: “Z-Spray source”

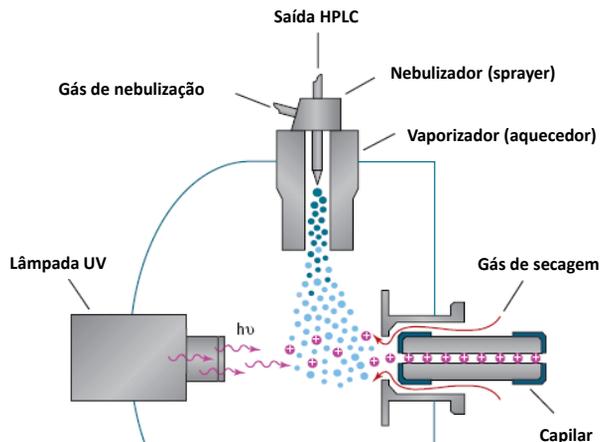


Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI)

Vazões: ~1,0 mL/min



Fotoionização a Pressão Atmosférica (APPI)

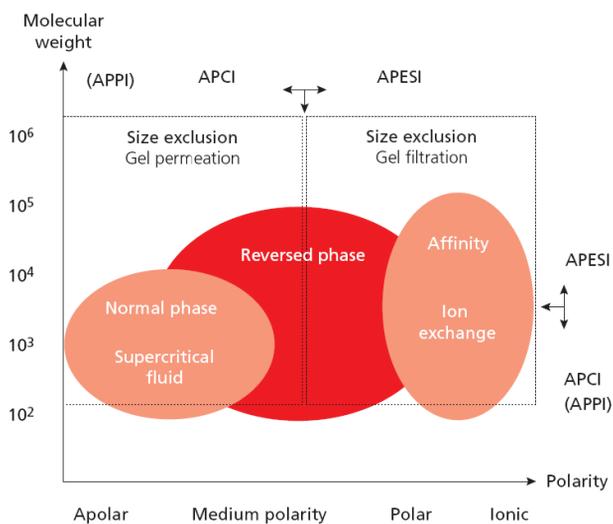


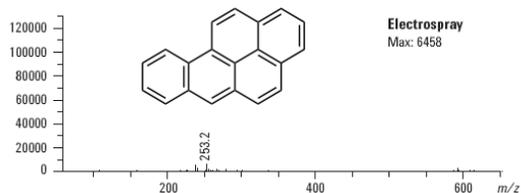
- Pode ser usado um dopante
Ex. Tolueno

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

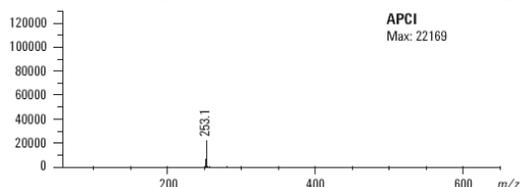


Escolha da técnica de ionização está intimamente relacionada ao modo de separação em LC.

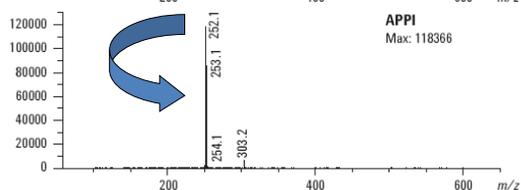




Baixa abundância do íon $[M+H]^+$ em m/z 253.



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



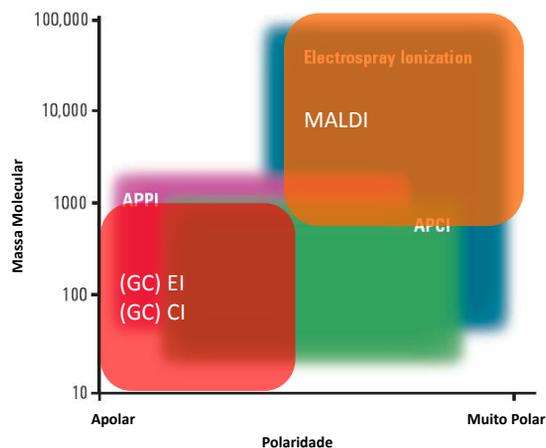
Abundância 5 x maior que APCI e
20 x maior que ESI.

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

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

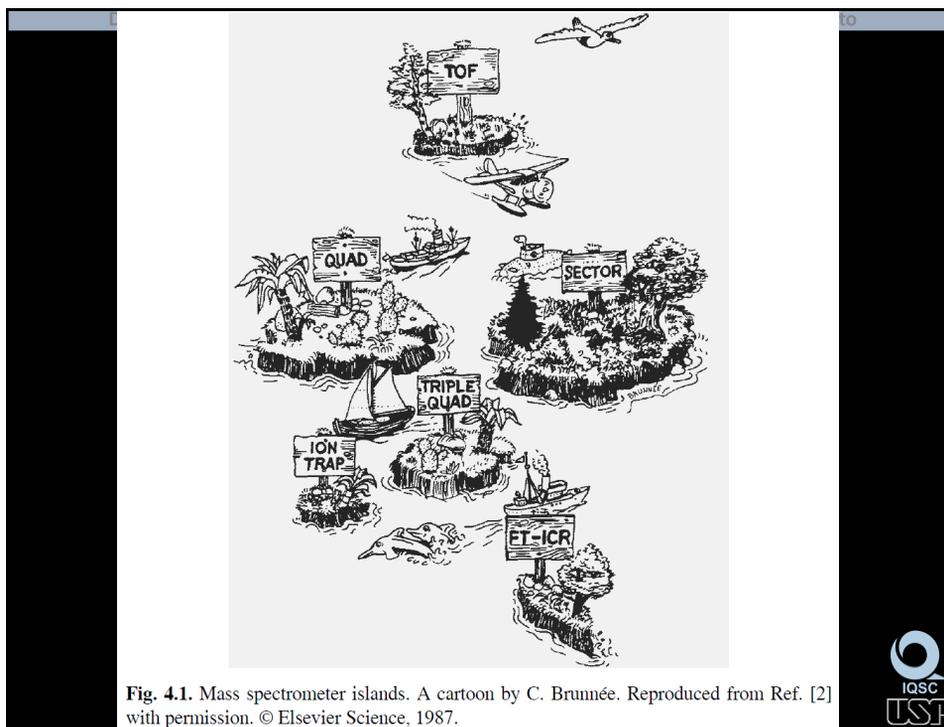


Modos de ionização para MS(/MS)



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



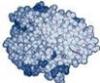
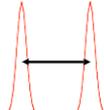
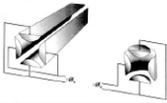
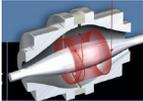
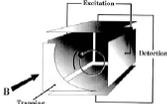


Disciplina SQM0418 – Aula de Espectrometria de Massas – Prof. Alvaro J. Santos Neto

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. 

