

# Breve introduzione alla spettrometria di massa *LC/MSn Ion Trap*

P. Scordino

ARPA Piemonte

17 gennaio 2018

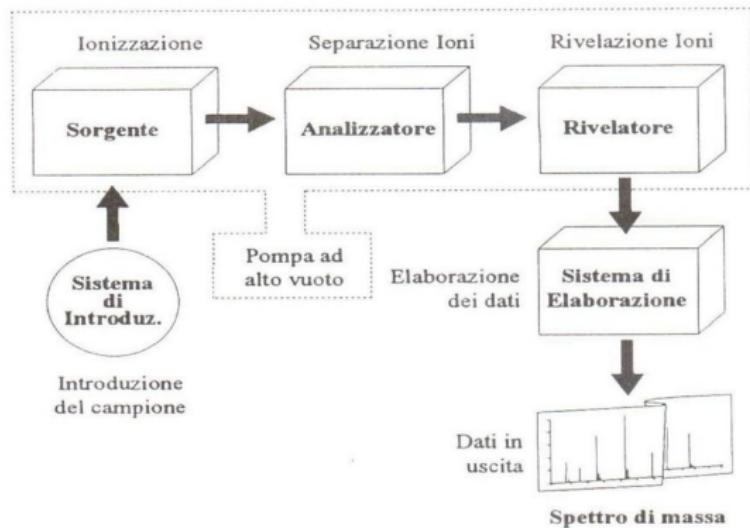


# Generalità sulla spettrometria di massa

- ▶ La spettrometria di massa è una tecnica analitica applicata sia all'**identificazione** di sostanze sconosciute, sia all'**analisi in tracce** di sostanze.
- ▶ Il principio su cui si basa è la possibilità di **separare** una miscela di **ioni** in funzione del loro **rapporto massa/carica** generalmente tramite campi magnetici statici o oscillanti.
- ▶ Il diagramma che riporta l'abbondanza di ogni ione in funzione del rapporto massa/carica è il cosiddetto spettro di massa.

# Generalità sulla spettrometria di massa

## Schema a blocchi di uno spettrometro di massa



# Generalità sulla spettrometria di massa

## Attuali tipologie di spettrometri di massa

- ▶ Spettrometro a *singolo quadrupolo Q*
- ▶ Spettrometro a *triplo quadrupolo QqQ*
- ▶ Spettrometro a *settore magnetico*
- ▶ Spettrometro a **trappola ionica QIT**
- ▶ Spettrometro a risonanza ionica ciclotronica **FT-ICR**
- ▶ Spettrometro *orbitrap*
- ▶ Spettrometro a *tempo di volo TOF*

# La trappola ionica

## Un pò di storia

The Royal Swedish Academy of Sciences has awarded this year's Nobel Prize in Physics for contributions of importance for the development of atomic precision spectroscopy

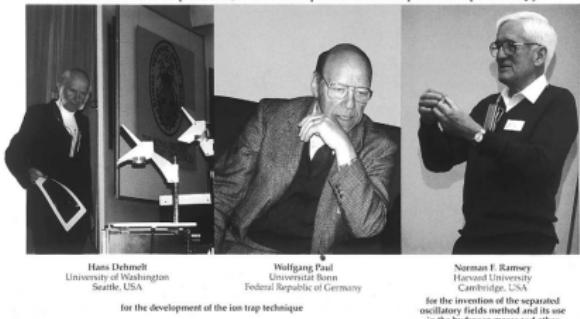


Figure 1. Poster displaying the 1989 Nobel Prize in Physics for the development of the quadrupole ion trap technique. Published by courtesy of the Royal Swedish Academy of Science.

(a)

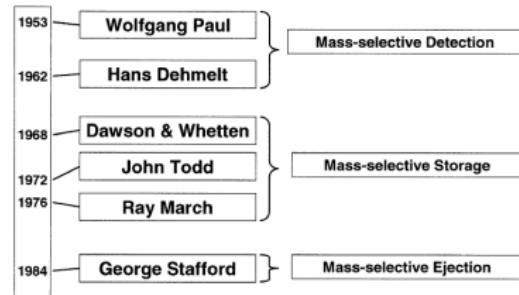
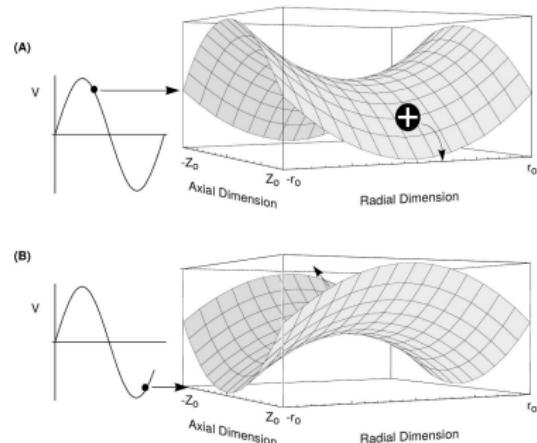
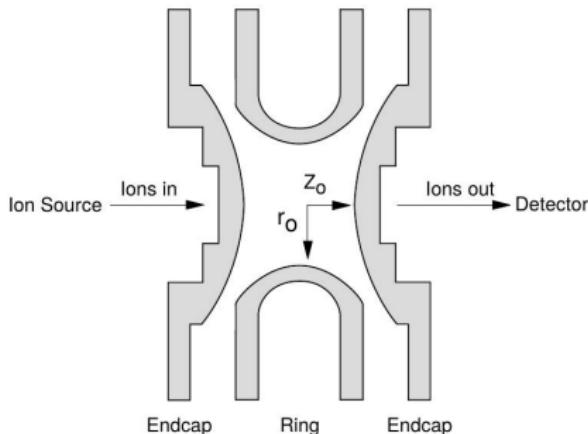


Figure 4. The three ages of Ion Trap Technology are shown as suggested by Raymond E. March and Richard J. Hughes.

(b)

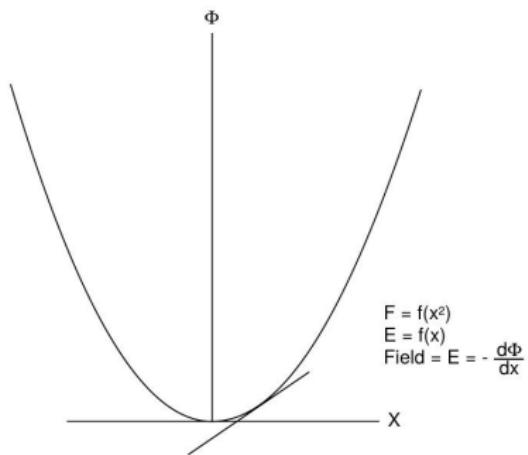
# La trappola ionica

## Schema teorico di una trappola ionica



# La trappola ionica

## Quadrupolo monodimensionale



Potenziale e forza di campo in un ipotetico campo quadrupolare unidimensionale.

La pendenza del diagramma del potenziale  $\Phi$  rispetto alla posizione  $x$  determina la forza del campo  $E(x)$ .

