

GC-MS: Más de un Analizador de Masas, ¿para qué?

Elena E. Stashenko*, Jairo René Martínez

Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química
Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM, Laboratorio de Cromatografía. Bucaramanga,
Colombia

Resumo

En los últimos años el uso de sistemas de detección tándem (MS/MS) como detectores cromatográficos se ha incrementado notoriamente. Se explican el propósito y las ventajas de tener más de un analizador de masas, en términos de sensibilidad, selectividad, y esencialmente, *especificidad*, un descriptor adicional del rendimiento incrementado que logra un sistema GC-MS/MS. Se destacan las características particulares de un sistema con triple cuadrupolo (QQQ o QqQ) y se describen sus varios modos de operación a fin de explicar el origen de este mayor desempeño. Según el modo de operación, el espectrómetro de masas con triple cuadrupolo puede ser universal (*full scan*), un detector selectivo (SIM), o un detector altamente específico (MRM), con ganancias simultáneas en la relación señal/ruido, con respecto al sistema GC-MS con un solo analizador cuadrupolar.

Abstract

The purpose and advantages of having more than one mass analyzer are explained in terms of sensitivity, selectivity and, particularly, specificity, an additional descriptor of the enhanced performance that a GC-MS/MS system achieves. The particular features of the triple quadrupole (QQQ or QqQ) system are highlighted and its various operation modes are described in order to explain the origin of this performance enhancement. Depending on the particular operation mode, the mass spectrometer with triple quadrupole may be a *universal* detector (full scan), a selective detector (SIM), or a highly-specific detector (MRM-mode), with concomitant gains in the signal/noise ratio, in comparison with a single quadrupole system.

Palavras-chave

GC, GC-MS; MSD, tándem, cuadrupolo (Q), triple cuadrupolo (QQQ, QqQ).

Keywords

GC, GC-MS, MSD, tandem, quadrupole (Q), triple quadrupole (QQQ, QqQ).

“Dos profesores de química después de sus clases, se dirigían a la cafetería universitaria. El profesor N comentó, entre dientes, al otro: “Sabes, que el NN compró un cromatógrafo con un triple cuadrupolo! Ya tenía varios GC-MS con cuadrupolos, una trampa de iones y ahora, como si le faltara, adquiere un cromatógrafo de gases con un triple cuadrupolo, ¿te imaginas?”. Su colega lo miró con extrañeza y sólo le respondió: “No seas envidioso, hermano, por algo sería, el triple cuadrupolo hará algo diferente o adicional, lo que no se logra con un cuadrupolo solo; no sé exactamente qué es lo que hace diferente, pero existiría una razón de peso...”. En este instante, les alcanzó, con una sonrisa amplia, el colega NN, como siempre positivo y amistoso. Los tres -tomando café-, conversaban y el profesor NN les describió las ventajas del triple cuadrupolo sobre el analizador simple, y los colegas, parece, quedaron convencidos”.

1 Introducción

Las técnicas de cromatografía de gases (GC) y espectrometría de masas (MS), unidas en un poderoso tándem, GC-MS, son herramientas imprescindibles en los análisis ambiental, forense, de productos naturales, control de *doping*, alimentos, toxicología y en muchas más áreas de investigación¹⁻³. El manejo de temperaturas de trabajo en el mismo rango (50-350°C), la fase de trabajo *gaseosa*, común para ambas técnicas, las concentraciones bajas y su rango (ppt - ppm), son comunes para GC y MS y hacen su unión casi perfecta. El pequeño inconveniente -al inicio-, resultó en la diferencia de presiones, a saber: en la GC, la salida del gas de la columna cromatográfica sucede a presión atmosférica, mientras que la cámara de ionización adonde ingresan los analitos, se ionizan y se fragmentan, se halla a presión reducida (10^{-5} - 10^{-7} Torr)¹. Cuando se usaban -desde hace más de 30 años-, las *columnas empacadas* que manejaban flujos de gases *carrier* altos (ca. 10-50 mL/min), se empleaban *separadores moleculares* o *interfaces* (separadores *jet*, separador de efusión molecular diferencial, separador de membrana, separador *open-split*, etc.)¹⁻⁴ para disminuir la caída de la presión entre la columna y la cámara de ionización. Su principal función residía en separar el gas de arrastre del analito, es decir, enriquecer la mezcla gaseosa con componentes *target*. La introducción de *columnas capilares* (con diámetros internos, D.I., iguales o menores de 0.32 mm), que llevan flujos de gas de arrastre (en GC-MS, típicamente, helio) muy bajos (0.5-2 mL/min), permitió realizar un cambio esencial en el acople de ambas técnicas, *i.e.*, unir las directamente, sin necesidad de

interfaces, ni separadores, simplemente insertando la columna capilar a la cámara de ionización, de forma directa⁵⁻⁷ (**Figura 1**).

El progreso alcanzado en el desarrollo de bombas de vacío con alta capacidad (*e.g.*, bombas *difusoras* de alta eficiencia o bombas *turbomoleculares*, las últimas, usadas hoy en día más frecuentemente), contribuyó también a la unión más eficaz de ambas técnicas, GC y MS. Cuando en los equipos GC-MS se emplean bombas difusoras, es conveniente usar flujos de gas de arrastre (helio) de ca. 1 mL/min y columnas capilares con D.I. igual o menor de 0.25 mm; las bombas turbomoleculares permiten el uso de columnas capilares con mayor diámetro, *e.g.*, de 0.32 mm, y flujos de gas de arrastre más altos^{5,6,8}. En el caso de que sea necesario el empleo de columnas *mega-bore* (D.I. 0.53 mm), por ejemplo, para el análisis de compuestos termolábiles, entre otros, explosivos a nivel de trazas, la conexión con el detector de masas se puede realizar a través de un *splitter* unido a un pequeño capilar, para reducir el flujo del gas que ingresa a la fuente de iones, que puede elevar su presión (**Figura 2**).

Es importante recordar algunos pequeños “inconvenientes” que también pueden surgir con la inserción directa de la columna capilar a la cámara de ionización. Por ejemplo, cuando hay que cambiar la columna, es necesario enfriar el equipo GC-MS, “ventear” el espectrómetro de masas, es decir, nivelar las presiones externa e interna. Otro aspecto a considerar es la presión reducida (vacío, 10^{-5} - 10^{-7} Torr) en la cámara de ionización, que afecta ligeramente la eficiencia de la columna. Además los tiempos de retención de los analitos que eluyen de la columna se “acortan” en unos 0.5-2 min en

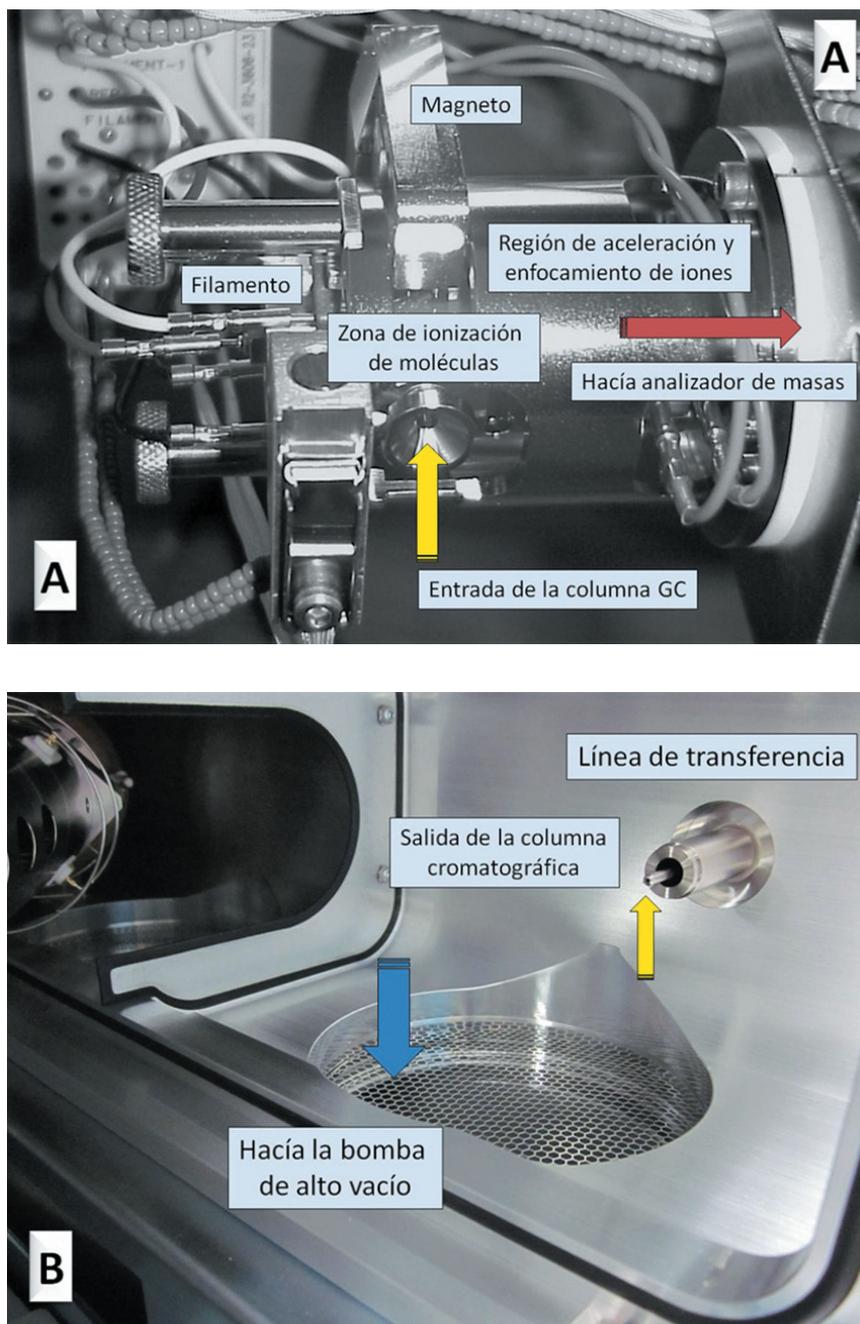


Figura 1. A. La columna cromatográfica capilar se inserta directamente a la cámara de ionización del espectrómetro de masas. B. El último tramo de la columna, antes de entrar a la fuente de iones, pasa por la línea de transferencia con calentamiento independiente.

comparación con los obtenidos en los cromatogramas registrados con sistemas de detección convencionales, por ejemplo, detectores de ionización en llama (FID), detector selectivo de nitrógeno y fósforo (NPD) o de captura de electrones (ECD), que operan a presión

atmosférica. La velocidad del flujo de gas de arrastre que atraviesa la cámara de ionización no es constante, ya que ésta depende de las dimensiones de la columna y de la temperatura de elución de los componentes

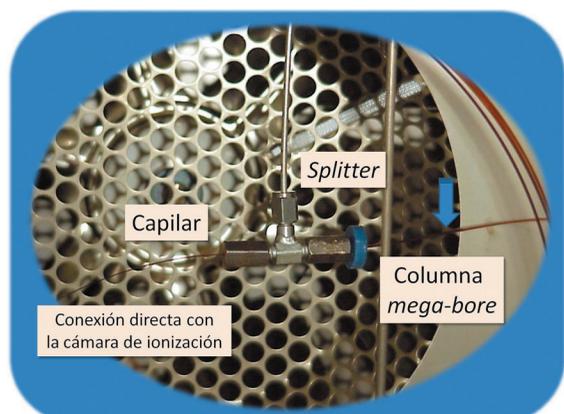


Figura 2. La conexión de una columna tubular abierta de mayor diámetro interno (D.I. > 0.32 mm), e.g., la columna *mega-bore* (D.I. 0.53 mm), requerida para el análisis de algunos compuestos termolábiles (por ejemplo, explosivos) puede realizarse a través de un *splitter* que conecta la columna analítica con un capilar que se inserta a la fuente de iones; el exceso de gas de arrastre se ventea.

(programación de la temperatura de la columna)⁸. La selección de una columna analítica adecuada (diámetro interno, tipo o polaridad de la fase estacionaria) y la velocidad del gas de arrastre, pueden ser limitadas por la temperatura de operación de la línea de transferencia (**Figura 3**) y por el flujo máximo del gas de arrastre que puede soportar el sistema de vacío empleado. Por ejemplo, el uso de columnas “polares”, por ejemplo, con fases estacionarias tipo poli(etilenglicol), es restringido, ya que las temperaturas operacionales más comunes de la línea de transferencia (280-320°C) y de la cámara de ionización (180-300°C) son mayores que las temperaturas que pueden soportar las fases estacionarias polares, sin que presenten un sangrado (descomposición) excesivo^{5,8}. Infortunadamente, el sangrado de la columna afecta mucho más el funcionamiento del espectrómetro de masas como sistema de detección cromatográfica, que cuando se usan detectores convencionales del GC (FID, ECD, NPD, etc.). El sangrado de la fase estacionaria introduce “nuevos” iones interferentes (e.g., en m/z 73, 147, 207, 281, 355, otros), intrusos, en los espectros de masas de los analitos, se aumenta sobremanera el *background* (fondo) y se contaminan las partes del espectrómetro de masas (cámara de ionización, electromultiplicador), lo que conduce a su descalibración y, sobre todo, a la disminución de

la sensibilidad^{5,6,8}.