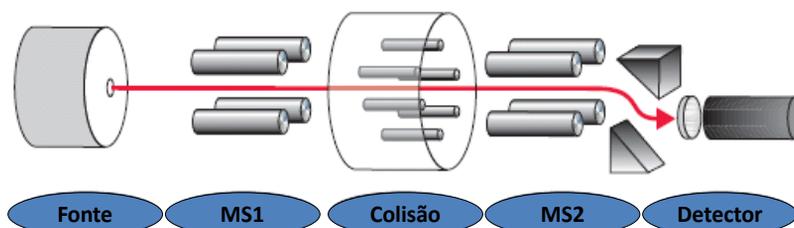
Disciplina SQM0418 – Aula de Espectrometria de Massas – Prof. Alvaro J. Santos Neto

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

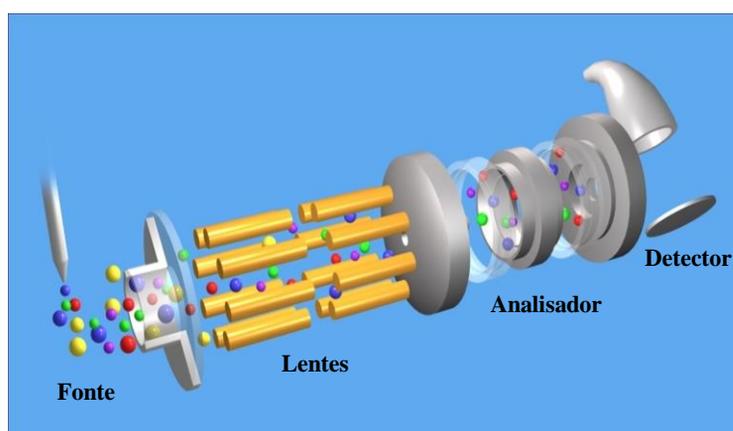
“TANDEM-IN-SPACE” – ex. QqQ



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



“TANDEM-IN-TIME” – ex. Ion Trap

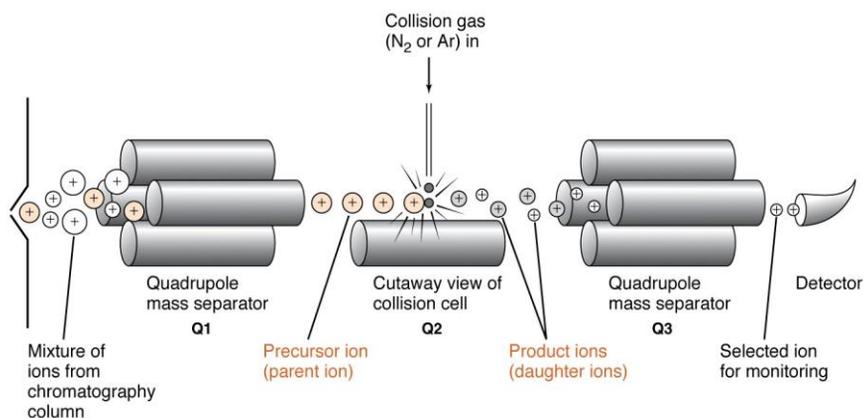


Esquema de um instrumento do tipo Ion Trap MS/MS

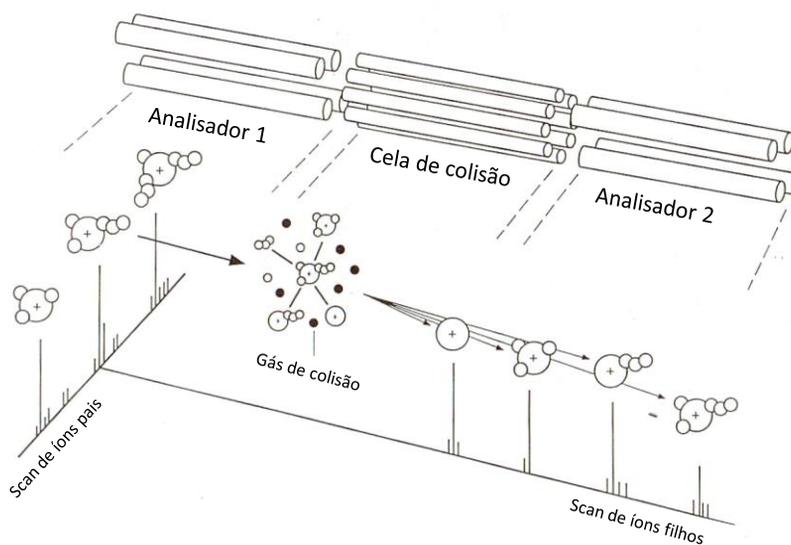


MS/MS (sequencial)

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

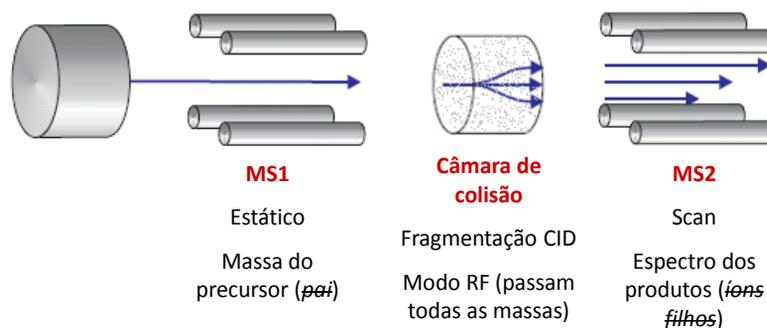


Princípio de operação



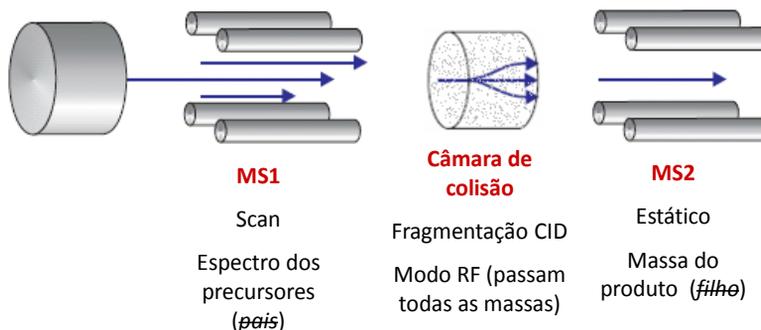
Modos de operação

- Espectro dos produtos ou "íons-filhos"