# La trappola ionica

Da un punto di vista fisico/matematico possiamo rappresentare la tecnica in trappola ionica con le seguenti equazioni:

- ▶ Il campo quadrupolare è il campo di forza  $E$  che varia al variare di  $x$ .

$$E = E_0x \quad (1)$$

- ▶ Il potenziale applicato  $\Phi$  varia quadraticamente in modo che il campo di forza  $E$  vari linearmente con  $x$ .

$$\Phi = f(x^2) \quad (2)$$

$$E = -\frac{d\Phi}{dx} = f(x) \quad (3)$$

# La trappola ionica

- Il potenziale  $\Phi_{r,z}$  in ogni punto è dato dalla seguente equazione:

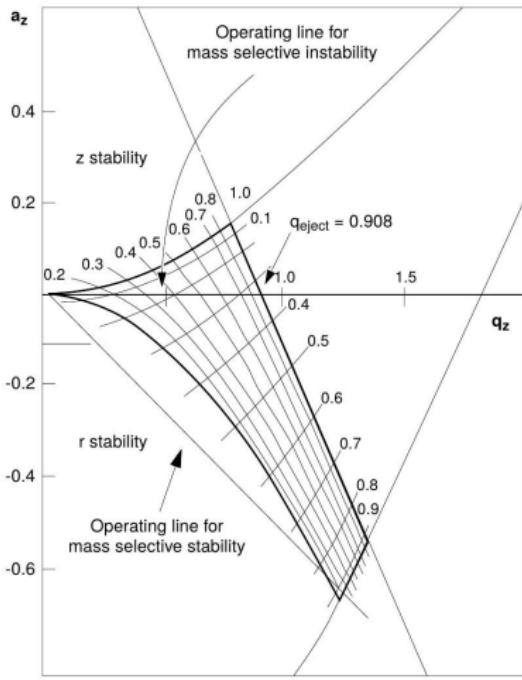
$$\Phi_{r,z} = (U + V \cos \omega t) \left( \frac{r^2 - 2z^2 + 2z_0^2}{r_0^2 + 2z_0^2} \right) \quad (4)$$

Il primo termine indica la dipendenza temporale e il secondo quella spaziale.

- $r_0$  è il raggio interno dell'elettrodo circolare (ring)
- $z_0$  è la più piccola distanza dal centro della trappola alla calotta (end-cap)
- $U$  è il potenziale applicato in corrente continua
- $V$  è il potenziale applicato in corrente alternata a radio frequenze
- $\omega$  è la frequenza angolare
- $t$  è il tempo

# La trappola ionica

## Diagramma di Mathieu



Gli ioni sono stabili sia nella direzione  $r$  che nella direzione  $z$  se i loro parametri  $a_z$  e  $q_z$  rientrano nell'area reticolata del diagramma.

La modalità comune di analisi è la scansione di instabilità mass-selective in cui il potenziale di rf viene aumentato per aumentare il valore di  $q_z$  al punto di instabilità, mentre  $a_z = 0$

# La trappola ionica

Le soluzioni dell'equazione differenziale di secondo ordine di Mathieu permettono di calcolare i parametri di stabilità di una trappola ionica che sono prontamente riassunti nel diagramma di Mathieu:

$$a_z = -2a_r = \frac{-16zU}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\omega^2} \quad (5)$$

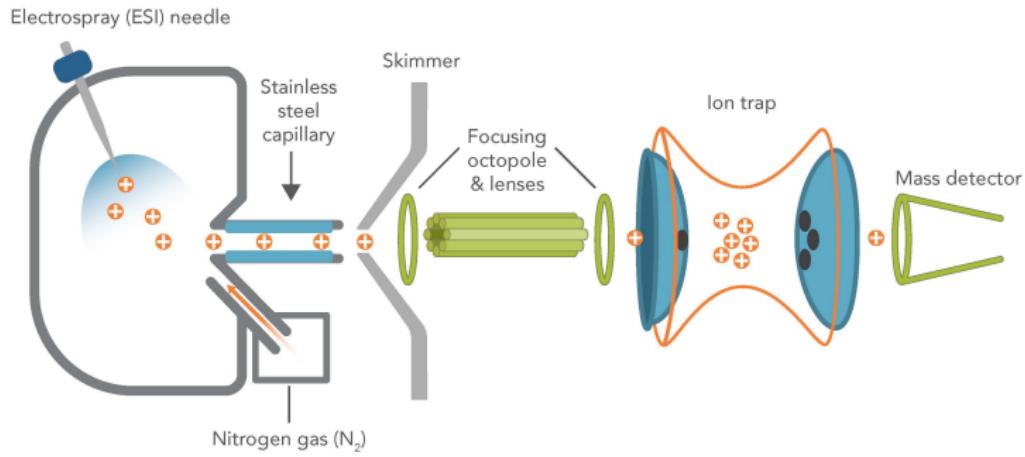
$$q_z = -2q_r = \frac{8zV}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\omega^2} \quad (6)$$

Riarrangiando l'equazione (6) otteniamo:

$$m/z = \frac{8V}{q_z(r_0^2 + 2z_0^2)\omega^2} \quad (7)$$

# Spettrometro LC/MS a trappola ionica

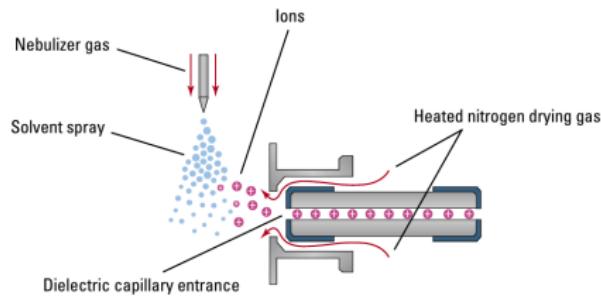
## Schema generale di funzionamento



# Spettrometro LC/MS a trappola ionica

- ▶ **ESI** - Grazie ad un **potenziale elettrico** di 2 - 6 kV dal cono di Taylor l'**elettrospray** evolve, con l'aiuto del Dry gas  $N_2$  caldo (325-350 °C), verso una **esplosione coulombiana** che lascia gli ioni nudi. ESI è sensibile alla concentrazione dell'analita pertanto lavora bene a bassi flussi (0.001 - 1 ml/min).

## Le principali sorgenti di ioni a pressione atmosferica API

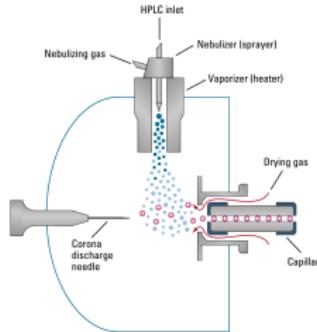


(c) ESI

# Spettrometro LC/MS a trappola ionica

- ▶ **APCI** - Il campione nebulizzato viene desolvatato termicamente (300 -500 °C), un **ago in tensione** ionizza il gas ausiliario ( $N_2$ ) per **effetto corona** che a sua volta trasferisce la carica all'analita. APCI è sensibile alla quantità di materia pertanto lavora bene a flussi alti (0.2 - 2 ml/min) generalmente sotto i 0.4 ml/min perde sensibilità.