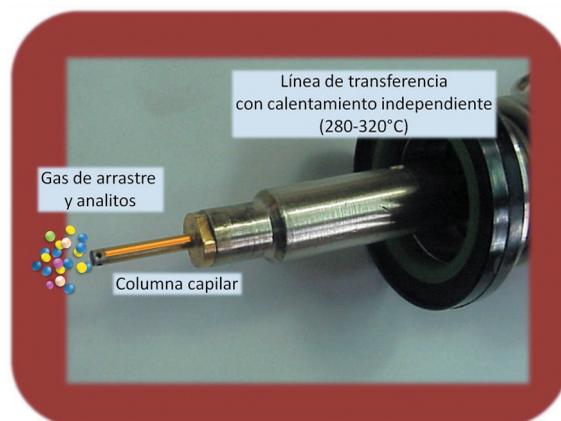


Figura 3. Un detalle de la línea de transferencia del equipo GC-MS que conduce el último tramo de la columna capilar cromatográfica a la cámara de ionización. Es una zona de calentamiento independiente del horno GC y de la fuente iónica, que generalmente debe mantenerse a temperatura alta (280-320°C), para evitar la condensación de analitos.

Un espectrómetro de masas unido al cromatógrafo de gases suele llamarse también como “*detector de masas*” o “*detector selectivo de masas*” (MSD, *Mass Selective Detector*, por sus siglas en inglés)⁵⁻⁸. El MSD consta de una *cámara de ionización* (fuente de iones o volumen iónico): en el método GC-MS fundamentalmente se usa la ionización con electrones o *impacto con electrones* (EI, *Electron Impact*, por sus siglas en inglés), pero también se emplea la *ionización química* (CI, *Chemical Ionization*, por sus siglas en inglés) de iones positivos o de iones negativos, como un método de ionización “complementario”, “suave”. La CI se usa cuando en los espectros de masas obtenidos por EI, no se registran iones moleculares, puesto que su fragmentación es excesivamente intensa, debido a su labilidad muy alta (tiempo de vida extremadamente corto, < 10⁻⁶ s) y ello no permite realizar su determinación⁹⁻¹². Este hecho limita mucho la obtención de información estructural de la molécula. Los iones formados en la cámara de ionización se extraen de ésta por medio de una serie de electrodos, que permiten colimar (enfocar) y acelerar el haz iónico, y dirigirlo a un

analizador de masas (**Figura 4**). La energía potencial creada por el campo acelerador (E_p) se convierte en la energía cinética (E_c) de los iones extraídos que se dirigen acelerados y colimados hacia el analizador de masas. La función del analizador es separar los iones de acuerdo con su relación m/z . Existen varios tipos de analizadores de masas que se usan en los equipos GC-MS. Entre los más frecuentes figuran *cuadrupolo* (Q) y *trampa de iones* (IT, *Ion Trap*, por sus siglas en inglés); también, hoy en día, es frecuente el uso de los analizadores de *tiempo de vuelo* (TOF, *Time-of-Flight*, por sus siglas en inglés) y, últimamente, los analizadores de resonancia ion-ciclotrónica con transformada de Fourier (FT-ICR, *Fourier Transform Ion-Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*, por sus siglas en inglés); sin embargo, el uso de analizadores de masas de *deflexión magnética* como detectores GC es mucho menos frecuente⁹⁻¹².

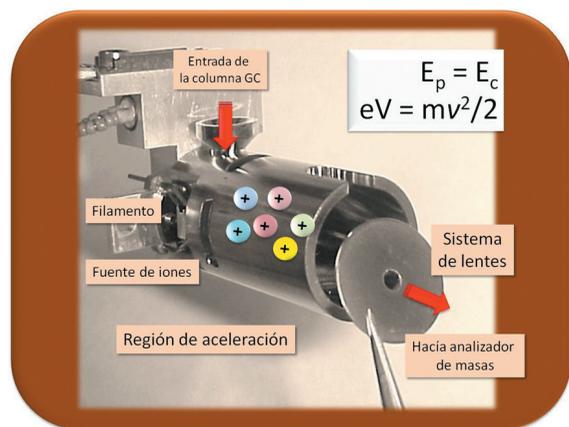


Figura 4. Los iones que se forman en la fuente de iones se extraen de ésta por medio de un sistema de lentes (electrodos). El campo potencial (E_p) en la región de aceleración se convierte en la energía cinética (E_c) de los iones que ingresan en forma de un haz iónico colimado al analizador de masas, donde sucede su separación según la relación m/z .

2 Detectores selectivos de masas

Como cualquier otro detector cromatográfico, su función consiste en dar respuesta a los componentes que emergen de la columna, *verbigracia*, en obtener un cromatograma; en el caso

de MSD, es la *corriente iónica total* (TIC, *Total Ion Current*) procesada en función del tiempo³⁻⁸. Las áreas de los picos cromatográficos sirven de base para la cuantificación de los analitos, previa la calibración y la determinación de los factores de respuesta (R_f) que permiten obtener las áreas cromatográficas corregidas. Sin embargo, la corriente iónica producida, inclusive en el mismo equipo, puede variar, ya que depende mucho, entre algunos otros factores, de la presión residual en la cámara de ionización. La presión en la fuente de iones, a su vez, es variable, ya que depende de la cantidad y del tipo de moléculas-analito que ingresan, pero también de las moléculas del fondo (aire, humedad, solventes, productos de sangrado de la fase estacionaria, interferencias, contaminación, plastificantes, etc.). Estos factores afectan la reproducibilidad de las mediciones cuantitativas. Por esto, frecuentemente se recomienda para la cuantificación usar detectores GC convencionales, o realizar la operación del MSD en un detector libre de fugas y de contaminación, y sobre todo, usando un modo de adquisición diferente y medición de la corriente iónica, por ejemplo, en modo de monitoreo de ion(es) selectivo(s), SIM (*Selected Ion Monitoring*, por sus siglas en inglés), que permita disminuir el efecto del ruido químico. Otra, muy interesante, opción es el uso de los llamados analizadores de masas en *tándem*^{13,14}.

El *detector selectivo de masas* (MSD) es un sistema de detección cromatográfica, pero además es un dispositivo “vidente”, que a través de un espectro de masas (junto con los índices de retención cromatográficos) permite elucidar la estructura del analito¹⁵. Lo más interesante del MSD es su capacidad, acorde con el modo de adquisición y procesamiento de la corriente iónica, de funcionar como un sistema de detección *universal*, detector *selectivo* o detector *específico*^{6,8}. La transmisión por el analizador, la separación y el registro de *todos los iones* que se forman y emergen de la cámara de ionización en función de tiempo, llamado el modo de *full scan* (barrido completo), permite el funcionamiento del MSD como detector cromatográfico *universal*. Los espectros de masas obtenidos para cada pico cromatográfico pueden ser comparados con los de las bases de datos (bibliotecas de espectros) comerciales

o con los de las sustancias de referencia (estándares). Se puede supervisar la homogeneidad de cada pico cromatográfico comprobando la igualdad o no de los espectros de masas tomados en diferentes puntos de la ventana de elución de una (o varias) sustancias. En la **Figura 5**, la “sustancia” que eluye a 12.97 min, en realidad, es una mezcla de dos compuestos, benzaldehído y α -pineno, y sólo es posible establecerlo si se toman espectros de masas en diferentes puntos del pico cromatográfico y no se observa su equivalencia. Para llegar a elucidar la estructura química de la sustancia, cada espectro de

masas se estudia analizando su aspecto general, la presencia de ion molecular, el patrón isotópico, la ocurrencia de nitrógeno en la molécula, los fragmentos característicos y el esquema general de la disociación de la molécula ionizada y sus iones-fragmento típicos, entre otros ^{10-12,15}. Cabe recordar, que la identificación *confirmatoria* (absoluta) de un compuesto por GC-MS solo es posible cuando se emplea su patrón certificado (sustancia de referencia) analizado bajo las mismas condiciones operacionales del equipo; estos aspectos se discutieron detalladamente en trabajos previos ^{16,17}.

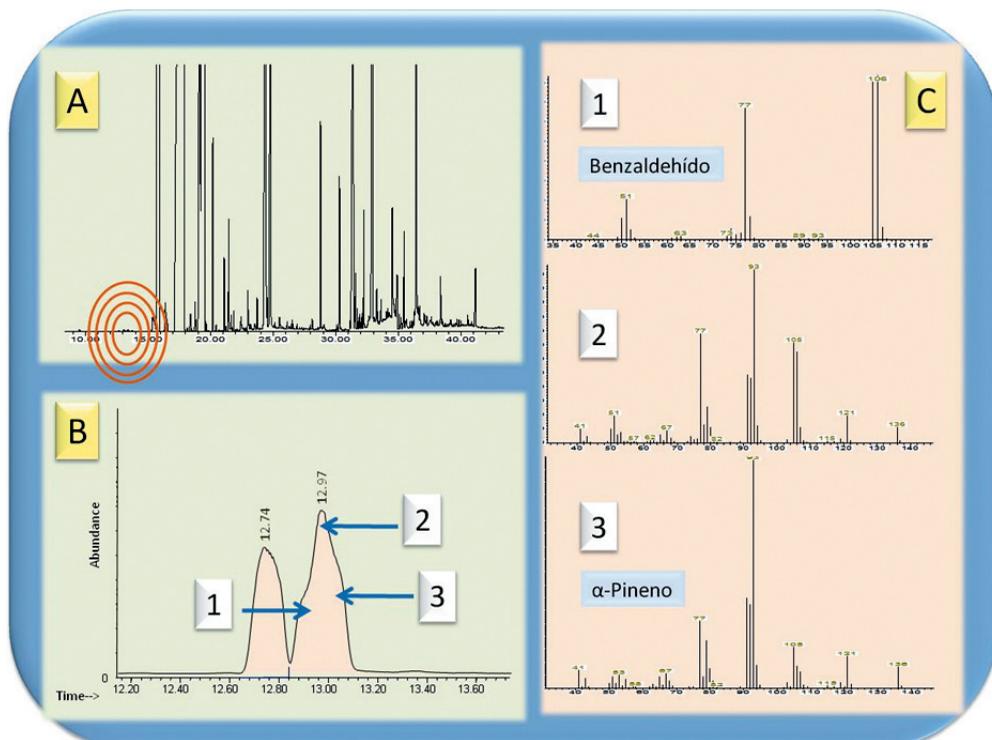


Figura 5. A. Corriente iónica total (TIC), de una fracción de volátiles aislada por HS-SPME de una fruta. B. Fragmento de la TIC amplificado, donde aparecen indicados los puntos 1, 2 y 3 en los cuales se tomaron espectros de masas (EI, 70 eV) en el pico cromatográfico ($t_R = 12.97$ min) no *homogéneo* (conformado por más de una sustancia). C. Espectros de masas de: (1) benzaldehído, (3) α -pineno y (2) de la mezcla de ambos.

Cuando en el espectro de masas de una sustancia se registran únicamente algunos iones (preseleccionados) característicos (por lo general, 1-3) o “diagnósticos”, las corrientes iónicas parciales

procesadas en función del tiempo, se denominan *fragmentogramas de masas*; en éstos aparecen exclusivamente picos cromatográficos de las sustancias de interés (por ejemplo, hidrocarburos

poliaromáticos, drogas o sus metabolitos, pesticidas, biomarcadores, etc.), en cuyos espectros de masas aparecen sólo los iones preseleccionados^{6,8}. Este método de adquisición de corrientes iónicas parciales se conoce, como se mencionó antes, con el nombre de *monitoreo de ion(es) seleccionado(s)* o SIM (*Selected Ion Monitoring*, por sus siglas en inglés). Cuando se usa el modo de adquisición SIM, el detector de masas se convierte en un detector cromatográfico *selectivo*. La transformación del detector selectivo de masas en un detector GC *específico*, por lo general, requiere del uso de más de un analizador, es decir, de una configuración *multidimensional* (en tiempo o en espacio), conocida como configuración *tándem*^{13,14,18}.