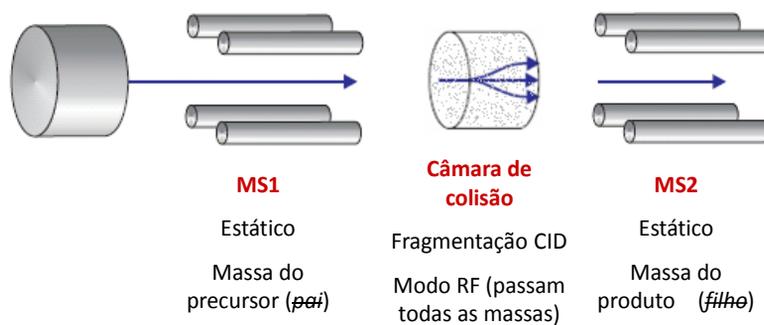
Modos de operação

- Espectro dos precursores ou "íons-pais"



Modos de operação

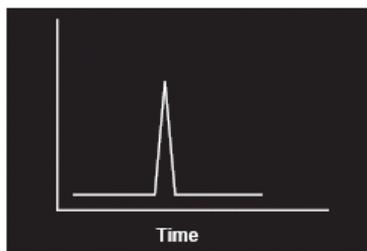
- Monitoramento de Reações Seleccionadas (SRM)



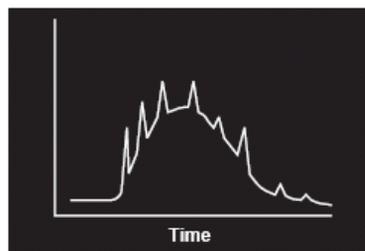
Ex: Monitoramento da transição: m/z 609 \rightarrow m/z 195 para a reserpina.



SIM vs. SRM



LC-MS/MS



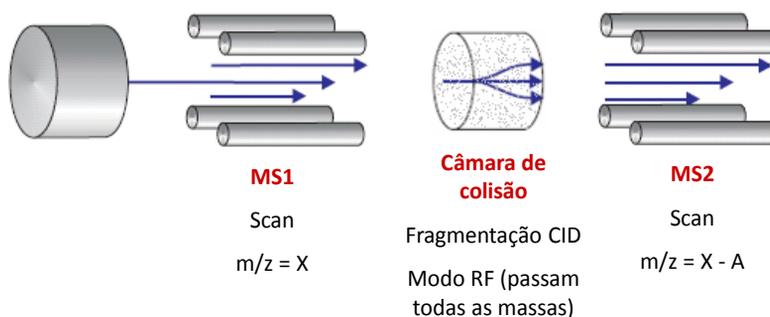
LC-MS

- Especificidade
- Relação S/N

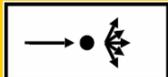
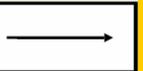


Modos de operação

-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

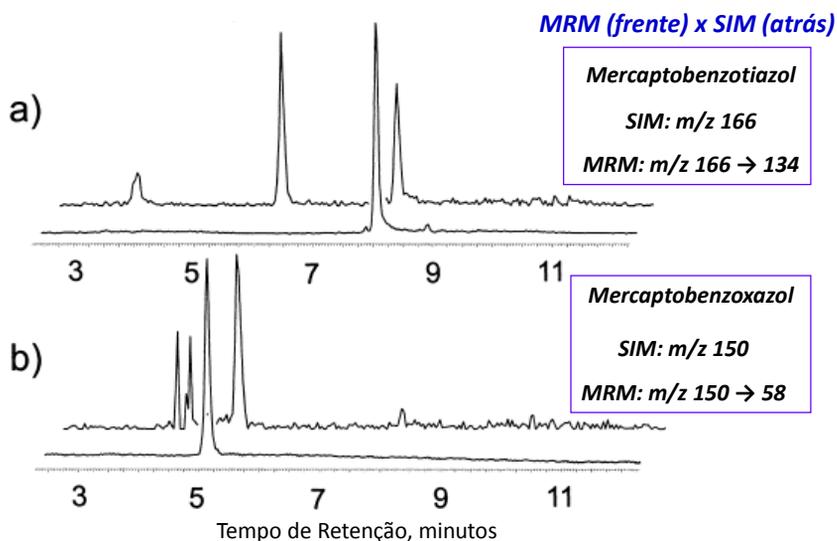


Vantagens do QqQ

- 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 (MS^2).*



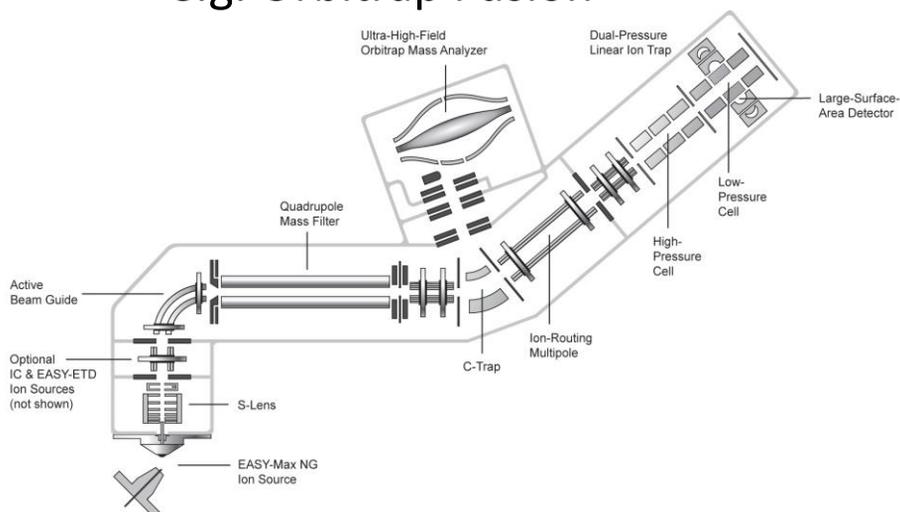
QqQ – Aplicação



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



Analísadores híbridos e.g. Orbitrap Fusion



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



Analísadores para MS

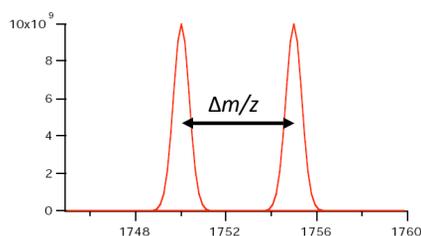
- Setor Magnético e Setor Eletrostático
- Quadrupolo
- *Ion Trap*
- Tempo de Voo
- FT-ICR
- (FT) Orbitrap



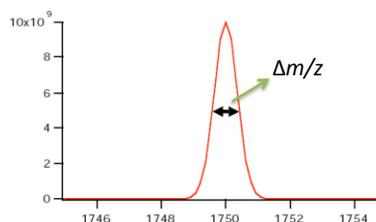
Definições de resolução em MS

- 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)



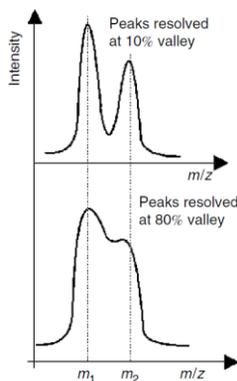


Figure 2.1
Diagram showing the concepts of peak resolution and valley.