## Le principali sorgenti di ioni a pressione atmosferica API

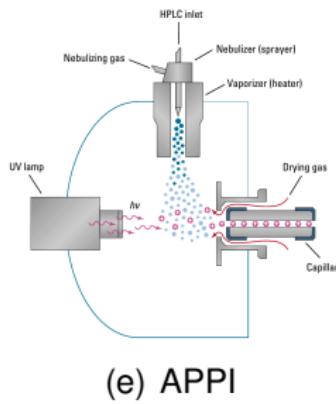


(d) APCI

# Spettrometro LC/MS a trappola ionica

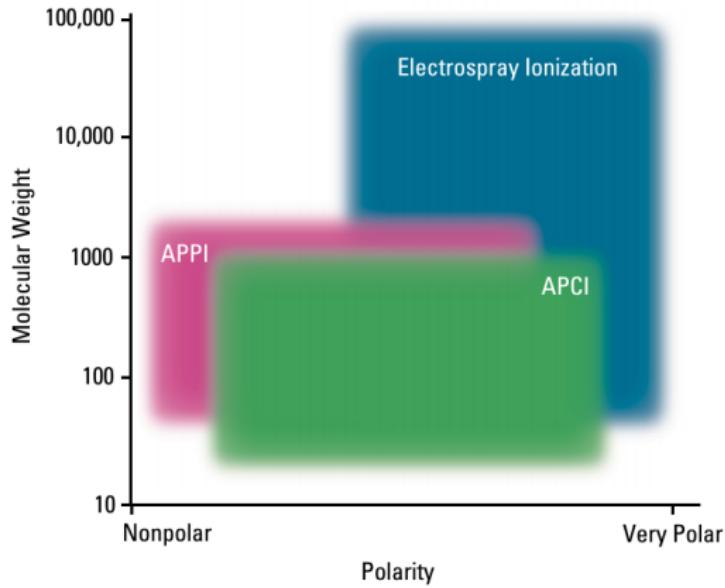
- ▶ **APPI** - Il campione nebulizzato viene desolvatato termicamente (300 -500 °C), una **lampada UV a 10.0 eV** fotoionizza l'**agente dopante (toluene, acetone)** che trasferisce la carica all'analita. APPI è molto simile nell'applicazione alla APCI.

## Le principali sorgenti di ioni a pressione atmosferica API



# Spettrometro LC/MS a trappola ionica

## Applicazioni in chimica analitica



# Spettrometro LC/MS a trappola ionica

## Spettrometro QIT Agilent



(f) Foto Spettrometro QIT

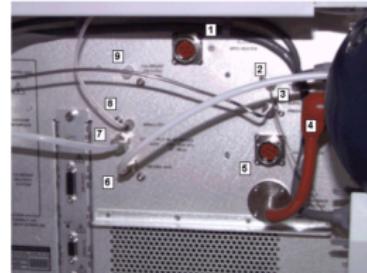


Figure 3 Connessioni behind service panel

- |                              |                             |
|------------------------------|-----------------------------|
| 1 APCI heater                | 6 Drying gas                |
| 2 Helium connection to Trap  | 7 Gas supply in: Nitrogen   |
| 3 Supply in: Helium          | 8 Nebulizer                 |
| 4 Spray chamber high voltage | 9 Calibrant delivery system |
| 5 APCI high voltage          |                             |

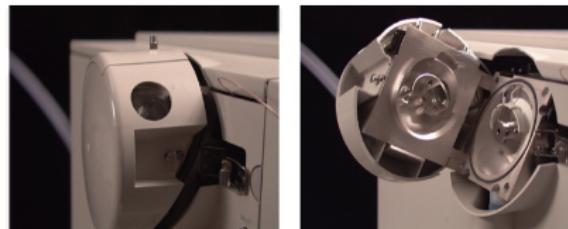
(g) Foto connessioni

# Spettrometro LC/MS a trappola ionica

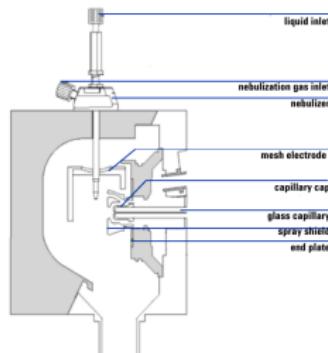
La pulizia della sorgente si effettua abbassando la **Dry Temp.** a **70°C** e mettendo lo strumento in **standby**. La pulizia va effettuata con **alcool isopropilico 99.5%** e usando **Gloves, clean, lint free (PN 9300-1751)** e **Cloths, clean, lint free (PN 05980-60051)**.

## ESI Spettrometro Agilent

API-Electrospray Ion Source



(h) Foto ESI Agilent



(i) Schema ESI Agilent

# Spettrometro LC/MS a trappola ionica

Per la **sostituzione delle sorgenti** lo spettrometro va messo prima in **standby (Dry Temp. 70°C)** e poi in **shutdown**.

## APCI Spettrometro Agilent

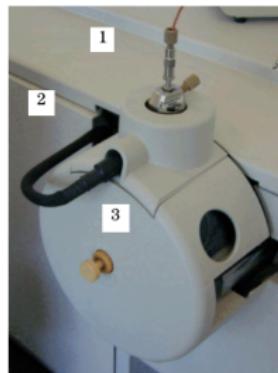


Figure 11 APCI source with APCI nebulizer (1), APCI heater cable (2), and corona needle (3)

(j) Foto APCI Agilent

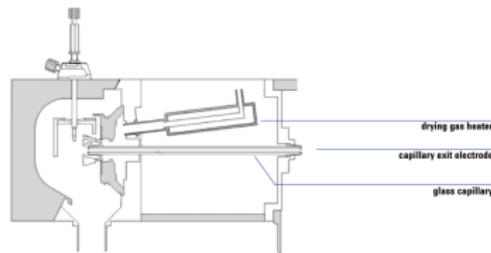


(k) Foto APCI interno

# Spettrometro LC/MS a trappola ionica

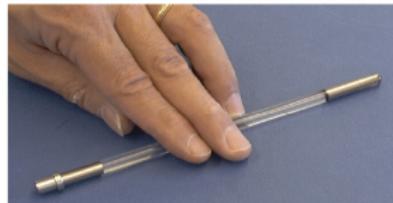
Il capillare ha due funzioni fondamentali, la prima come **campionatore di ioni** dal cono spray a pressione atmosferica a una regione di vuoto, la seconda come **barriera di separazione** fra due parti dello spettrometro a pressioni diverse.