Los detectores selectivos de masas se dividen en dos grandes grupos⁹⁻¹². El primero, lo constituyen los analizadores de barrido (*Scanning Analyzers*). Entre éstos se encuentran los analizadores *sectoriales*, e.g., de *deflexión magnética* de un enfoque o de dos enfoques, cuando se agrega otro analizador, *electrostático*, y los analizadores *cuadrupolares*. El analizador de sector magnético históricamente fue el primer analizador de masas empleado. Sin embargo, su uso en GC-MS no es tan frecuente. El segundo grupo lo conforman analizadores de transmisión de iones simultánea. Entre éstos, figuran los de *tiempo de vuelo* (TOF), diferentes tipos de *trampas iónicas* (IT) y analizadores de masas con transformada de Fourier (FT-MS, *Fourier Transform Mass Spectrometers*, por sus siglas en inglés), concretamente, espectrómetros de masa de resonancia ion-ciclotrónica (ICR-MS, *Ion-Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*, por su siglas en inglés); los últimos han adquirido últimamente popularidad en el campo de técnicas de acoplamiento tanto de cromatografía líquida como de gases¹⁹.

Los detectores selectivos de masas se diferencian entre sí por sus propiedades o especificaciones técnicas y alcances analíticos. Entre estos parámetros figuran: (1) la resolución; (2) la masa máxima que pueden medir y (3) la transmisión de iones. Los analizadores de masas *de baja resolución* (deflexión magnética de un solo enfoque, cuadrupolos, trampas de iones, TOF lineales) miden *masas nominales* (números enteros) y no pueden distinguir especies *isobáricas*, mientras que los

analizadores de alta resolución permiten determinar *masas exactas* de iones (4-6 dígitos después de la coma), cuya medición conduce a la determinación inequívoca de su composición elemental e isotópica. Uno de los ejemplos más simples, clásicos, representa la medición de los iones isobáricos de las especies CO^+ , N_2^+ y C_2H_4^+ , cuya “separación” es imposible con un analizador de baja resolución y sólo se alcanza con analizadores de alta resolución (sectores magnético y eléctrico, TOF de alta resolución o ICR-MS) que trabajan en la “escala” de masas exactas¹⁹ (**Figura 6**). Por supuesto, los gases CO , N_2 y C_2H_4 en una mezcla pueden ser separados y cuantificados en columnas GC, tipo PLOT (*Porous Layer Open Tubular Columns*, por sus siglas en inglés), es decir, por cromatografía gas-sólido (GSC)⁸. El rango de masas en el que opera cada analizador es importante, sobre todo, la masa máxima que éste puede medir. Por ejemplo, los analizadores TOF no tienen límites para medir masas altas (mientras que los cuadrupolos y trampas de iones sí), el rango de masas del TOF es virtualmente infinito. El rango de masas que pueda alcanzar cada analizador depende de su configuración, el mecanismo de separación de iones y del grado de la “monoenergización” de iones con la misma masa, es decir, de la capacidad de disminuir su dispersión en el tiempo o en el espacio que conduce al ensanchamiento de la señal (corriente iónica parcial). La *transmisión* de iones en analizadores másicos se mide como la relación entre los iones que se forman en la cámara de ionización y los que -después de atravesar el analizador de masas- alcanzan el detector. Por supuesto, los analizadores de barrido (sectoriales, cuadrupolos) poseen valores más bajos de transmisión de iones que los analizadores de transmisión simultánea, *verbigracia*, TOF, IT, FT-ICR-MS. Los últimos, generalmente, gozan de una sensibilidad más alta^{11,12,19}.

3 Cuadrupolo (Q)

Quizás uno de los detectores selectivos de masas más usados en combinación con la cromatografía de gases, GC-MSD, es el *analizador cuadrupolar* (Q)^{6,8}, coloquialmente llamado

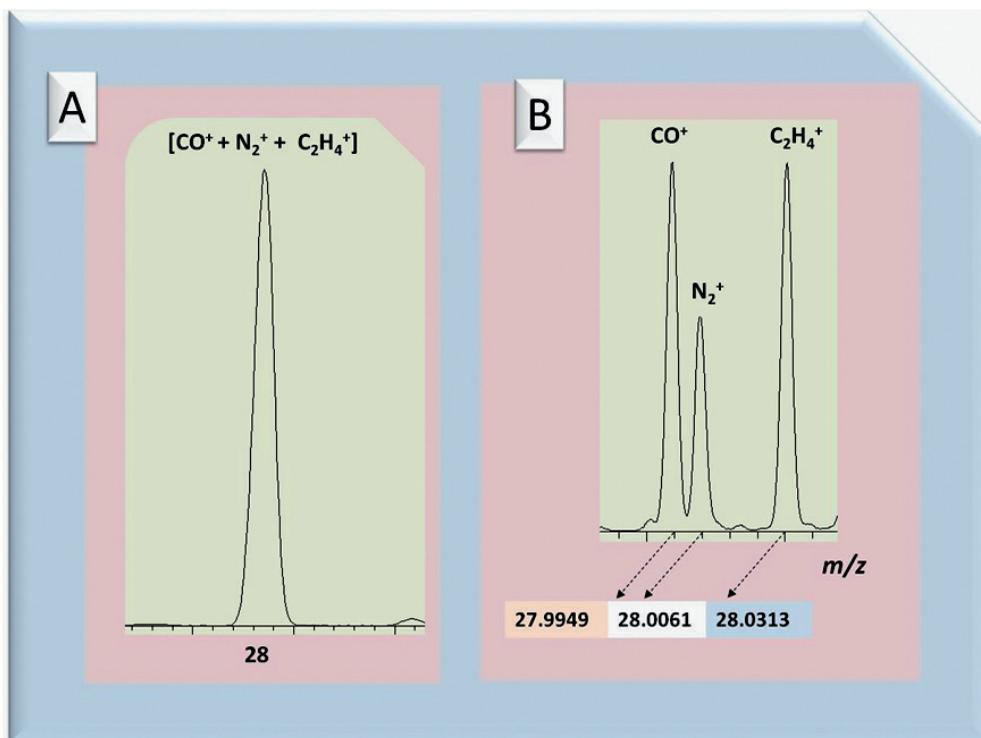


Figura 6. Medición de masa del ion en m/z 28 (masa nominal) con: **A.** Analizador de masas de baja resolución (escala de *masas nominales*) y **B.** Analizador de masas de alta resolución (escala de *masas exactas*). Para la separación de iones CO^+ y C_2H_4^+ se requiere la resolución $R > 770$, mientras que para la separación de especies moleculares CO^+ y N_2^+ , hay que tener la resolución por encima de 2500.

cuadrupolo o filtro de masas. En éste, los iones, provenientes de la cámara de ionización, colimados y acelerados por medio de una serie de electrodos (potencial de aceleración, generalmente bajo, 5-100 V) (Véase **Figura 4**), ingresan al espacio entre las cuatro barras metálicas que conforman el cuadrupolo. En la **Figura 7** aparecen algunas imágenes de analizadores cuadrupolares y un corte transversal esquemático, por los ejes x e y , entre los cuales suceden oscilaciones de los iones y su movimiento (traslado o transmisión) por el eje z (perpendicular al plano), bajo el efecto del campo eléctrico.

En el cuadrupolo, los iones de diferentes masas (m/z) se separan con la ayuda del campo eléctrico aplicado, en un espacio confinado por cuatro barras metálicas paralelas, a las cuales se aplican las corrientes *directa* (DC) y *alterna* (radiofrecuencia, RF). Mientras atraviesan el campo eléctrico (combinación de corrientes directa

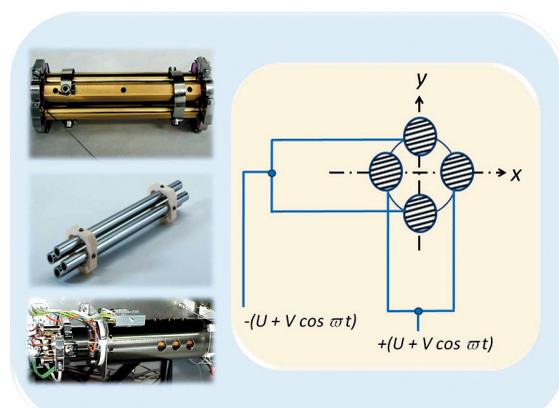


Figura 7. Algunas imágenes de cuadrupolos y un “corte” transversal esquemático de barras cuadrupolares a las cuales se aplican, con la polaridad “diagonalmente” opuesta, los potenciales directo (U , corriente directa) y alterno (componente de la radiofrecuencia, $V \cos pt$), con un desplazamiento de la fase de radiofrecuencia de 180° . Se lleva a cabo el barrido (*scan*) de U y V , mientras su relación (U/V) se mantiene constante.

y alterna), entre las barras, los iones en un espacio tridimensional, a lo largo de un eje central, adquieren una trayectoria oscilatoria muy compleja. Debido a que cada ion posee la frecuencia propia que depende de su masa, solo aquellos iones cuya frecuencia es resonante (coincidente) con la del cuadrupolo, podrán atravesarlo, ya que en este caso no experimentarán la deflexión por el campo. Esto sucede únicamente bajo una combinación determinada de valores de potenciales fijo (U) y alterno (V) y la frecuencia (ω) de RF. Cuando los iones con la masa específica (m/z) entran “en resonancia” (iones resonantes) alcanzan a conservar su trayectoria estable (recta, sin deflexión) y a cruzar el espacio cuadrupolar sin sucumbir, por choques, con las barras metálicas. Al salir del analizador, la corriente eléctrica (corriente iónica parcial) de estos iones se mide, por lo general, en un electromultiplicador. Ésta, después de amplificada y

digitalizada, se convierte en una señal gráfica, *i.e.*, en la intensidad o abundancia del ion-fragmento en un espectro de masas. La suma de todas las corrientes iónicas parciales medidas en función del tiempo, resultará en otra gráfica, *verbigracia*, en el cromatograma (= corriente iónica total reconstruida, TIC, *Total Ion Current*, por sus siglas en inglés). En la **Figura 8** aparece, esquemáticamente representado, el proceso de barrido de RF (*scan* de U y V, mientras $U/V = const$), en función del tiempo, y la “construcción” de un pico cromatográfico con base en la integración (suma) de las corrientes iónicas parciales generadas por los iones-fragmento de diferentes masas en los cuales la molécula ionizada se disocia en la fuente de iones, acorde con su estructura química y la energía interna adquirida en el proceso de ionización.

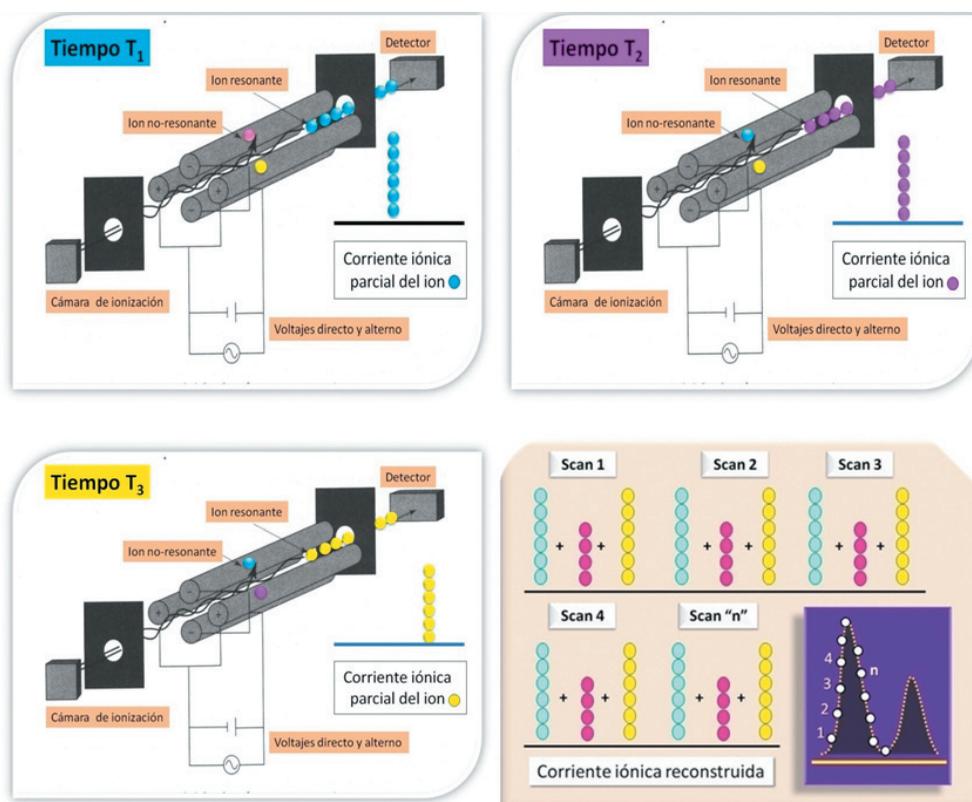


Figura 8. La separación de iones en un cuadrupolo en función del tiempo, mientras se realiza el barrido (*scan*) de los potenciales U y V, componentes de las corrientes directa y alterna aplicadas a las barras cuadrupolares. Cada *scan* (1, 2, 3, ... n) corresponde a un espectro de masas obtenido. El pico cromatográfico se construye con base en las corrientes iónicas parciales registradas e integradas (sumadas). Si el *scan* se hace muy lento, habrá puntos (datos) insuficientes para reconstruirlo adecuadamente, sin “deformación”, pero si el barrido es demasiado rápido, serán comprometidos el registro (detección) de algunos iones-fragmento y la calidad del espectro de masas obtenido.