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

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

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

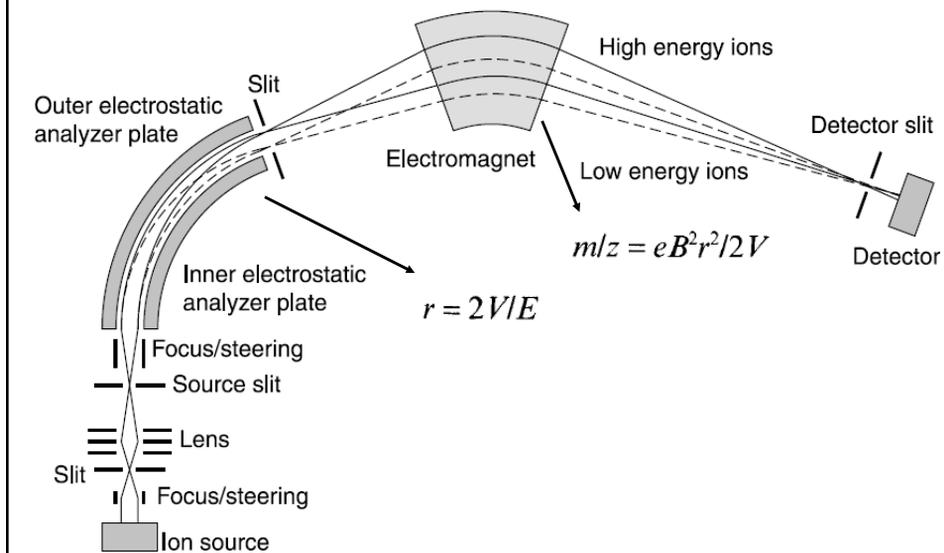


Analísadores para MS

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



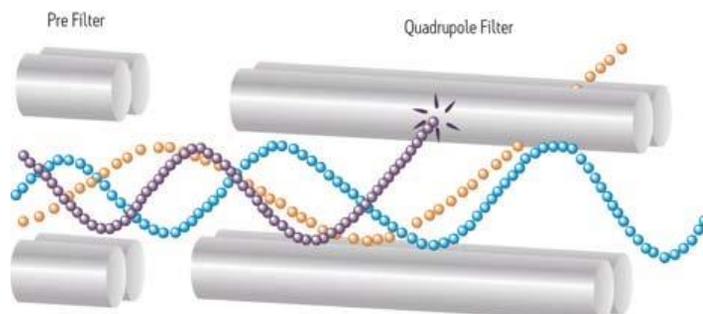
Setor Magnético e Setor Eletrostático (Focalização Dupla)



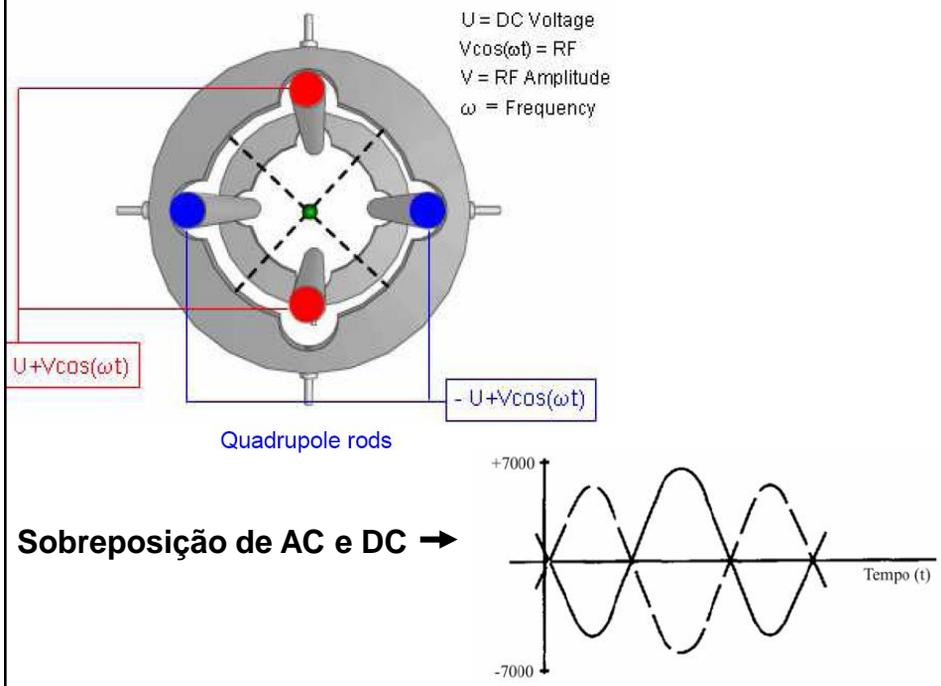
Focalização Dupla

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

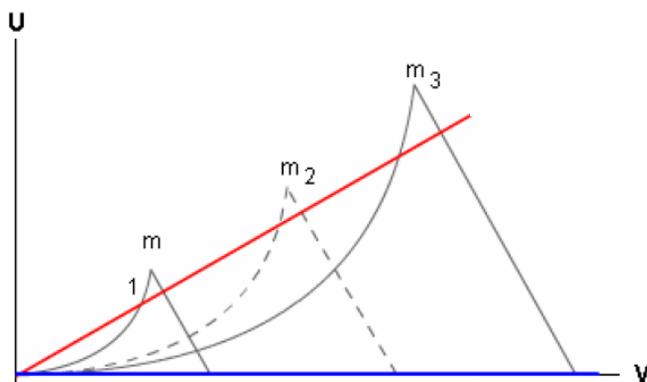
Quadrupolo



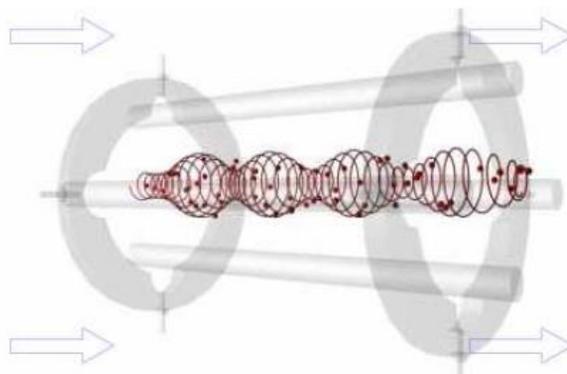
Fonte: http://www.waters.com/waters/pt_PT/What-Types-of-Instruments-Are-Used%3F/nav.htm?cid=10090937