## Capillare Spettrometro Agilent



(l) Schema capillare Agilent

Capillary



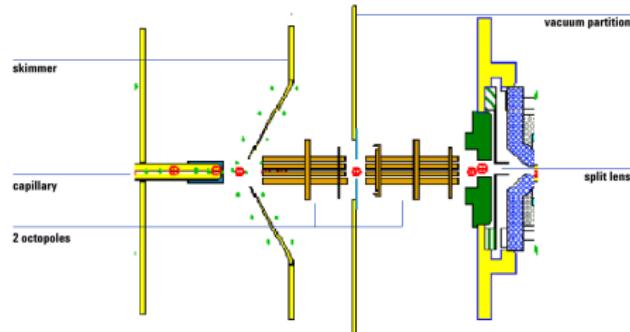
- More stable tuning
- More reproducible CID spectra
- Large capillary opening (0.5 mm-G1946A/B/C; 0.6 mm-G1946D) is less prone to contamination and plugging
- Capillary cap prolongs plating on capillary

(m) Foto capillare

# Spettrometro LC/MS a trappola ionica

Lo **skimmer**, **ottupolo** (ion guide/trap drive) e le **lenti ioniche** hanno la funzione di concentrare e focalizzare gli ioni. L'ottupolo in particolare è da considerarsi un **high-pass mass-filter** che riduce le interferenze delle molecole a basso peso molecolare (matrice/solvente).

## Skimmer, Ottupoli e lenti ioniche



(n) Schema interno

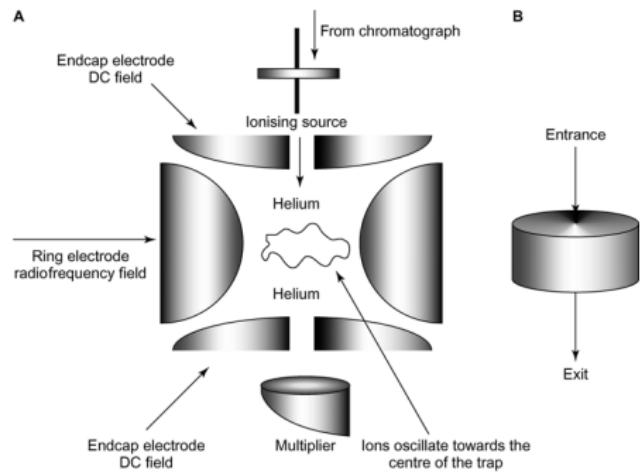


(o) Foto ottopolo

# Spettrometro LC/MS a trappola ionica

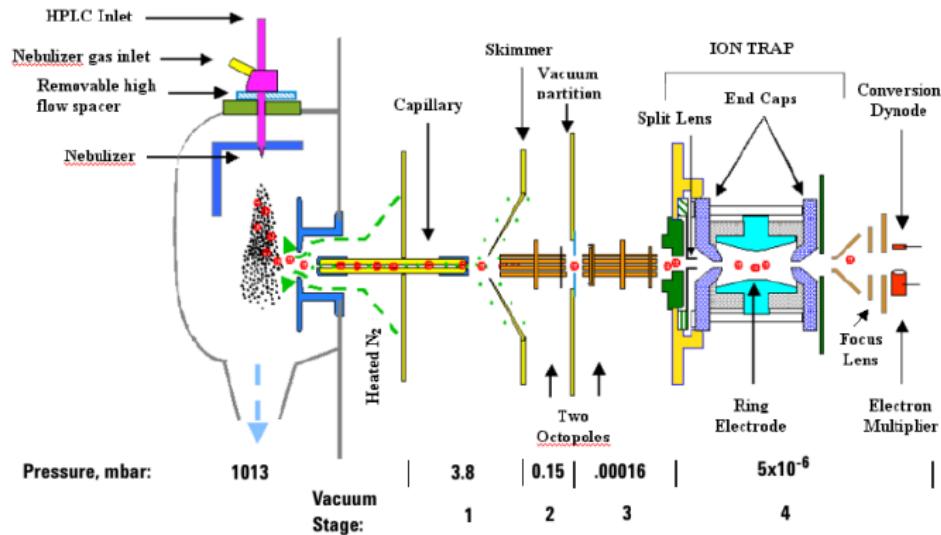
La fase di intrappolamento e accumulo degli ioni necessita di una nuvola di elio ( $6 \times 10^{-6}$  mbar) per diminuire l'energia cinetica del raggio ionico e favorire l'accumulo al centro della trappola.

## Schema generale trappola ionica



# Spettrometro LC/MS a trappola ionica

## Schema generale sistema di vuoto



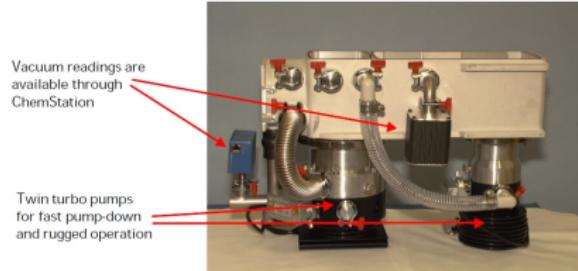
# Spettrometro LC/MS a trappola ionica

Per garantire il **vuoto** nei vari stadi dello spettrometro QIT Agilent sono presenti tre pompe da vuoto una **pompa rotativa** a olio e due **pompe turbomolecolari**.

## Foto sistema di vuoto



Vacuum System



(p) Foto pompe turbomolecolari

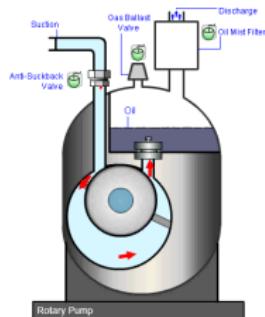


(q) Foto pompa rotativa ad olio

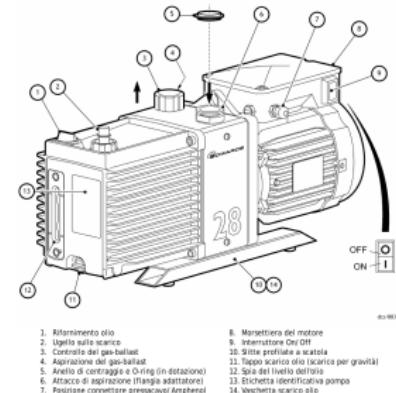
# Spettrometro LC/MS a trappola ionica

La pompa rotativa ad olio necessita, oltre il controllo settimanale del livello e colore dell'olio, l'apertura della valvola di ballast almeno una volta alla settimana per 20 minuti.

## Pompa rotativa ad olio



(r) Schema generale



(s) Schema pompa Edwards

# Modalità di utilizzo di uno spettrometro

Le principali modalità di utilizzo di uno spettrometro di massa sono le seguenti:

- ▶ **Full scan MS - QIT, Q, QqQ**

- Scansione degli ioni formati in sorgente.

- ▶ **Product ion scan (MS/MS o MSn) - QIT, QqQ**

- Accumulo e isolamento di ioni prescelti con successiva frammentazione e scansione degli ioni figli.

- ▶ **Selected Reaction Monitoring (SRM/MRM) - QqQ**

- Accumulo e isolamento ioni prescelti in Q1, frammentazione in q e accumulo e isolamento frammenti ionici prescelti in Q3.

- ▶ **Neutral Loss Scan (NL) - QqQ**

- Scansione in Q1, frammentazione in q e scansione degli ioni con massa ( $m - \text{frammento neutro}$ ) in Q3.