Distintas ventajas hacen del cuadrupolo el analizador de masas preferido en la técnica de GC-MS. Entre éstas, se destacan las siguientes: (a) su tamaño compacto (*benchtop*) y precios relativamente bajos; (b) el barrido (*scanning*) de masas rápido y con buen rango dinámico (10^5); (c) la simplicidad de construcción y la operación computacional; (d) la robustez y la facilidad de manejo y limpieza, acoplamiento fácil con diferentes sistemas de entrada de muestra (cromatografía de gases, líquida, aplicación directa); (e) los voltajes relativamente bajos y menores exigencias para tener muy alto o ultra alto vacío (opera sin problemas hasta $p=5-9 \times 10^{-5}$ Torr); (f) la posibilidad de registro de iones tanto positivos como negativos; la compatibilidad con sistemas de ionización por impacto de electrones o por ionización química; (g) mayores similitudes entre los espectros de masas adquiridos en cuadrupolos con los obtenidos en analizadores de deflexión magnética, *i.e.*, aquellos que fundamentalmente conforman las bases de datos (bibliotecas) de espectros de masas comerciales. Si un cuadrupolo opera únicamente en el modo de RF, sin la aplicación de voltajes de corriente directa (DC), los iones no se separarán, ya que solo se llevará a cabo su guía o transmisión; en este caso, el cuadrupolo puede ser usado como una celda de colisiones ion-moleculares, lo que se aprovecha ampliamente en el estudio de iones metaestables y, sobre todo, en los llamados sistemas *tándem*^{8,11,12}.

4 Sistemas *tándem* (MS/MS). Triple cuadrupolo (QqQ).

Similar a un sistema cromatográfico *unidimensional* (con una sola columna) que puede alcanzar los límites de capacidad para separar los componentes de una mezcla muy compleja²⁰, la espectrometría de masas "*unidimensional*" (con un solo analizador de masas) también puede alcanzar sus límites de resolución, sensibilidad, rango de masas y, sobre todo, de volumen de información requerida para elucidar una estructura molecular^{13,14}. Cuando los espectros de masas resultan con muy pocas señales, representadas predominantemente por iones moleculares o iones moleculares protonados (o

deprotonados) y algunos iones *clúster*, y no se registran iones-fragmento (iones-producto), resulta muy difícil establecer la estructura química de la molécula de manera confiable. Frecuentemente, durante un análisis GC-MS de extractos obtenidos de muestras biológicas, alimentos, suelos, etc., se observa en los espectros de masas un excesivo ruido químico. Éste impide alcanzar la especificidad requerida para detectar e identificar confiablemente los analitos de interés, sobre todo, cuando se trata de análisis de una mezcla compleja, con muchas interferencias o impurezas.

Por lo general, la relación señal/ruido (S/N) aumenta con el número de pasos (etapas) en un procedimiento analítico (**Figura 9**)⁸.

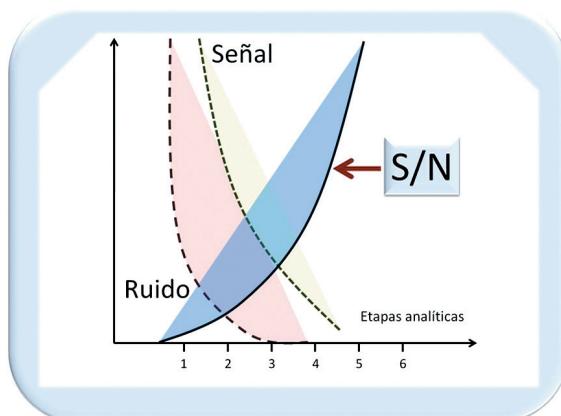


Figura 9. Correspondencia entre la señal (S), el ruido (N), su relación (S/N) y los pasos o etapas realizados en un procedimiento analítico dado.

En análisis instrumental, éste es el caso típico de un sistema *tándem*, por ejemplo, GC-MS o LC-MS, cuando se incluye la espectrometría de masas *multidimensional* (MS-MS) o técnicas *tándem*. Igual a una operación de limpieza (*clean-up*) de un extracto, que permite aumentar la relación S/N¹⁴ en el proceso de su análisis instrumental final, durante el primer paso de separación de iones, *verbigracia*, en el primer analizador de masas (MS1), se realiza un *clean-up* específico, al distinguir -en una mezcla compleja- los iones propios del analito y procedentes

de las interferencias, y registrar luego sólo las señales características del analito-*target* en el segundo analizador de masas (MS2), que permitirá obtener, un espectro de masas del ion característico del analito-*target*, filtrado por el primer analizador (MS1). Entre los dos analizadores se ubica un dispositivo donde el ion seleccionado puede “activarse”, es decir, aumentar su energía interna conducente a su disociación y a la formación de iones-fragmento (iones-producto), que se registran en el analizador MS2. Este dispositivo funciona como una “cámara” o celda de colisiones activadas que provocan las disociaciones (inducidas) de iones estables. La configuración “clásica” de un sistema de masas *tándem* es el MS1, la cámara de colisiones activadas y el MS2, seguido de un sistema de detección y medición de corrientes iónicas.

Los sistemas de masas *tándem* se dividen en dos grupos grandes²¹⁻²³, según los tipos de analizadores de masas involucrados en la configuración MS/MS. El primer grupo, lo conforman espectrómetros de masas *tándem en tiempo* (*tandem-in-time*). Entre éstos, figuran trampas de iones lineales y cuadrupolares, trampas orbitales (*orbitrap*) y FT-ICR-MS. En los equipos tipo *tandem-in-time* los iones producidos en la región de ionización se atrapan, se aíslan, se fragmentan y luego se separan de acuerdo con su relación m/z en el mismo espacio físico. La cascada de reacciones de disociación de iones pre-seleccionados y luego activados y su posterior monitoreo, *vis.*, barrido (*scan*) de iones-producto, tienen lugar en el mismo analizador, pero suceden en función del tiempo, consecutivamente, permitiendo así el registro sucesivo de iones-hijo, iones-nieto, iones-bisnieto, iones-tataranieto, chozno, etc., hasta $(MS)^n$. Alegóricamente, ello se puede representar por medio de una *matrioshka*, una muñeca que en sus entrañas lleva la otra, más pequeña (ion-fragmento) y ésta, en su turno, a la otra, y así sucesivamente (Véase la **Figura 10**).

El segundo grupo de equipos de masas *tándem* (MS/MS) lo conforman los llamados espectrómetros de masas *tándem en espacio* (*tandem-in-space*)^{19,22}. En éstos los -por lo menos- dos analizadores son separados en el espacio. En los equipos *tandem-in-space*, no solamente es

posible el estudio de iones-producto, sino también de los iones precursores, de las reacciones (transiciones) entre dos iones relacionados o el monitoreo de la pérdida de un fragmento neutro, entre otras posibilidades. A este grupo de analizadores en *tándem*, MS/MS, pertenece un triple cuadrupolo, designado por sus siglas como QQQ o QqQ. Las configuraciones MS/MS *híbridas* implican la combinación de varios analizadores de diferente naturaleza o de distintos principios de funcionamiento, por ejemplo, cuadrupolo (Q) o trampa de iones (IT) con un analizador de sector magnético (B) solo o en conjunto con un analizador electrostático (E), o con analizador de tiempo de vuelo (TOF). Ello da origen a diferentes equipos *tándem híbridos*, por ejemplo, E-B-E, E-B-E-B, B-Q1-Q2, Q-E-B, Q-TOF, IT-TOF, B-TOF, E-B-TOF, E-B-E-TOF, Q-B-E y otras posibles combinaciones de analizadores. Por supuesto, la unión de varios analizadores aumenta sobremanera el costo del instrumento y la complejidad de su manejo, pero, a la vez, incrementa la cantidad y la calidad de la información analítica obtenida, el grado de su confiabilidad y la especificidad^{8,14,19}.

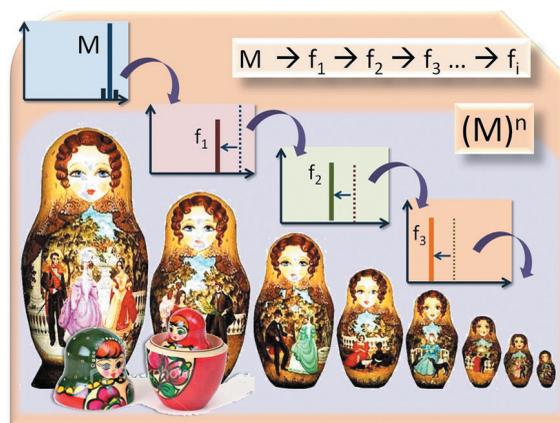


Figura 10. Una representación alegórica -a través de una *matrioshka*-, de la obtención de iones-producto, en cascada (iones-hijo, -nieto, -bisnieto, -tataranieto, -chozno, etc.), a partir de un ion-precursor en un sistema *tándem en tiempo* (*tandem-in time*), $(MS)^n$, por ejemplo, en una trampa de iones, donde los procesos de ionización, fragmentación, selección de iones y su activación, acompañados de la separación según su m/z , acontecen en función del tiempo, pero en el *mismo* espacio.

El acoplamiento de técnicas cromatográficas con la espectrometría de masas incrementa -como ya se mencionó-, la cantidad de información analítica obtenida, pero el uso de varios detectores, *verbigracia*, analizadores de masas en configuración *tándem*, produce un aumento considerable del volumen de información obtenida (Véase **Tabla 1**) y una avalancha de datos sobre las estructuras moleculares, composiciones elementales e isobáricas, presencia de compuestos a nivel de trazas y un incremento de la sensibilidad y la especificidad del método analítico, lo que permite eliminar los fenómenos de falsos positivos y falsos negativos en un procedimiento analítico.

Tabla 1. Volumen de información analítica que se obtiene con diferentes técnicas de espectrometría de masas y sistemas acoplados según R.A. Yost²² y Kaiser²⁴.

Técnica	Factor
MS ^a	0.002
GC-MS (Columnas empacadas) ^b	0.12
GC-MS (Columnas capilares)^c	1
MS/MS	2
GC-MS/MS (Columnas empacadas)	118
GC-MS/MS (Columnas capilares)	1000

a) MS: 1000 u, resolución de unidad másica, intensidad máxima 2¹².

b) 2 x 10³ platos teóricos, tiempo de corrida cromatográfica – 30 min.

c) 1 x 10⁵ platos teóricos, tiempo de corrida cromatográfica – 60 min.

Los equipos de espectrometría de masas *tándem*, MS/MS, involucran dos etapas de análisis de masas de iones, separadas por una reacción de *disociación activada* o *inducida* de iones. Ésta sucede entre la medición de masas antes y después de la fragmentación de los iones, seleccionados en la primera etapa, provocada por la colisión del ion seleccionado con moléculas de gas inerte (He, Ar, Xe o N₂, a presión de 0.1-0.3 Pa), o por el potencial

acelerador de un campo electrostático aplicado, en una celda de “activación”, de colisiones activadas o llamada también de colisiones inducidas. Cuando se emplean los métodos de ionización “suave” (por ejemplo, la ionización química, CI) o en el acoplamiento de cromatografía líquida con espectrometría de masas con *electrospray* (ESI) o la ionización química a presión atmosférica (APCI, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, por sus siglas en inglés), los iones moleculares (o poliprotonados, multicargados) no se fragmentan prácticamente, y ello conduce a una gran carencia de la información requerida para la elucidación estructural de la molécula. La “energetización” de los iones (cationes) estables (no-disociados), por ejemplo, iones moleculares o cuasi-moleculares, especies multiprotonadas, *chúster*, etc., permite inducir forzosamente su disociación y extraer, luego, la información estructural complementaria a la de la masa molecular o composición elemental (cuando se usan analizadores de masas de alta resolución). El uso de un sistema de detección con más de un analizador másico (espectrometría de masas *multidimensional*, *tándem* o MS/MS), como un *triple cuadrupolo* (QqQ) (**Figura 11**), resulta apropiado para el análisis de compuestos *target* a nivel de trazas (rango ppt-ppb), en matrices muy complejas, con presencia de interferencias, tal como sucede en muestras de alimentos, fluidos biológicos, tejidos animales y vegetales, suelos, aguas residuales y otras muestras ambientales, etc.