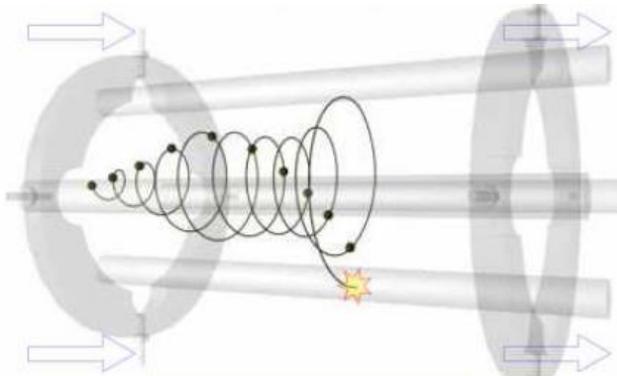
$$a = \frac{8zU}{mr_o^2 \omega^2} \quad q = \frac{4zV}{mr_o^2 \omega^2}$$



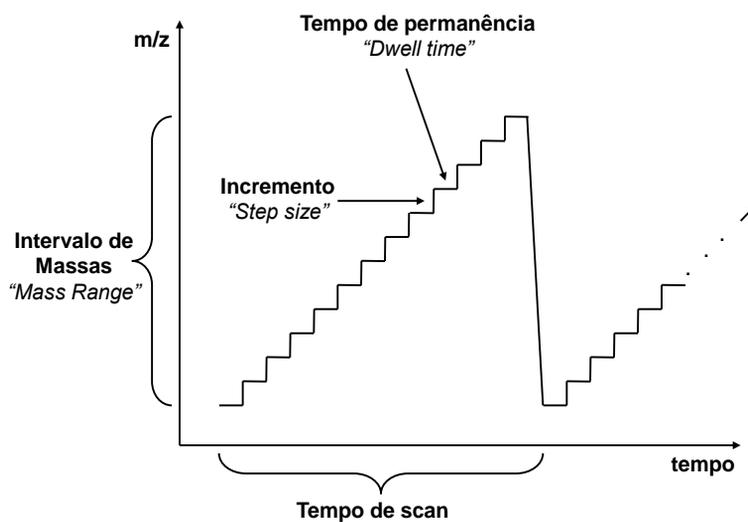
Trajétória de íon em movimento harmônico



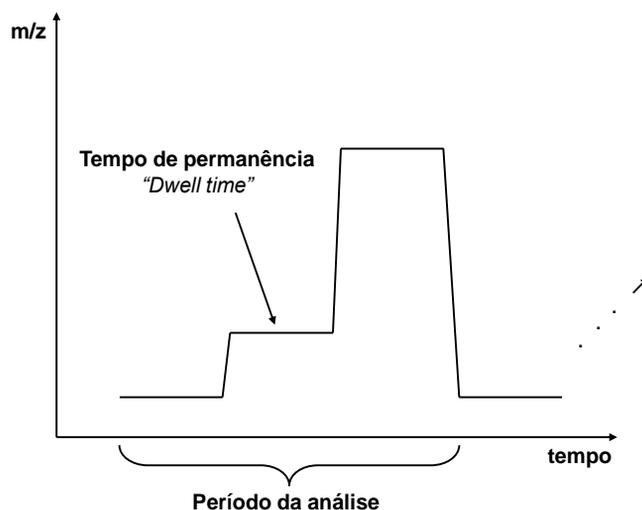
Trajatória de íon em movimento não harmônico



Modo Scan



Modo SIM



Características de um Quadrupolo

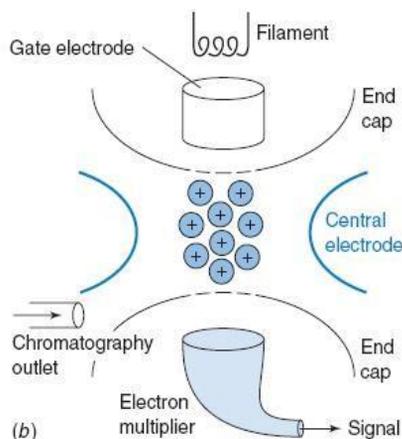
- $m/z < 4000$ Da/e
- Baixo RP: 1000-4000 (FWHM)
 - geralmente 0,7 a 1,0 Da
- Grau de Exatidão: 100 a 200 ppm
- Baixo custo
- Velocidade de varredura razoável
- Velocidade de varredura influencia na detectabilidade



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

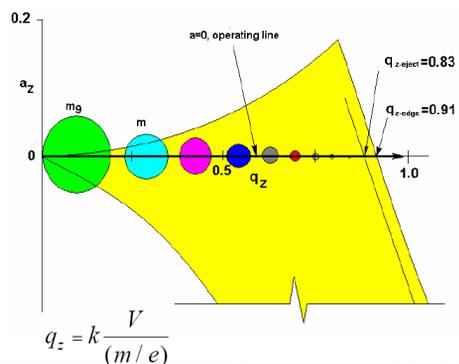
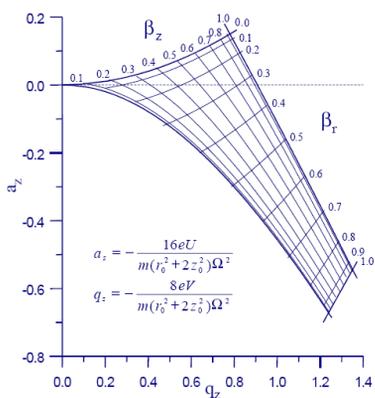
$$q_z = -2q_r = - \frac{8eV}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2}$$