- ▶ **Precursor Ion Scan (PIS) - QqQ**

- Scansione in Q1 frammentazione in q e accumulo e isolamento frammenti ionici prescelti in Q3.

# Ottimizzazione dei parametri di uno spettrometro QIT

La fase di ottimizzazione dei parametri di uno spettrometro di massa inizia introducendo l'analita in esame all'interno dello spettrometro attraverso l'interfaccia prescelta. Esistono due modi di operare, o con solo la pompa ad infusione, oppure introducendo il flusso dall'HPLC in un raccordo a T con la pompa ad infusione.

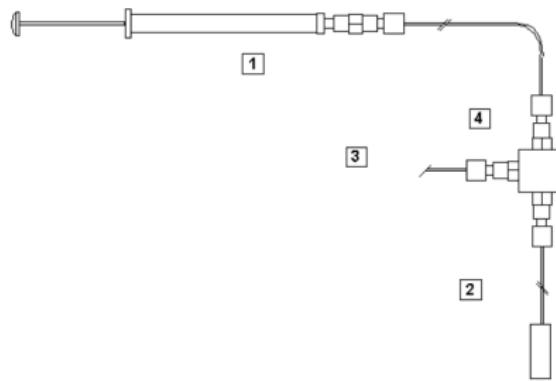
- ▶ **Pompa ad infusione** impostata a 0.3 ml/h (va preventivamente programmata - diametro interno siringa usata).
- ▶ La soluzione da usare deve avere una **concentrazione di 1 ppm in analita** e come solvente la miscela di solventi usati per la sua eluizione in HPLC.
- ▶ Valori alla sorgente usando la sola pompa ad infusione: Nebulizer 5 psi - 15 psi, Dry Gas 5 l/min, Dry Temp 325 °C.  
Nel caso del **raccordo a T** i valori variano alla sorgente: HPLC flow 100 - 500  $\mu$ l/min, Nebulizer 20 psi - 40 psi, Dry Gas 8 - 10 l/min, Dry Temp 325 - 350 °C

# Ottimizzazione dei parametri di uno spettrometro QIT

## Pompa ad infusione



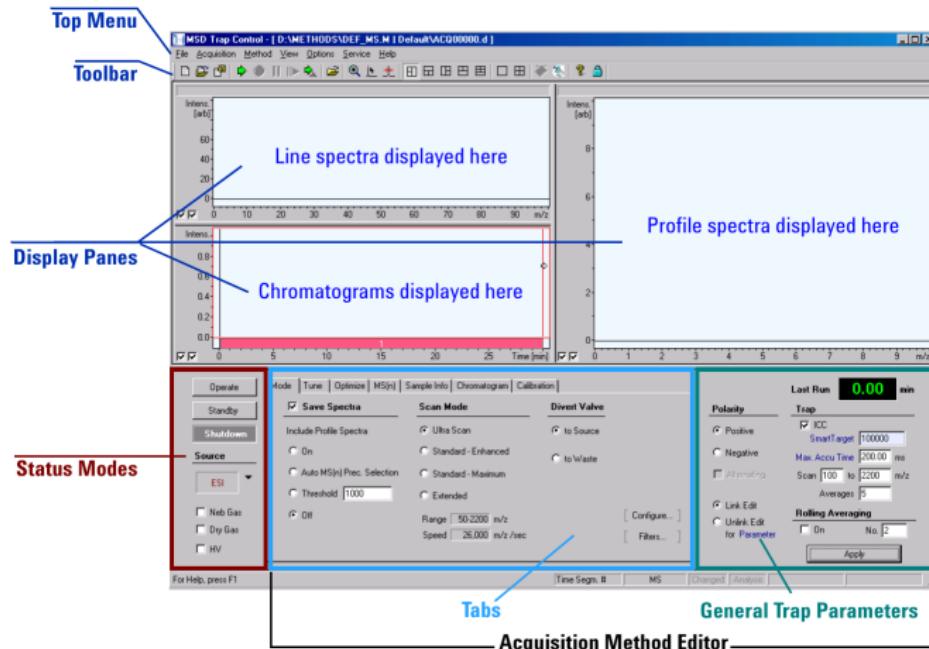
(t) Foto pompa infusione



(u) Schema di collegamento con T

# Ottimizzazione dei parametri di uno spettrometro QIT

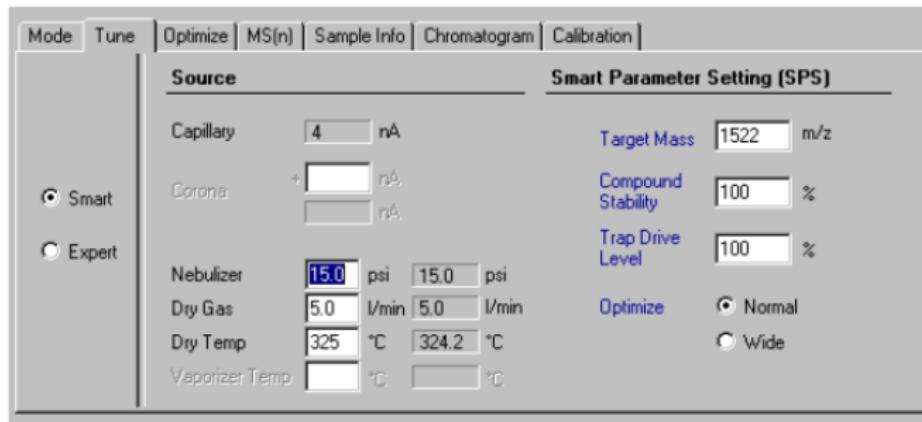
## Finestra di controllo spettrometro QIT Agilent



# Ottimizzazione dei parametri di uno spettrometro QIT

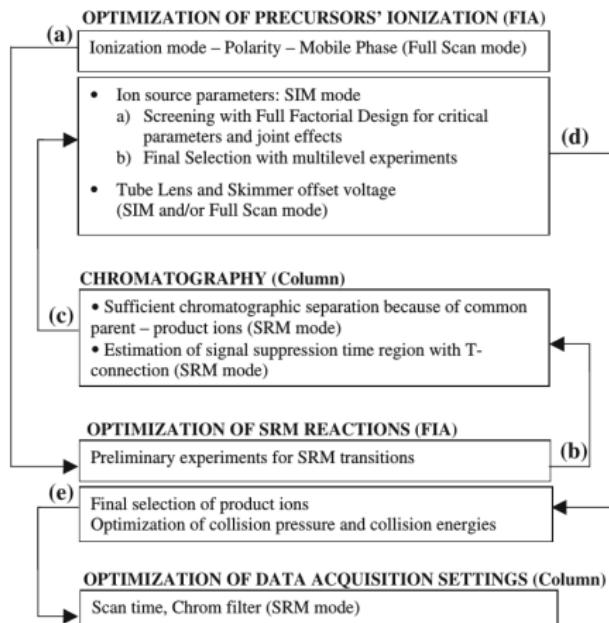
Attraverso questa finestra è possibile **ottimizzare i parametri** della sorgente e dello spettrometro con l'aiuto della funzione **Smart**. Per un utente esperto che ha la necessità di intervenire su ogni parametro può usare la funzione **Expert** e la finestra **Optimize**.