La técnica MS/MS es de gran ayuda y es un refuerzo analítico grande, valioso, requerido en las situaciones cuando: (1) se observa un alto ruido químico (*Chemical Noise*) en espectros adquiridos en el modo SIM; (2) se pone de manifiesto la coelución de iones característicos (iones-diagnóstico) con impurezas isobáricas (la misma masa nominal); (3) la estructura del compuesto se desconoce y se requiere una información estructural adicional (a menudo, es necesario “activar” iones moleculares, cuasi-moleculares o protonados, o algunos iones-fragmento estables, para extraer información estructural adicional a través de los productos en los cuales los iones-fragmento se disocian); (4) el fragmentograma de masas obtenido en modo SIM

requiere una información confirmatoria adicional y, finalmente, (5) se requieren la sensibilidad y la especificidad más altas del análisis (residuos de pesticidas, biomarcadores en petróleo, esteroides anabolizantes u otros agentes de *doping*, residuos de pesticidas, etc.). La configuración de triple cuadrupolo

proporciona una gama de experimentos analíticos y modos de adquisición de corrientes iónicas (**Figura 12**), cada uno de los cuales suministra una determinada información. A continuación, se describe cada uno de los posibles modos de adquisición del equipo QQQ (QqQ).

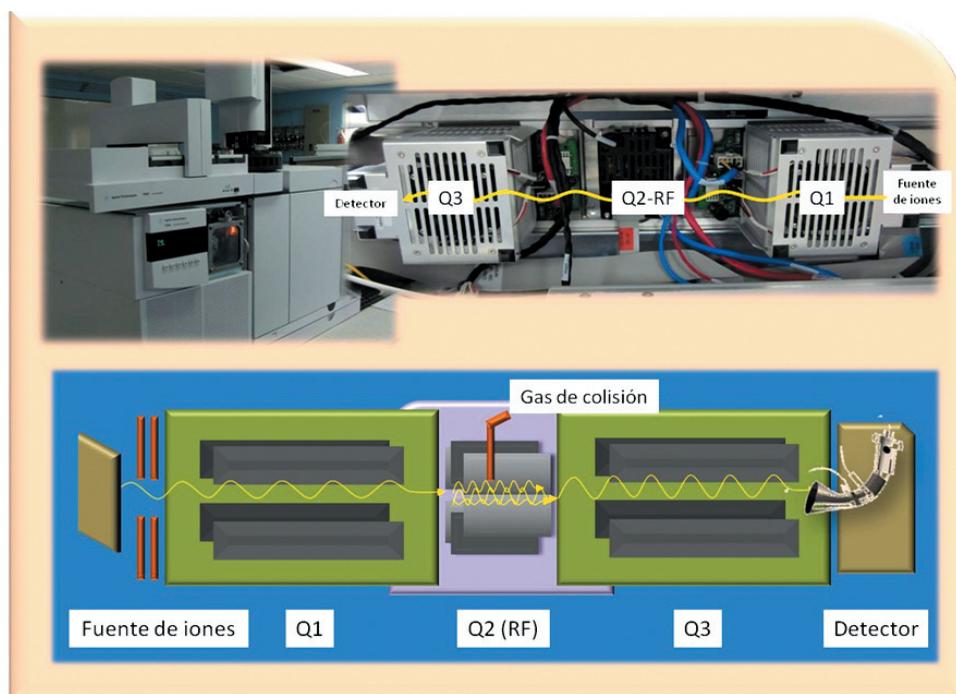


Figura 11. Aspecto general de un equipo GC-MS/MS con un analizador de masas de triple cuadrupolo (QQQ o QqQ) como detector de cromatografía de gases (instrumento compacto, *benchtop*). Aspecto externo de la ubicación de los tres cuadrupolos. El primer cuadrupolo (analizador de masas MS1, Q1) y el tercer cuadrupolo (analizador de masas MS2, Q3) funcionan como analizadores máscicos cuadrupolares tradicionales en modos de barrido completo (*full scan*) y monitoreo de ion seleccionado (SIM), en formas independientes o enlazadas (*linked*). El segundo cuadrupolo (Q2 o q) tiene entrada de un gas inerte (He, Ar o N₂), funciona como una cámara (celda) de colisiones activadas y no hace barridos (*scan*), ya que solo se mantiene en modo de radiofrecuencia (*RF-mode*) y permite guiar los iones (transmitir) del analizador Q1 al Q3, con o sin un potencial aplicado.

Barrido completo (*full scan*). Este tipo de adquisición de corrientes iónicas es tradicional, es decir, similar al que se emplea en los equipos con un solo analizador cuadrupolar (filtro de masas) (**Figura 8**). En el equipo QQQ (QqQ), el primer analizador MS1 (Q1) hace un barrido completo y registra espectros de masas de cada uno de los analitos que emergen de la columna GC o LC, se ionizan y se fragmentan en iones moleculares y sus diferentes iones-producto. En la técnica de GC-MS, *ca.*

0.05-1 ng de un compuesto son suficientes para obtener el espectro de masas que cumpla con criterios de calidad^{8,12}. Éste será la base para la identificación presuntiva (cuando se usan bases de datos de espectros de masas) o confirmatoria (cuando se usan compuestos-patrón certificados). Los cuadrupolos Q2 (q) y Q3 (analizador de masas MS2) operan solo en modo de transmisión de iones^{16,17}.

Barrido de ion(es) seleccionado(s) (SIM, *Selected Ion Monitoring*). Este modo de adquisición

también es bien conocido⁵⁻⁸ y se practica ampliamente en equipos con un solo cuadrupolo (**Figura 13**). En este caso, el primer analizador, MS1 (Q1) solo déjase pasar un ion o varios iones seleccionados (usualmente, 2-3), típicos o característicos del analito-*target*, que se busca selectivamente en una mezcla compleja. Los otros dos cuadrupolos, Q2 y Q3 (MS2), sólo transmiten estos iones filtrados por el MS1 (Q1). Con

base en las corrientes iónicas parciales registradas se construye el fragmentograma de masas. Debido a que cada ion seleccionado se mide más prolongadamente, *e.g.*, unos 50 ms en vez de 50 μ s, y el ruido químico se reduce (se aumenta la relación S/N), se bajan los niveles de detección, por un factor de 10-100, y ello permite determinar analitos-*target* en cantidades de orden pg o menores.

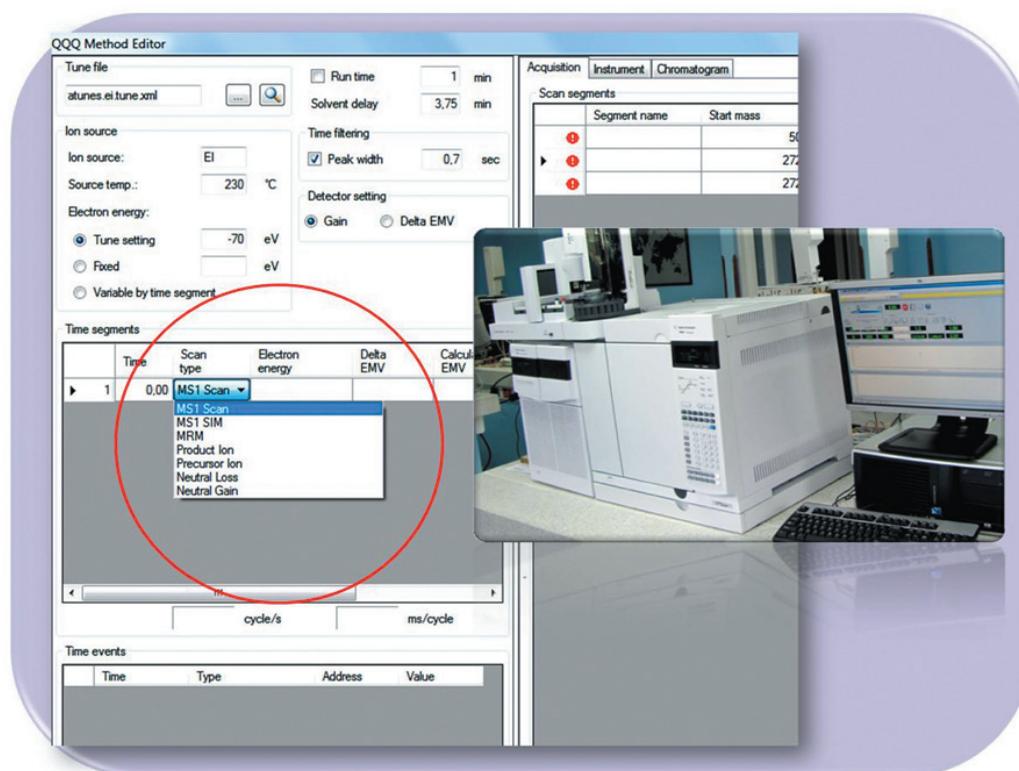


Figura 12. Aspecto general del equipo GC-MS/MS (QQQ) y un fragmento del programa (*software*) que permite editar un método de adquisición de datos (corrientes iónicas); se observan diferentes modos posibles: *full scan*, SIM, monitoreo de iones productos, precursores, pérdida (o ganancia) de fragmentos neutros y de reacciones de transición entre iones precursores e hijos (productos).

El modo SIM se usa ampliamente tanto para el registro de un compuesto de interés en una mezcla compleja (deben coincidir los tiempos de retención de este compuesto y del compuesto-patrón certificado y la relación de abundancias de iones seleccionados en sus respectivos fragmentogramas)^{16,17}, como para su cuantificación sensible; pero también para registrar grupos de compuestos homólogos, monitoreando sus

iones característicos, a saber, para *n*-parafinas: m/z 57, 71, 85; para metil ésteres de ácidos grasos (FAMEs, *Fatty Acid Methyl Esters*, por sus siglas en inglés): el ion en m/z 74; para bencenos alquílicos: m/z 91, 105 y para ftalatos: m/z 149, 167, entre otros analitos de interés.

Barrido de ion-fragmento (*Product ion scan*). Este modo de adquisición consiste en la

selección de un *ion precursor* o un *ion-padre* en el primer analizador o filtro de masas (MS1, Q1), que opera en modo de monitoreo de ion seleccionado, SIM (solo filtrando iones de interés, pre-seleccionados). El ion-padre escogido (m_s^+) por el MS1 (Q1) se dirige luego a la cámara de colisiones activadas (o celda de colisiones), cuyo rol -en el triple cuadrupolo-, lo cumple el segundo cuadrupolo, Q2 o “q”. Se usa a menudo la letra “q” minúscula para diferenciar el segundo “cuadrupolo” -intermedio- de los otros dos, Q1 y Q3, puesto que -en realidad- éste no funciona como un filtro de masas sino como un sistema de transmisión de iones después de su activación acompañada de la fragmentación. El analizador Q2 (q) opera sólo con la radiofrecuencia aplicada (*RF-mode*), que permite transmitir los iones desde Q1 al analizador MS2 (Q3). El gas de colisión, suministrado a la celda (generalmente, He, Ar o N_2), por medio de choques con los iones seleccionados en el MS1 (Q1), les proporciona la energía adicional (proceso de excitación de iones); un potencial aplicado en el Q2 (q) permite acelerar los iones y convertir

parte de su energía cinética en la energía interna *adicional* (rotacional, vibracional y electrónica). El incremento de la energía interna de los iones, *verbigracia*, su “energetización” o “activación”, conduce a su disociación y a la formación de diversos iones-fragmento (iones-producto), que se dirigen luego al segundo analizador o filtro de masas (MS2, Q3). En este analizador, se hace el barrido (*scan*) de los componentes U y V de las corrientes directa y alterna, en el rango de masas (m/z) menores que la masa del ion-padre seleccionado m_s^+ , ya que los iones-producto -evidentemente- pesan menos que sus precursores. En la **Figura 14** aparece una representación esquemática de este modo de operación. Cabe anotar, que en un espectro de masas de iones-producto las señales observadas carecerán de sus acompañantes isotópicos. Este modo de adquisición es quizá el más frecuente y conocido en el sistema de triple cuadrupolo, QqQ, y se utiliza con diversos propósitos y aplicaciones, algunas de las cuales se dan a continuación.