RF on the Ring

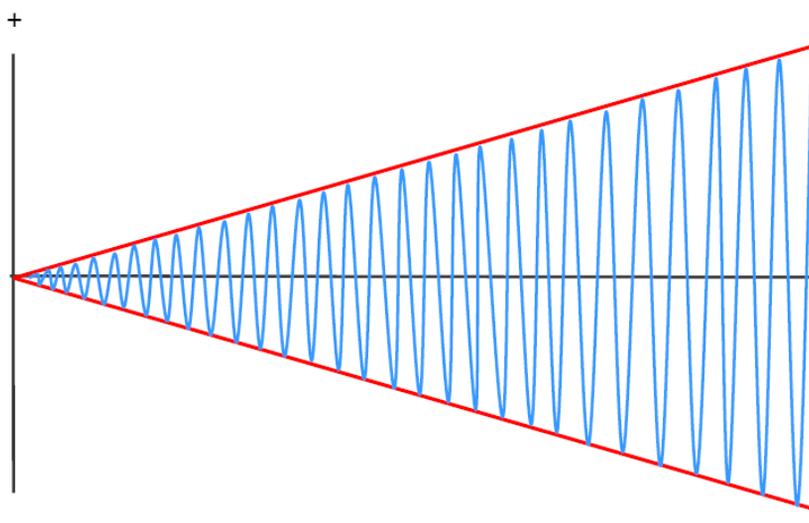
Mass Ring Parameters



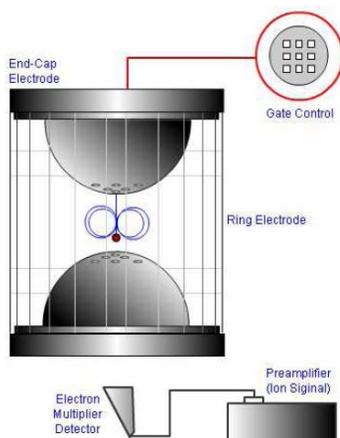
Ion trap



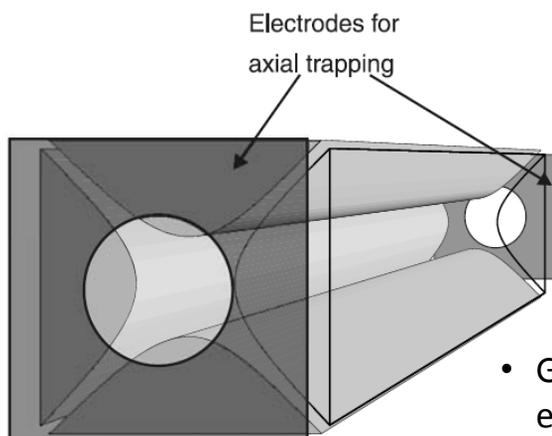
Varredura do potencial V



Varredura do potencial V



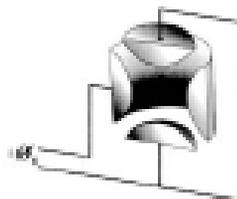
Ion trap linear - LIT



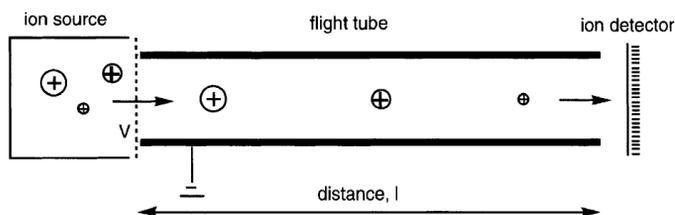
- Geralmente usado em equipamentos híbridos