## Finestra di controllo spettrometro QIT Agilent



# Ottimizzazione dei parametri di uno spettrometro QIT

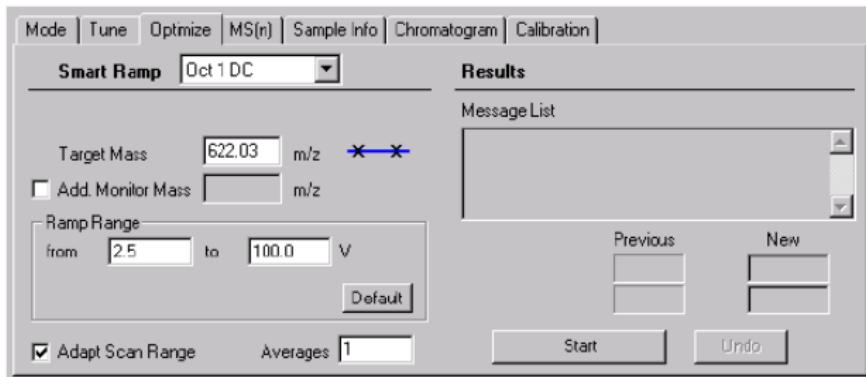
## Diagramma di ottimizzazione



# Ottimizzazione dei parametri di uno spettrometro QIT

Attraverso questa finestra è possibile accedere a delle **funzioni automatiche di ottimizzazione** che permettono al massista di trovare i valori ottimali(Ottupoli, Skimmer, lenti ioniche ecc...) per le m/z prescelte **massimizzando il segnale**.

## Finestra di controllo spettrometro QIT Agilent



# Determinazione quali/quantitativa di un analita

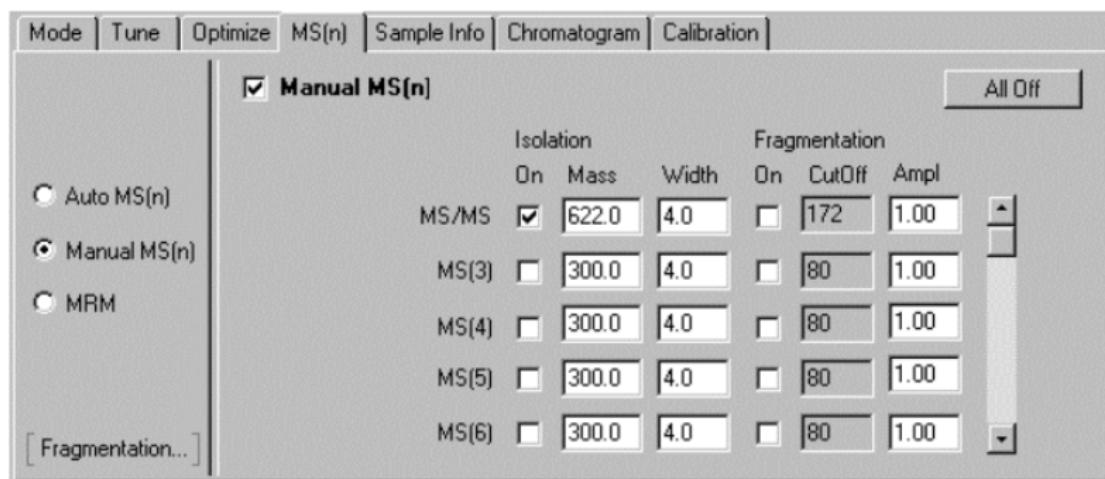
Dopo aver messo appunto i parametri dello spettrometro e della sorgente ionica per m/z prescelte si può procedere ad effettuare l'analisi quali/quantitativa.

- ▶ Per l'analisi qualitativa dopo aver stabilito quale sia lo **ione quasimolecolare** si può procedere alla frammentazione e allo studio delle m/z figlie, con la QIT è possibile effettuare ulteriori frammentazioni delle m/z figlie per avere conferme sui pattern di frammentazione ipotizzati. Per essere certi sull'identità della molecola in esame bisognerebbe sintetizzare la molecola ipotizzata o comprarne lo standard per verificare se alle stesse condizioni i pattern di frammentazione sono gli stessi della nostra molecola in esame.
- ▶ Per l'analisi quantitativa a seconda del tipo di analità si può lavorare o in **full scan MS** o in **Product ion scan(MSn)**.

# Determinazione quali/quantitativa di un analita

## Finestra di controllo spettrometro QIT Agilent

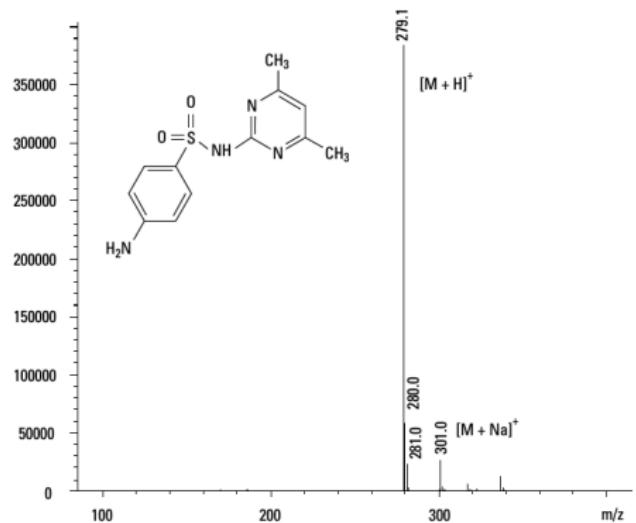
Utilizzando le funzioni presenti nella finestra **MS(n)** è possibile scegliere la modalità di utilizzo che meglio si adatta all'analita in esame.