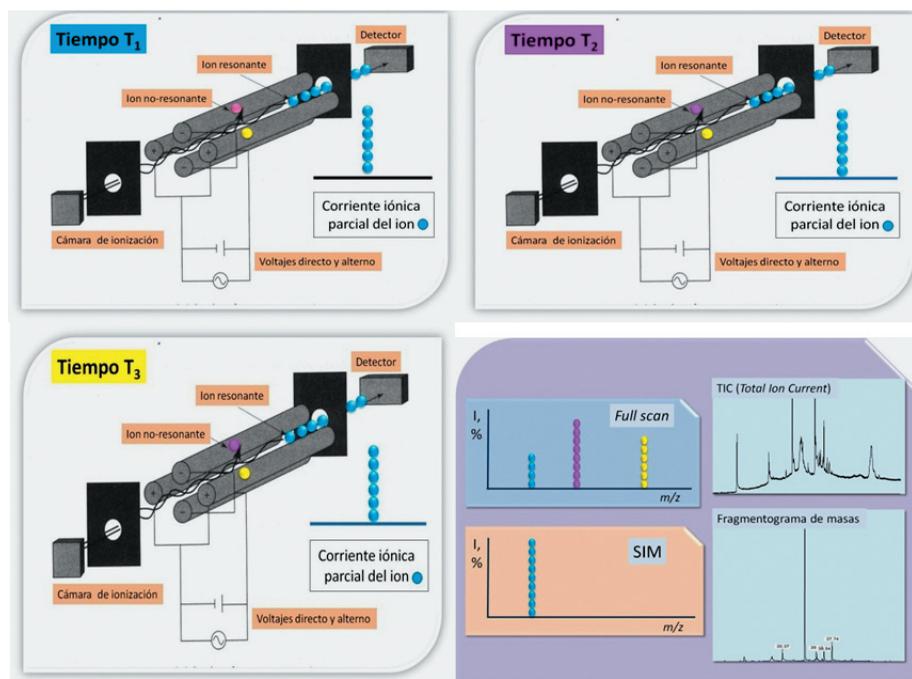


Figura 13. Monitoreo de ion(es) selectivo(s), SIM. El analizador cuadrupolar filtra únicamente un ion o -más a menudo-, varios iones (2-3) pre-seleccionados, típicos o diagnósticos de un analito dado o de un grupo de analitos (sustancias homólogas, *e.g.*, alquil bencenos, *n*-parafinas, alquil acetatos, etc.). El monitoreo en el modo *full scan* (barrido de todos los iones) permite obtener un espectro de masas completo y una corriente iónica reconstruida (cromatogramas), mientras que la adquisición en el modo SIM aumenta la sensibilidad y la selectividad de registro de un analito-*target* en particular y genera un fragmentograma de masas (detección selectiva), que contiene el pico cromatográfico de este analito.

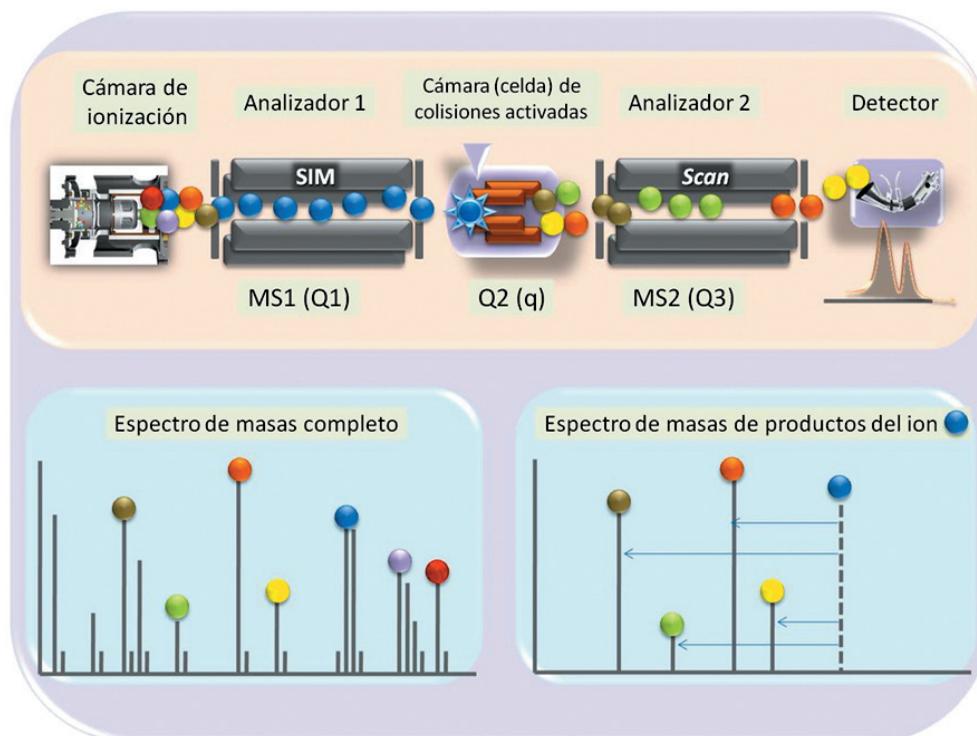


Figura 14. Triple cuadrupolo: modo de operación de registro de iones-producto (*Product ion scan*). En el primer analizador MS1 (Q1), que opera en modo SIM, se filtran los iones de interés, que luego se dirigen a la cámara (celda) de colisiones activadas (Q2 o q) donde se “activan” y se fragmentan; los iones-producto se analizan en el segundo analizador MS2 (Q3) que opera en modo *full scan*, haciendo barrido de masas (m/z) menores que la del ion-precursor.

El sistema QqQ permite llevar a cabo el estudio de *iones metaestables*. Los *iones metaestables* se definen como aquellos que tienen tiempo de vida mayor que el tiempo de su permanencia en la cámara de ionización (ca. $< 10^{-5} - 10^{-6}$ s), pero menor que el necesario para llegar a ser detectados (ca. $< 10^{-4} - 10^{-5}$ s) y aquellos que se disocian después de la salida de la fuente de iones -en su camino hacia el detector- en uno de los espacios sin campo (FFR, *Field-Free Region*, por sus siglas en inglés). Históricamente, fueron llamados como iones metaestables no los iones (precursores) que se disocian fuera de la cámara de ionización, sino sus productos que se registran con una *masa aparente*, así: $m^* = m_2^2/m_1$, donde m_1 es la masa del ion-precursor y m_2 es la del ion-producto. Las masas reales de los iones-producto m_2 formados en la cámara de ionización y generados fuera de ésta son -por supuesto- iguales, pero debido a la pérdida de la energía cinética de los iones-producto que surgen

en el espacio sin campo, éstos se registrarán con una masa aparente, m^* , menor que su masa real, m_2 . En la **Figura 15** se presenta un esquema simplificado de la idea de iones metaestables y su origen.

Los iones metaestables son fundamentales para establecer la conectividad (parentesco) entre los iones en el espectro de masas. Infortunadamente, no en todas las configuraciones de espectrómetros de masas se logra detectar iones metaestables o su intensidad es extremadamente baja. En un sistema simple Q-MS no es posible encontrar la diferencia entre iones normales y metaestables, pero con el sistema QqQ esta diferenciación puede realizarse eficientemente. En el sistema QqQ, en el primer filtro de masas (MS1, Q1) se pueden escoger iones de interés (estables) y activarlos (es decir, desestabilizarlos) en la celda de colisiones activadas (Q2 o q). Los iones-producto (en realidad, mal llamados “metaestables”, m_2) serán analizados en el segundo analizador, MS2 (Q3). Los iones m_1^+ son

seleccionados por Q1, pero no son filtrados por Q3; mientras que los fragmentos m_2^+ se rechazan por el Q1, pero se filtran por Q3. Por ello, solo los iones *disociables* (verdaderos metaestables), m_1^+ , filtrados

por Q1, pero no por Q3, se descompondrán en la celda de colisiones activadas Q2 (q), producirán fragmentos m_2^+ , que se filtrarán por Q3 y se detectarán.

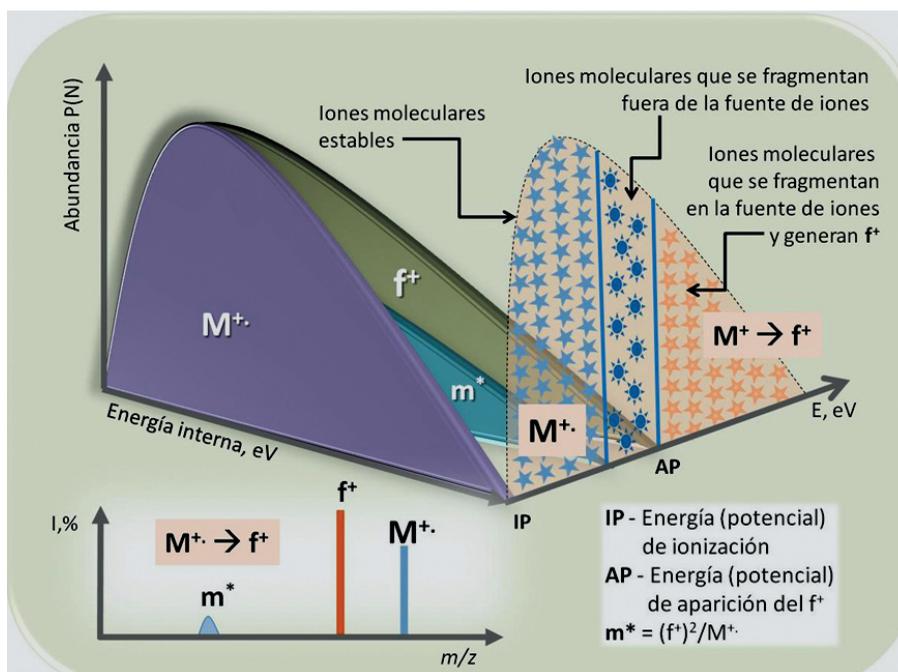


Figura 15. Diferentes iones moleculares (M^+): estables, metaestables y los que se fragmentan en la cámara de ionización. Los iones moleculares que son *estables* (tiempo de vida *ca.* $> 10^{-4}$ s) se registran en los espectros de masas; los iones moleculares *no-estables*, disociables, viven *ca.* $< 10^{-6}$ s y decaen en la cámara de ionización generando fragmentos (f^+), que se registran en el espectro de masas. Los iones moleculares con tiempo de vida mayor de 10^{-6} s, pero menor de 10^{-4} - 10^{-5} s, se fragmentan fuera de la cámara de ionización en el camino hacia el detector y producen iones m^* , con una masa aparente, que se llaman *iones metaestables*. Son iones que permiten establecer la conectividad entre los iones precursores y sus productos.

Realizando este tipo de operaciones, se logra establecer las rutas de fragmentación (patrón de fragmentación) y la relación “genética”, o la conectividad, parentesco, entre los iones. En la celda de colisiones activadas, Q2 (q), el grado de fragmentación de un ion seleccionado por el Q1, dependerá de: (1) la presión en la celda; (2) la naturaleza del gas de colisión (He, Ar, Xe o N_2); (3) la energía cinética del ion; (4) el potencial aplicado (0 – 100 V) y (5) la sección transversal de la reacción. La energía interna adicional, adquirida por un ion seleccionado en el Q1, durante las colisiones activadas en el Q2 (q), será la siguiente:

$$E_o = E_c \times \left(\frac{M_{gas}}{M_{ion} + M_{gas}} \right)$$

E_o - Energía interna del ion, adquirida en la cámara de colisiones activadas, Q2 (q);

E_c - Energía cinética del ion al salir del Q1;

M_{gas} - Masa molecular del gas de colisión;

M_{ion} - Masa del ion.

En el sistema QqQ, las energías cinéticas de los iones no superan 100 eV; a mayor masa del gas de colisión, mayor será la eficiencia de la transferencia de energía (proceso que ocurre en 10^{-14} - 10^{-16} s) y de la fragmentación de iones “activados”. El aumento razonable de la presión ($< 10^{-2}$ mm Hg) en la cámara de colisiones activadas también incrementa la disociación de iones (se aumentan los choques); la eficiencia de disociación crece también cuando el gas de colisión ingresa a la cámara perpendicularmente a la trayectoria de movimiento de los iones que transitan del analizador de masas Q1 al Q3. Existen otros métodos de activación de iones-precursores^{11,12,19}, seleccionados en el MS1, además de las colisiones con moléculas de gases inertes o N_2 . Entre éstos, figuran la fotodisociación (activación con fotones, *Photodissociation*), la activación con electrones (*Electron Excitation*), la colisión con una superficie metálica (SID, *Surface-Induced Dissociation*, por sus siglas en inglés) o la aplicación de un potencial de aceleración (0 – 50 eV), en presencia de un gas de colisión, para incrementar la energía interna de los iones y provocar su fragmentación.