Características de um IT

- $m/z < 6.000$ 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

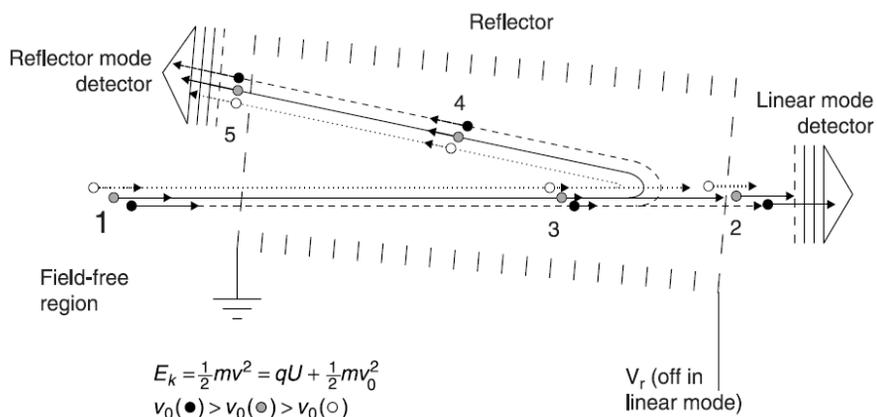


$$t = \frac{L}{v} = L \left(\frac{m}{2zeV} \right)^{1/2}$$

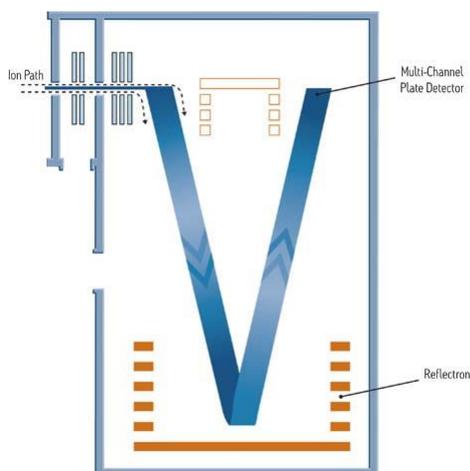
$$m/z = \frac{2eVt^2}{L^2}$$



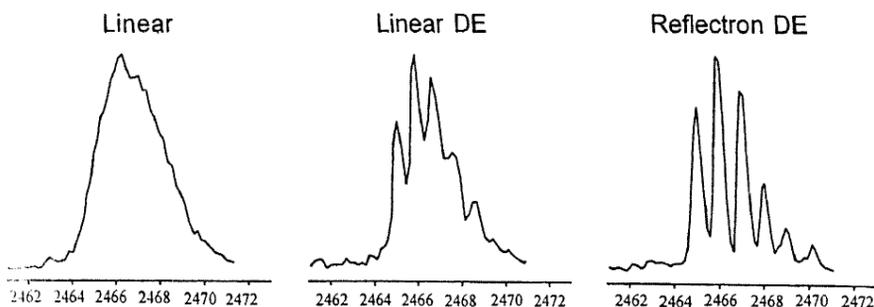
TOF de alta resolução – *Reflectron*



TOF de alta resolução – arranjo ortogonal + *reflectron*



TOF de baixa e alta resolução

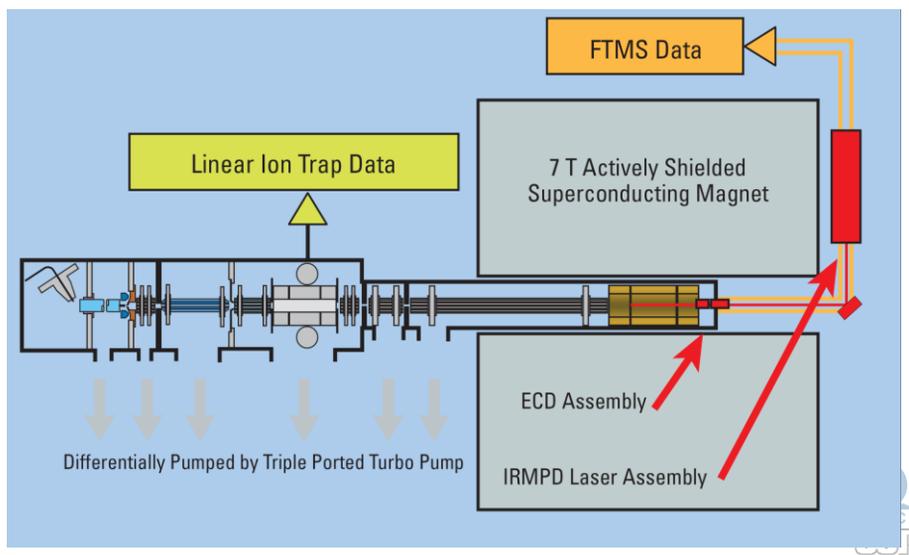


Características do TOF

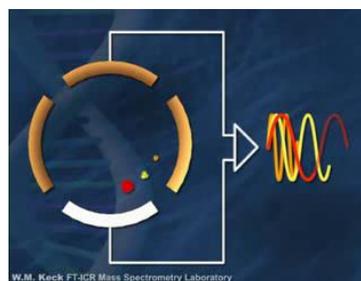
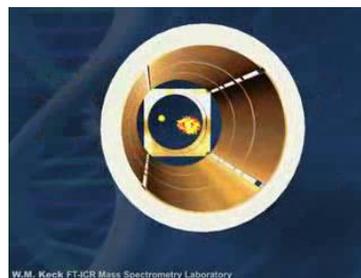
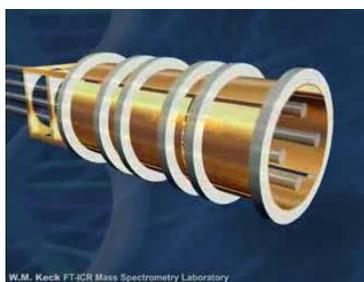
- Aquisição veloz do espectro com sensibilidade
- Virtualmente sem limite de massas (modo sem reflexão)
- Bom poder de resolução : 10.000 a 50.000 (FWHM)
 - para melhor RP: ortogonal, DE (*delayed extraction*) e refletor
 - geralmente < 20.000 (FWHM)
- Grau de Exatidão: 20 a 100 ppm
- Exige calibração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



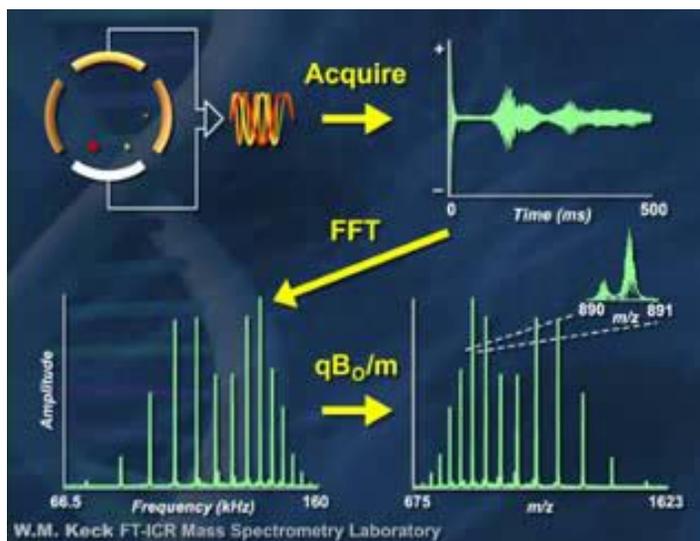
Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (FT-ICR)



FT-ICR



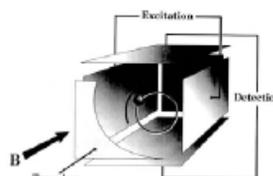
FT-ICR



Características de um FT-ICR

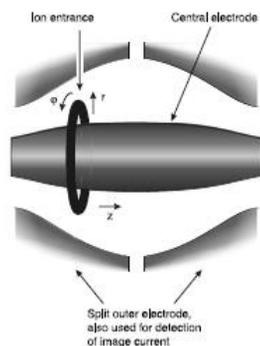
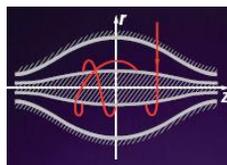
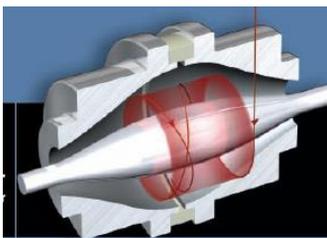
- m/z : < 4000 híbrido ou até 70.000 Da/e
- RP: 100.000 a 1.000.000 (FWHM)
- Exatidão: < 1 ppm (int) ou <1,2 ppm (ext)
- Custo alto
- Dificuldade de operação
- Manutenção

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



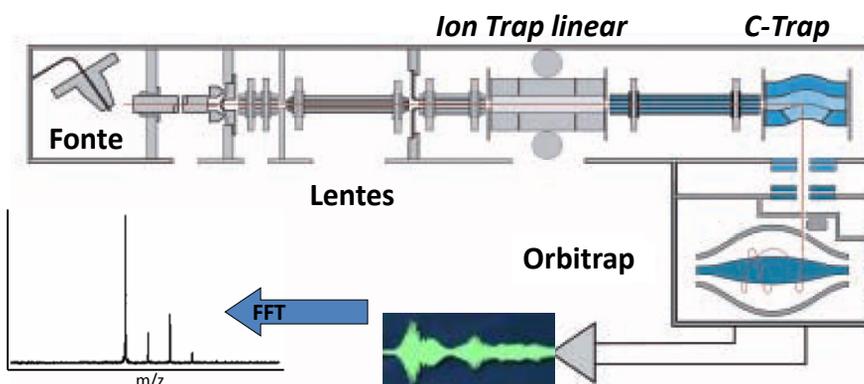
Orbitrap

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



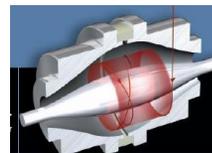
<http://planetorbitrap.com/g-exactive#.UoNbeBpwp28>

LTQ Orbitrap[®]



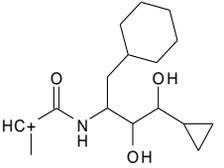
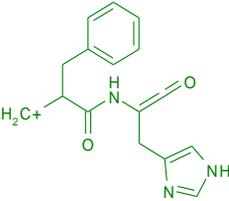
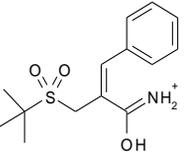
Características de um Orbitrap

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

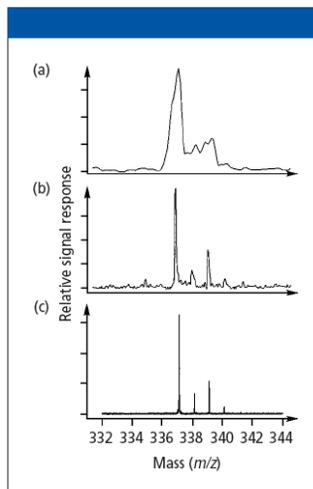


Qual a importância da Exatidão de Massa?