# Determinazione qual/quantitativa di un analita

## Spettro MS acquisito in Full Scan MS

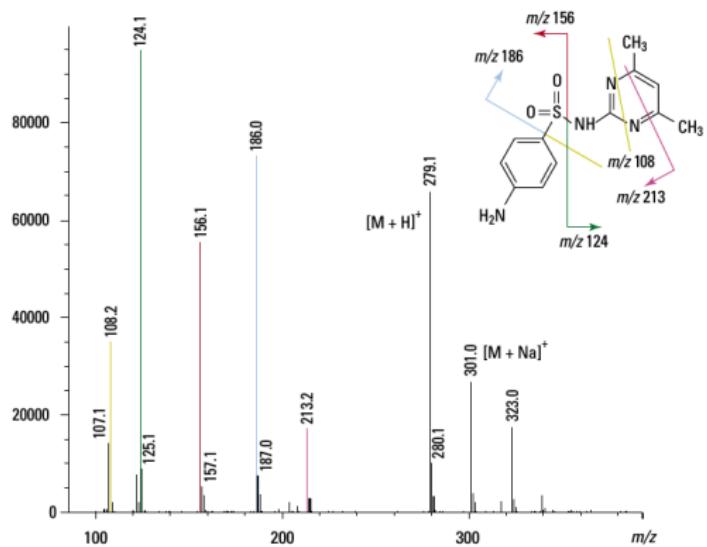
Sulfamethazine, MW: 278.33 g/mol



# Determinazione qual/quantitativa di un analita

## Spettro MS acquisito in Product ion scan (MSn)

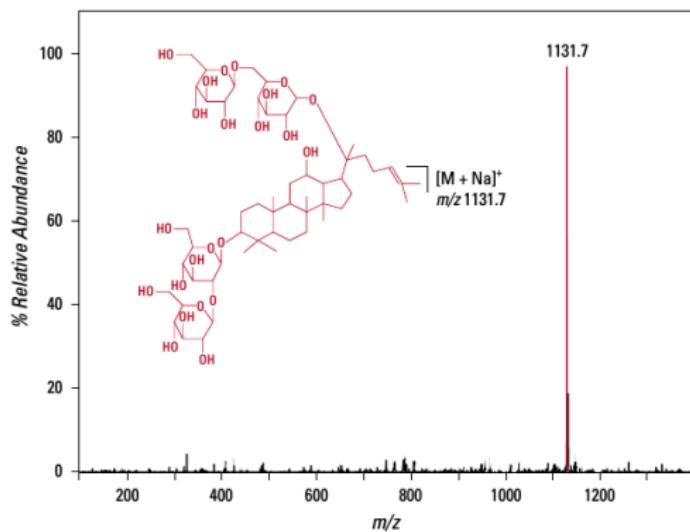
Sulfamethazine, MW: 278.33 g/mole, transizione  $MS^2 279 \rightarrow 186$



# Determinazione qual/quantitativa di un analita

## Spettro MS acquisito in Full Scan MS

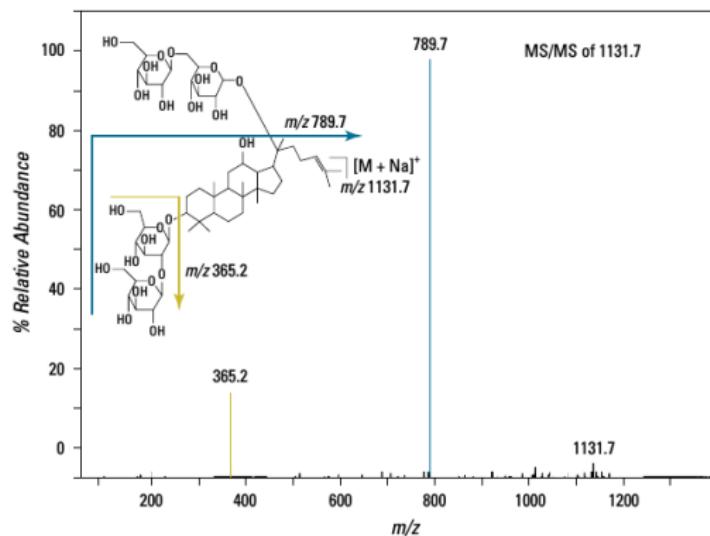
Ginsenoside Rb1, MW: 1109.307 g/mol



# Determinazione qual/quantitativa di un analita

## Spettro MS acquisito in Product ion scan (MSn)

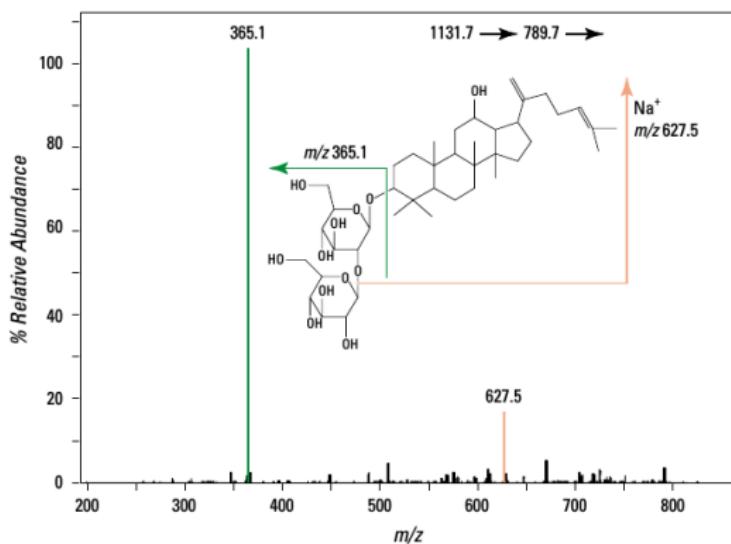
Ginsenoside Rb1, MW: 1109.307 g/mol, transizione  $MS^2$  1131.7 →



# Determinazione quali/quantitativa di un analita

## Spettro MS acquisito in Product ion scan (MSn)

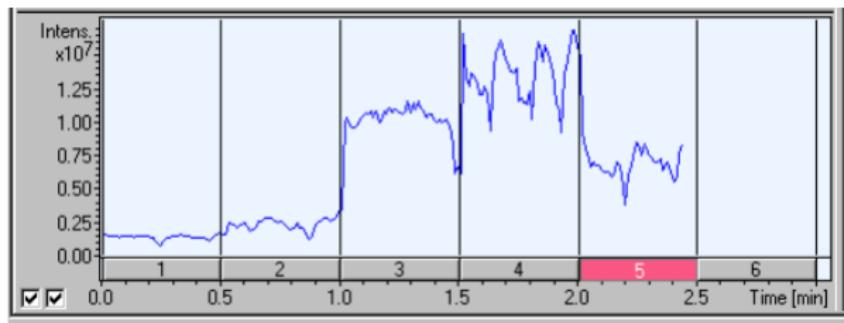
Ginsenoside Rb1, MW: 1109.307 g/mol, transizione  $MS^3$  789.7 →



# Determinazione qual/quantitativa di un analita

Uno Spettrometro QIT può, con tutti i limiti del caso, effettuare **analisi multiresiduo** su un campione a patto che gli analiti siano ben separati e che per ogni settore non ci siano molti analiti che coeluiscono (max 3 o 4) pena perdita di sensibilità. Questo è possibile in quanto il cromatogramma TIC può essere diviso in **settori parametricamente indipendenti**.