El modo de registro de iones-producto (*Product Ion Scan*) en el sistema QqQ, puede ser usado para el análisis de mezclas complejas o sustancias con impurezas, sin su separación previa en la columna cromatográfica. Si se usa el método de ionización “suave”, por ejemplo, la ionización química de iones positivos, la mezcla de sustancias ionizadas en la fuente de iones, producirá iones moleculares protonados, MH^+ (M_1H^+ , M_2H^+ , M_3H^+ ,... M_iH^+). El primer analizador de masas MS1 (Q1) selecciona uno por uno los iones moleculares protonados, que se dirigen luego a la cámara de colisiones activadas, Q2 (q), donde se disocian; posteriormente, los iones-fragmento que se forman a partir de cada ion MH^+ se separan por el analizador MS2 (Q3) y su espectro se registra. En este caso, el primer analizador (Q1) funciona como una “columna cromatográfica”, el Q2 (q) opera como una “cámara de ionización” y el analizador MS2 (Q3) cumple su papel de analizador de masas, que hace barrido completo de iones. De esta manera, se logra ahorrar el tiempo de separación de la mezcla en una columna cromatográfica y el sistema QqQ enfoca su trabajo en la búsqueda de

determinados compuestos de interés presentes en una mezcla compleja, sin su separación cromatográfica previa. De esta manera, el uso del triple cuadrupolo, QqQ, operado en modo de barrido de iones-fragmento (*Product Ion Scan*), permite hacer el estudio de iones metaestables, establecer rutas (patrón) de fragmentación, aportar información estructural y funcionar como un “sistema cromatográfico” para análisis de componentes de interés en mezclas complejas, sin su separación previa.

Barrido de ion-precursor (*Parent ion scan*). Éste es otro modo de operación de un triple cuadrupolo, QqQ, que permite encontrar en un espectro de masas a todos aquellos iones (precursores) que pueden generar un ion-fragmento (ion-producto) dado. En este caso, el primer cuadrupolo (MS1, Q1) opera en el modo de barrido completo (*scan*), mientras que el tercer cuadrupolo (MS2, Q3) trabaja en el régimen de monitoreo del ion seleccionado (SIM). Este ion seleccionado es el ion-producto (*daughter ion*), cuyos precursores precisamente se buscan. Técnicamente, esto se lleva a cabo así: en el analizador MS2 (Q3) solo se filtran iones-producto, con su masa determinada, mientras que en el primer analizador, MS1 (Q1), se hace el barrido de todos los iones (*scan*) desde la masa superior a la del ion-producto seleccionado; estos iones -saliendo del analizador MS1 (Q1)-, atraviesan la cámara de colisiones activadas, Q2 (q), donde se fragmentan, generando, entre otros, los iones-producto de interés, que se filtran luego por el analizador MS2 (Q3) operado en el modo SIM. En la **Figura 16** se refleja esquemáticamente el funcionamiento del triple cuadrupolo en el modo de barrido de ion-precursor.

Por ejemplo, en una mezcla compleja de 30-40 componentes es de interés detectar solamente los *ftalatos* (plastificantes). En la **Figura 17** aparecen espectros de masas (EI, 70 eV) de algunos ftalatos, donde se puede observar que el ion común, diagnóstico para este grupo de compuestos, se registra en m/z 149. Entonces, por el primer analizador MS1 (Q1), operado en modo *scan*, pasan todos los iones con la relación de masa/carga mayor de m/z 149; el analizador MS2 (Q3) opera en el modo SIM, filtrando sólo iones con m/z 149, que se forman en la cámara de colisiones activadas cuando a ésta ingresan los

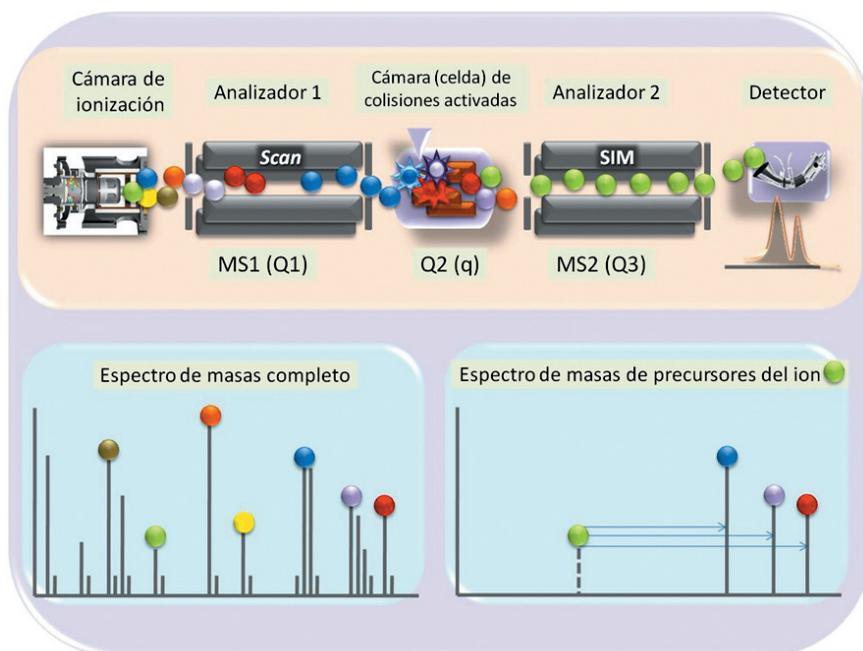


Figura 16. Triple cuadrupolo: modo de operación de registro de iones-precusores (*Parent ion scan*). El primer analizador MS1 (Q1) opera en modo *full scan*, dejando pasar los iones con masas mayores que el ion-producto de interés; estos iones luego se dirigen a la cámara (celda) de colisiones activadas (Q2 o q) donde se “activan” (más bien se desestabilizan) y se fragmentan; entre los iones-fragmento aparecerá el ion-producto de interés, éste pasará selectivamente el segundo analizador de masas MS2 (Q3), operado en modo SIM; de esta manera, se logra establecer cuáles son los iones (precursores) que puedan producir el fragmento de interés.

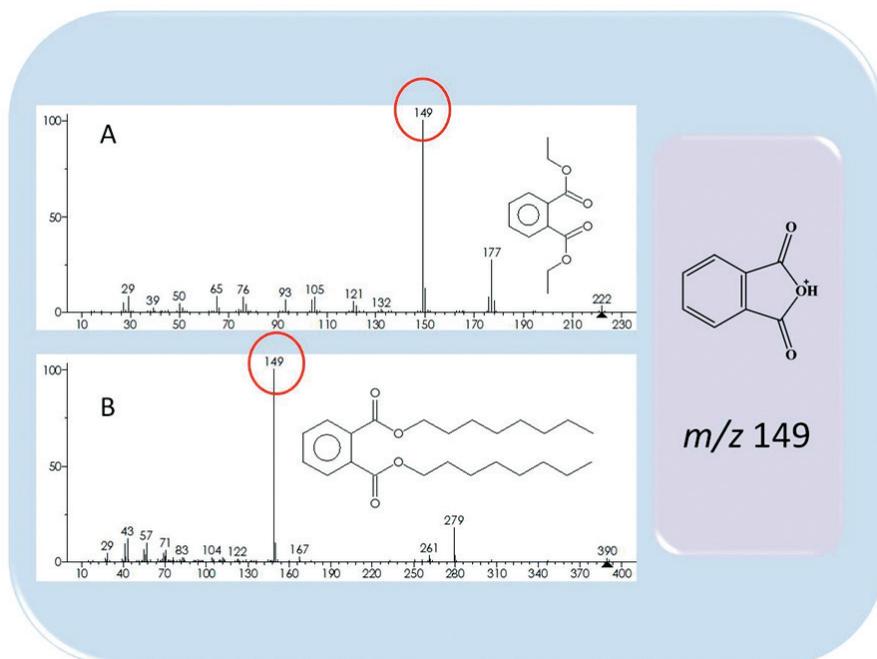


Figura 17. Espectro de masas (EI, 70 eV) de: **A.** Dietil ftalato. **B.** Dioctil ftalato. En los espectros de masas de los ftalatos se observa el ion característico en m/z 149 (diagnóstico de esta familia de compuestos) que puede servir para su detección selectiva en sistemas GC-MS-SIM o MS/MS (por ejemplo, QQQ operado en el modo de *parent ion scan*).

iones-precusores de ftalatos. En el fragmentograma de masas, finalmente, solo se registrarán los picos cromatográficos correspondiente a los ftalatos; de esta manera, el analizador de masas, QqQ, operado en modo de barrido de iones precursores se convierte en un analizador cromatográfico *selectivo*.

Barrido de fragmento neutro (*Constant neutral loss scan*). Es otro modo de operación del triple cuadrupolo, QqQ. Para ello, ambos analizadores de masas, MS1 (Q1) y MS2 (Q2) operan en modo de barrido (*scan*) simultáneo, enlazado (*linked*); sin embargo, el barrido de masas en MS1 (Q1) y MS2 (Q2) se hace para iones con una diferencia (desplazamiento) fija correspondiente a la masa de

un fragmento neutro seleccionado. Si los iones f_1 , f_2 , f_3 , f_1 , etc., pasan por el primer analizador MS1 (Q1) y luego atraviesan la cámara de colisiones activadas, Q2 (q), y experimentan fragmentaciones, por el analizador MS2 (Q3) solo pasarán aquellos iones con la diferencia másica Δm preestablecida, fija, es decir, $(f_1 - \Delta m)$, $(f_2 - \Delta m)$, $(f_3 - \Delta m)$, $(f_1 - \Delta m)$, etc. Por ejemplo, si el primer analizador MS1 (Q1) pasa iones 80, 81, 82, ..., el segundo, MS2 (Q3) filtrará los fragmentos con masas 52, 53, 54, ..., conservando la diferencia másica (Δm), en el barrido enlazado de 28 unidades. En la **Figura 18** aparece el esquema de funcionamiento del triple cuadrupolo operado en modo de barrido de fragmento neutro.

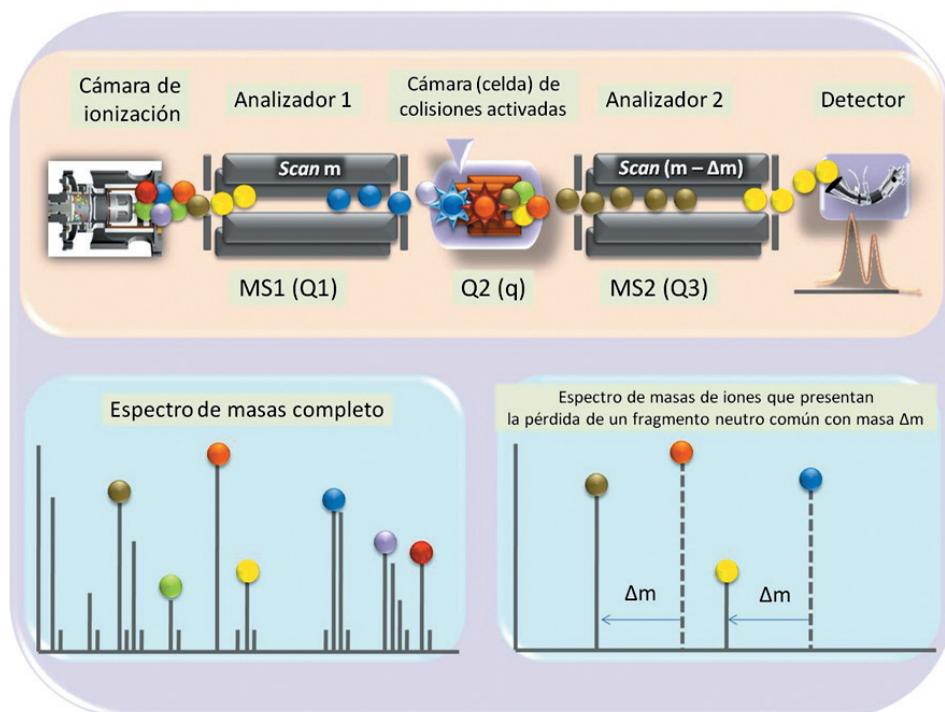


Figura 18. Triple cuadrupolo: modo de operación de registro de iones con pérdidas de fragmentos neutros de masa constante, preestablecida (*Constant neutral loss scan*). El primer analizador MS1 (Q1) opera en modo *full scan*, dejando pasar los iones a la cámara (celda) de colisiones activadas (Q2 o q) donde éstos se “activan” y se fragmentan; los iones-producto se analizan en el segundo analizador MS2 (Q3), también operado en modo *full scan*, pero los barridos en el Q1 y Q2 se hacen de forma enlazada (*linked*), de tal manera que mientras el primer analizador MS1 (Q1) deja pasar los iones con masas m_0 , el segundo analizador MS2 (Q3) hace el barrido de fragmentos con masas $(m_0 - \Delta m)$. Como resultado final, se registran todos los iones que se disocian con la pérdida de un fragmento neutro (Δm) de masa predeterminada.