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

		
(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

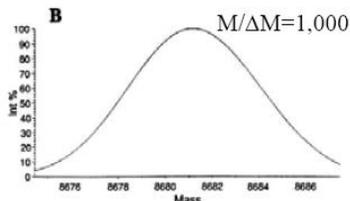
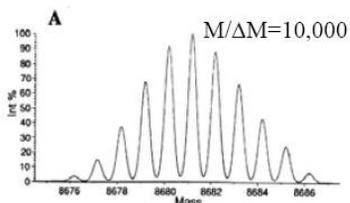
b) ToF

c) Transformada de Fourier

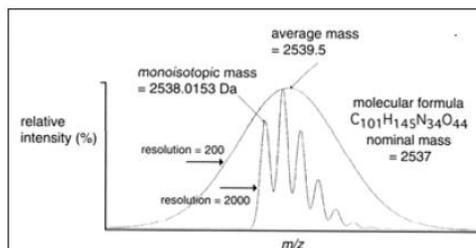
LC-GC., 2001, 19, 514-523.



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	Good	Best	Good	Good		Good	Full scan sensitivity	Good	Good	Best
Quantitation – many compounds	Good	Good	Good	Best	Good	SIM or MRM sensitivity	Best	Best	Good	Good	Good
High throughput quantitation	Good	Best	Good	Good	Good	Specificity (MS/MS)	Good	Good	Best	Good	Best
Metabolite identification	Good	Good	Best	Best	Best	Mass resolution	Good	Good	Good	Best	Best
Degradation products	Good	Good	Best	Best	Best	Mass accuracy	Good	Good	Good	Best	Best
Peptide sequencing/protein id	Good	Good	Best	Good	Best	Quantitative accuracy	Good	Best	Good	Good	Good
Polymer characterization	Good	Good	Good	Good	Best	Linear dynamic range	Good	Good	Good	Best	Good
Data dependent operation	Good	Good	Best	Good	Good	Mass range	Good	Good	Good	Best	Best
Characterize FAST LC peaks (1-3 s peak widths)	Good	Good	Good	Best	Good	Scan speed	Good	Good	Good	Best	Best
						Low cost	Best	Good	Best	Good	Good

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

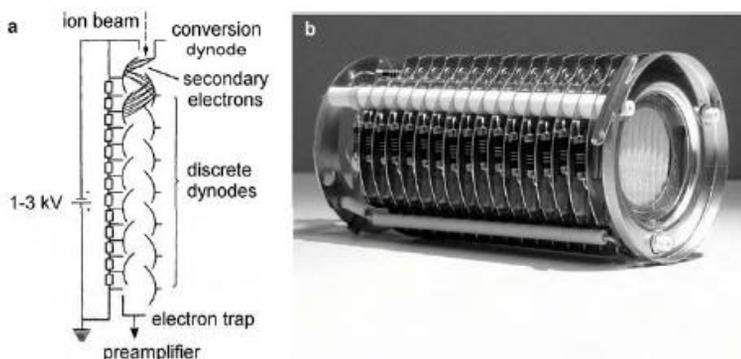


Fig. 4.57. Discrete dynode electron multipliers. (a) Schematic of a 14-stage SEM. (b) Photograph of an old-fashioned 16-stage Venetian blind-type SEM clearly showing the resistors and ceramics insulators between the stacking dynodes at its side. (a) Adapted from Ref. [238] by permission. © Springer-Verlag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

Detetores – Multiplicadora de elétrons contínua - *channeltron*

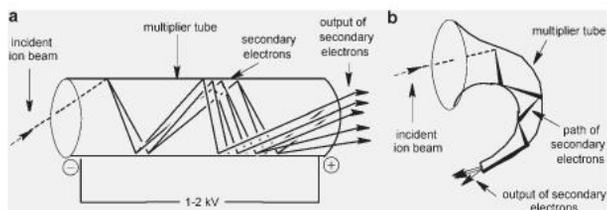


Fig. 4.58. Schematic of linear channel electron multiplier (a) and curved channel electron multiplier (b). By courtesy of Waters Corporation, MS Technologies, Manchester, UK..

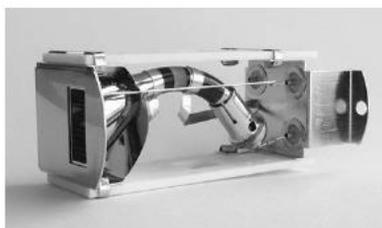


Fig. 4.59. Photograph of a channeltron multiplier.



Detetores – Placas com microcanais – *microchannel plates*

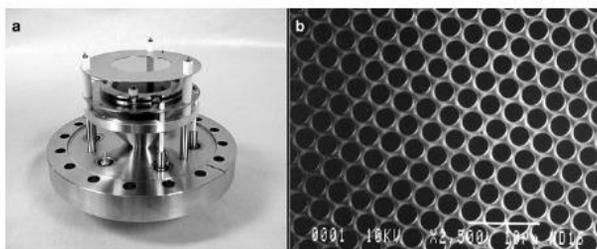


Fig. 4.60. MCP detector (shimmering surface) mounted on top of a flange (a) and SEM micrograph of a high resolving MCP showing channels of 2 μm diameter (b). By courtesy of (a) R.M. Jordan Company, Grass Valley, CA and of (b) Burle Industries, Baesweiler.

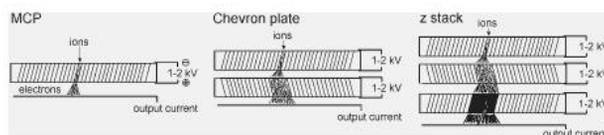


Fig. 4.61. Stacking of MCPs to increase gain. From left: single MCP, Chevron plate, and z-stack configuration. Note the loss of spatial resolution upon stacking.