## Analisi multiresiduo



# Determinazione quali/quantitativa di un analita

## Analisi multiresiduo SPME-LC/MSn ion trap

Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 3392–3399



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)



Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in wastewaters by dual solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography electrospray ionization ion trap mass spectrometry

Nora Unceta<sup>a</sup>, M. Carmen Sampedro<sup>a</sup>, Nor Kartini Abu Bakar<sup>b</sup>,  
Alberto Gómez-Caballero<sup>a</sup>, M. Aránzazu Goicolea<sup>a</sup>, Ramón J. Barrio<sup>a,\*</sup>

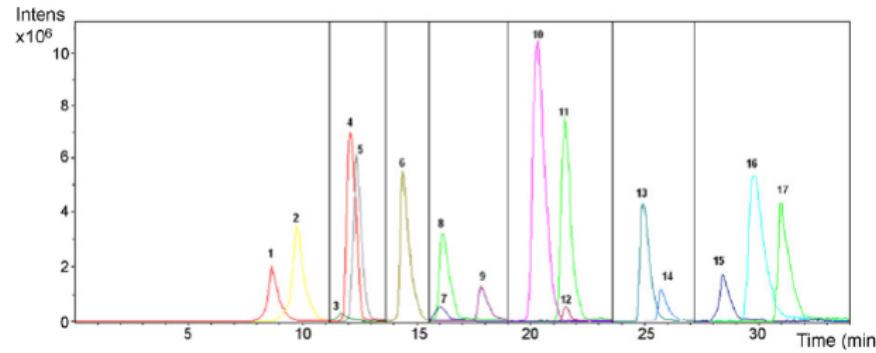
<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of the Basque Country, Paseo de la Universidad 7, 01006 Vitoria-Gasteiz, Spain

<sup>b</sup> Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia

# Determinazione quali/quantitativa di un analita

**XIC** (extracted ion chromatogram) di 16 composti farmaceutici presenti nelle acque di scarico urbano collettate presso il depuratore di Vitoria-Gasteiz città della provincia autonoma Basca Araba/Álava nel nord della Spagna.

## Analisi multiresiduo SPME-LC/MSn ion trap



# Determinazione qual/quantitativa di un analita

## Analisi multiresiduo SPME-LC/MSn ion trap

**Table 1**

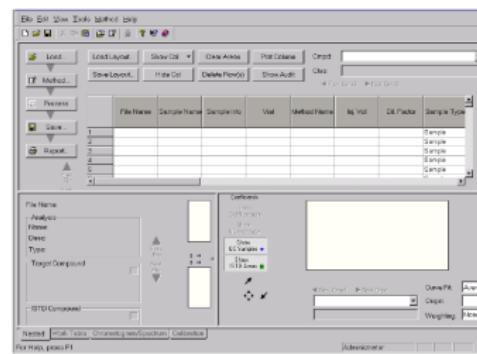
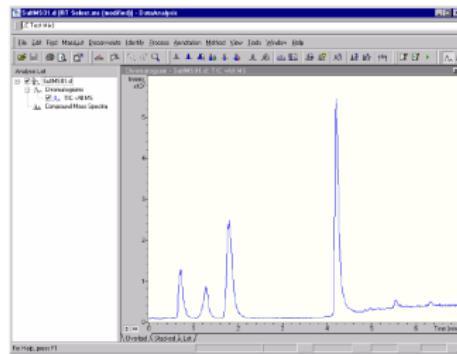
Data acquisition parameters for smart parameter setting (SPS) used in LC/MS ion trap for the detection of pharmaceutical compounds. Compound stability and trap drive level are fixed at 100% for all compounds and the fragmentation width was 10.0 ( $m/z$ ).

Time segments (min)	Compound name	Surrogate standard	Retention time (min)	LOQ (direct injection) ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	Precursor ion [ $\text{M}+\text{H}]^+$ *	MRM transition ( $m/z$ )	Fragmetation amplitude (V)	Cut-off ( $m/z$ )
1 0–11.2	Naproxen (NAP)	LRZ	8.7	1.0	231	231 → 185	0.40	62
	Valsartan (VAL)	LRZ	10.0	1.0	436	436 → 418	0.33	118
2 11.2–13.6	Trimethoprim (TRIM)	LRZ	11.8	1.0	291	291 → 123	0.70	79
	Bezafibrate (BEZA)	LRZ	12.1	0.5	362	362 → 316	0.45	98
	Torasemide (TORA)	LRZ	12.3	0.1	349	349 → 264	0.44	94
3 13.6–15.4	Diclofenac (DICLO)	LRZ	14.4	0.5	296	296 → 278	0.48	80
4 15.4–19	Metoprolol (MTL)	LRZ	16.0	0.5	268	268 → 116	0.60	72
	Carbamazepine (CBZ)	LRZ	16.1	0.2	237	237 → 194	0.52	64
	Lorazepam (LRZ)	–	17.8	1.0	321	321 → 303	0.47	87
5 19–23.6	Venlafaxine (VLF)	DZP	20.4	0.2	278	278 → 260	0.48	75
	Risperidone (RISP)	DZP	21.4	0.5	411	411 → 191	0.65	111
	Diazepam (DZP)	–	21.6	2.0	285	285 → 257	0.72	77
6 23.6–27.2	Citalopram (CIT)	FNT-d6	24.8	0.5	325	325 → 262	0.57	88
	6D-Fenitrothion (FNT-d6)	–	25.6	1.2	284	284 → 133	0.71	77
7 27.2–35	Fluoxetine (FLX)	FNT-d6	28.4	2.0	310	310 → 148	0.58	86
	Imipramine (IMIP)	FNT-d6	29.8	0.5	281	281 → 234	0.57	75
	Amitriptyline (AMIT)	FNT-d6	31.1	0.5	278	278 → 233	0.60	75

# Determinazione qual/quantitativa di un analita

Per l'analisi qualitativa e quantitativa lo spettrometro XTC Agilent usa l'applicativo **DataAnalysis** che permette la visualizzazione dei cromatogrammi TIC e XIC e dei relativi spettri di massa. Inoltre permette l'integrazione manuale e automatica dei picchi. Questo tool è utilizzato soprattutto per l'analisi di tipo qualitativo e per preparare la fase di analisi quantitativa utilizzando l'applicativo **QuantAnalysis**.

## Tool per analisi dati LC/MSn ion trap Agilent



# Conclusioni

**La tecnica LC/MS** in generale è una tecnica **molto potente**, se approcciata con attenzione e **passione** può dare grandi soddisfazioni. La tecnica non si impara passivamente, se hai l'anima di un massista lo capirai dalle emozioni che questa tecnica riuscirà a suscitarti.

Due risate...



# Bibliografia

- ▶ Manuali LC/MSn QIT XCT - Agilent Technologies
- ▶ Ion Trap Mass Spectrometry - Philip S.H. Wong, R. Graham Cooks - [www.currentseparations.com/issues/16-3/cs16-3c](http://www.currentseparations.com/issues/16-3/cs16-3c)
- ▶ Ion Trap Mass Spectrometry: A Personal Perspective George Stafford, Jr. - J. Am. Soc. Mass Spectrom 2002, 13, 589-596
- ▶ Investigating the Use of an Octupole Ion Guide for Ion Storage and High-pass Mass Filtering to Improve the Quantitative Performance of Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry - Robert D. Voyksner, HeewonLee - Rapid Commun. Mass Spectrom. 13 1427-1437 (1999)
- ▶ Optimization and Comparison of ESI and APCI LC/MS/MS Methods: A Case Study of Irgarol 1051, Diuron, and their Degradation Products in Environmental Samples - Niki C. Maragou, Nikolaos S. Thomaidis, Michael A. Koupparis - J. Am. Soc. Mass Spectrom. (2011) 22:1826-1838
- ▶ Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in wastewater by dual solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography ESI ion trap mass spectrometry - Nora Unceta - Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 3392-3399

# Grazie per l'attenzione!!!

Due risate...



*"Okay—who put my lunch through the mass spectrometer..?"*