Por ejemplo, en una mezcla compleja, se puede selectivamente registrar la presencia de

derivados del ácido acético (ésteres), *verbigracia*, acetatos de alquilo, CH_3COOR ; ya que durante

la fragmentación de sus iones moleculares M^+ , se observa la pérdida de 60 unidades de masa ($M - CH_3COOH$)⁺. En el fragmentograma de masas, obtenido por el QqQ operado en modo de barrido de fragmento neutro, se observarán solo aquellos picos cromatográficos en cuyos espectros de masas (EI, 70 eV) se observan pérdidas de fragmentos neutros de 60 unidades másicas, proceso característico de la ionización disociativa de los acetatos de alquilo. Otro ejemplo es el análisis de una mezcla compleja que contiene ácidos carboxílicos. En sus espectros de masas, obtenidos por ionización química de iones negativos, NICI (*Negative Ion Chemical Ionization*, por sus siglas en inglés), se registran iones moleculares desprotonados (M-H), *i.e.*, aniones-acetatos, que decaen eliminando 44 unidades de masa ($-CO_2$), proceso típico de su fragmentación por NICI. Luego, haciendo el barrido enlazado de iones en los analizadores MS1 y MS2 con diferencia másica de 44 unidades, en una mezcla compleja se pueden registrar selectivamente los ácidos carboxílicos.

Monitoreo de reacción múltiple (*Multiple reaction monitoring*). Este es uno de los métodos de adquisición de las corrientes iónicas más interesante, emblemático, *sui generis* del triple cuadrupolo, ya que permite -explorando y usando correctamente sus ventajas-, convertirlo en un detector de masas de GC (o LC) *específico*, altamente selectivo y sensible. Infortunadamente, cuando la adquisición de la corriente iónica se hace en el modo SIM, la probabilidad de que el ion seleccionado y una señal procedente del fondo (ruido químico) coincidan, no es nula; ello, baja no sólo la sensibilidad sino la confiabilidad de la detección (pueden presentarse falsos positivos o falsos negativos). Para evitar estos problemas, en vez de monitorear iones característicos, se registran las transiciones (o reacciones de transición) entre los pares de iones (precursor y producto). En el primer analizador MS1 (Q1) se filtran iones precursores seleccionados F_1 (operación en modo SIM), mientras que en el segundo analizador MS2 (Q3) se dejan pasar solo iones-producto F_2 de la transición o reacción de disociación $F_1 \rightarrow F_2$ (el analizador MSD2 o Q3 opera en modo SIM) (**Figura 19**). Ambos iones, F_1 y F_2 , deben ser estables y, por lo general, abundantes

en el espectro de masas del analito. El monitoreo de la reacción de transición de iones precursor e hijo (ion-producto), anula casi completamente la probabilidad de coincidencias de señales del analito con los del fondo (*Chemical Background*) y, además, eleva el valor de S/N. Típicamente, el registro de dos transiciones independientes, junto con la retención cromatográfica (t_R), permiten confirmar inequívocamente la ocurrencia de un analito-*target* en una mezcla compleja.

En la **Figura 20** aparecen corrientes iónicas registradas en los modos *full scan*, SIM y MRM de un extracto vegetal que contiene trazas de diazinón (insecticida organofosforado), cuyo espectro de masas (EI, 70 eV) también se muestra. Como se puede observar, el registro de diazinón más sensible, específico y con mayor relación de S/N se logra en el modo de adquisición MRM. El ruido químico es prácticamente suprimido (línea base nítida) (**Figura 20, C**), ya que es difícil encontrar y registrar las coincidencias en las reacciones de transición específicas de iones-precursor e iones-producto de una sustancia de interés (analito, en este caso diazinón) y de una interferencia, contaminación presente en la muestra (extracto vegetal) o sangrado de la columna.

El uso del triple cuadrupolo -operado en modo MRM-, es de particular importancia para el análisis de compuestos (analitos-*target*) presentes a nivel traza en matrices (extractos) muy contaminadas, complejas, con muchas interferencias, por ejemplo, cuando se hace el análisis de residuos de pesticidas en alimentos, vegetales o muestras biológicas o ambientales²⁵⁻²⁸. Otra aplicación importante es el análisis de biomarcadores en petróleo²⁹. En la **Tabla 2** se dan unos ejemplos de reacciones de transición (MRM) para algunos analitos específicos (pesticidas y biomarcadores).

5 Conclusiones

El detector selectivo de masas (MSD) en conjunto con sistemas cromatográficos (GC o LC) funciona no solamente como un sistema de detección que permite registrar y cuantificar analitos en una

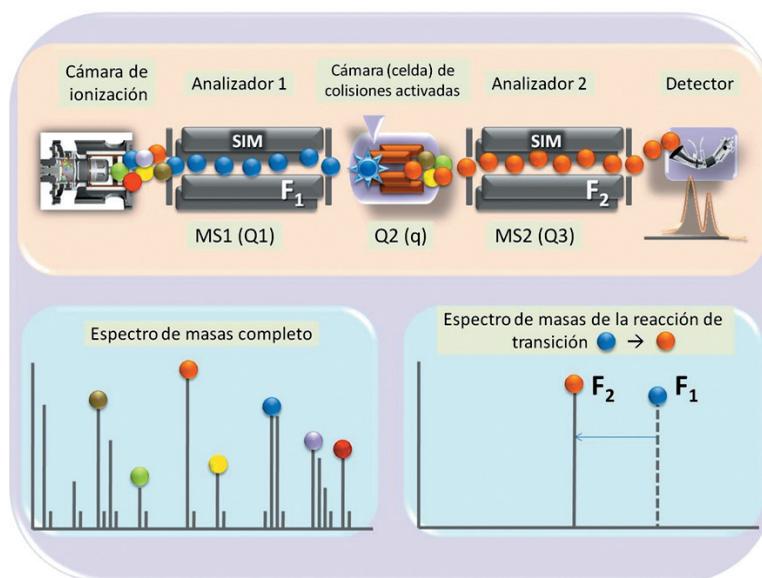


Figura 19. Triple cuadrupolo: modo de operación de monitoreo de reacciones múltiples (MRM, *Multiple reaction monitoring*). Ambos analizadores de masas MS1 (Q1) y MS2 (Q3) operan en el modo SIM. El primero, filtra iones-precusores (F_1) y el segundo, iones-productos (F_2), correspondientes a una reacción de transición $F_1 \rightarrow F_2$. Debe existir la conectividad (parentesco) entre ambos iones y estos dos deben ser estables (*verbigracia*, en el espectro de masas obtenido en el modo *full scan* exhibir señales intensas). El monitoreo a la vez de ambos iones parientes permite aumentar la especificidad del análisis, ya que la coincidencia de una (o dos) reacción(es) de transición entre los iones, precursores y productos, de un analito-*target* con la misma reacción de transición de una impureza, interferencia, contaminación o la señal de *background*, es prácticamente imposible. Esto evita los falsos positivos y los falsos negativos en el análisis y lo hace muy sensible gracias al aumento de la selectividad. El QQQ (QqQ) en este modo actúa como un detector cromatográfico *específico*.

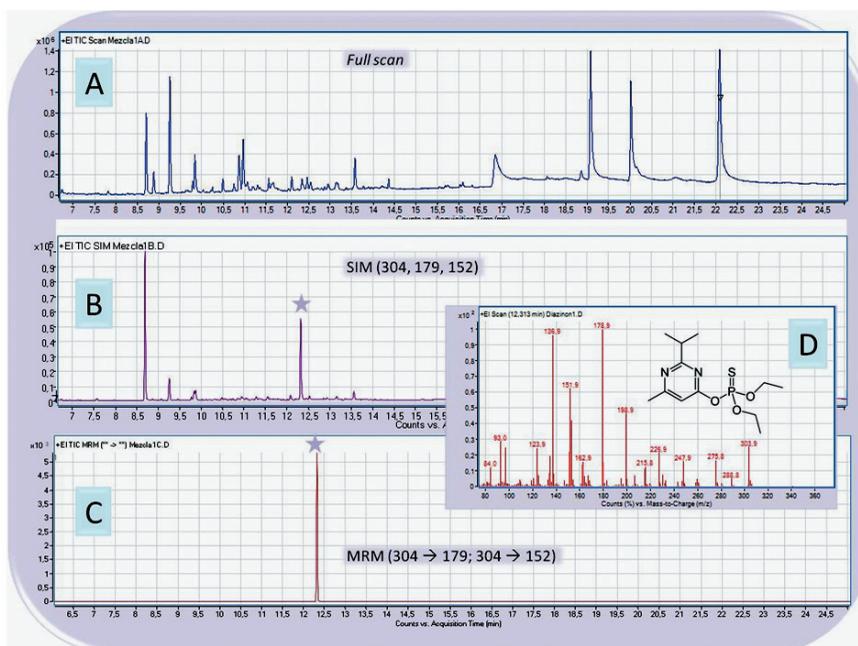


Figura 20. Corrientes iónicas reconstruidas de un extracto vegetal que contiene trazas de diazinón (insecticida), obtenidas por GC-MS/MS (QQQ) operado en tres diferentes modos, a saber: **A.** *Full scan*; **B.** SIM (Monitoreo de iones característicos en m/z 152, 179 y 304); **C.** MRM (Monitoreo de las dos reacciones de transición independientes entre iones-precusores e iones-productos, $304 \rightarrow 152$ y $304 \rightarrow 179$); **D.** Espectro de masas (EI, 70 eV, *full scan*) de diazinón. Se observa una altísima especificidad de detección de diazinón en el extracto vegetal cuando éste se analiza por GC/MS/MS (QQQ) en modo MRM.

Tabla 2. Monitoreo de reacciones de transición específicas para el análisis por GC-MS/MS (QQQ) en modo MRM de algunos pesticidas y biomarcadores en petróleo.

Compuesto (analito-target)	Reacción de transición (MRM, EI)
Pesticidas	
Heptaclor	272 → 237; 274 → 239
Metoxiclor	227 → 169; 227 → 141
Clorfenvinfos	267 → 159; 323 → 267
Biomarcadores	
C ₂₀ Terpano tricíclico	276 → 191
C ₂₇ Terpano tricíclico	374 → 191
C ₂₈ Terpano tricíclico	388 → 191
C ₂₆ Esterano	358 → 217
C ₂₇ Esterano	372 → 217
C ₂₈ Esterano	386 → 217
C ₂₉ Esterano	400 → 217
C ₃₀ Esterano	414 → 217

mezcla compleja, sino resulta ser una herramienta espectral fina para obtener un vestigio estructural fidedigno que permite elucidar la naturaleza química de la sustancia. El MSD puede funcionar, según el modo de adquisición de corriente iónica, como un detector **universal** (modo *full scan*), un detector **selectivo** (modo SIM) y como un sistema de detección altamente selectivo y sensible, *vis.*, **específico**. El detector de masas se convierte en un sistema de detección **específica** cuando opera en una configuración multidimensional, tándem, MS/MS (“masas-masas”) o (MS)ⁿ. Entre los sistemas de detección de masas tándem, polifuncionales, relativamente fáciles de operar y de costo comparativamente bajo (precio en el mercado, mantenimiento, facilidad de manejo, etc.), figura el **triple cuadrupolo**, QQQ o QqQ, que es un espectrómetro o detector de masas que posee tres analizadores cuadrupolares, y que puede operar como un sistema de detección de cromatografía de gases o cromatografía líquida, en regímenes *universal*, *selectivo* o *específico*, según el modo de adquisición de la corriente iónica, producida durante la ionización y la fragmentación de moléculas del analito-target. Sus diversas aplicaciones en múltiples áreas de

investigación, por ejemplo, en el análisis ambiental, estudio de drogas y sus metabolitos, análisis de residuos de plaguicidas, para detectar compuestos en trazas en alimentos y muestras biológicas, en el análisis toxicológico y de biomarcadores en petróleo, figuran entre otros muchos usos analíticos. La configuración tándem permite facilitar la elucidación de estructuras químicas, determinar los mecanismos de fragmentación de las moléculas ionizadas y la composición elemental de iones-fragmento y su conectividad con los iones precursores, estudiar reacciones ion-moleculares y determinar diferentes parámetros cinéticos y termodinámicos y, sobre todo, de mayor aplicación hoy en día, realizar un análisis extremadamente selectivo (específico) y sensible (a nivel de *ppt*) de mezclas sumamente complejas, biológicas, ambientales, de alimentos o extractos naturales, entre otros.



6 Agradecimientos

Los autores agradecen el soporte financiero de la Agencia Nacional de Hidrocarburos (ANH, Bogotá, Colombia) y el respaldo técnico de Khymós S.A.

7 Referencias Bibliográficas

1. W. McFadden, Techniques of combined gas chromatography/mass spectrometry. Robert E. Krieger Publishing Company, Malabar, Florida, EE.UU., 1988, 463p.
2. F. W. Karasek, R. E. Clement, Basic gas chromatography-mass spectrometry, Elsevier, Amsterdam, 1988, 201p.
3. G. M. Message, Practical aspects of gas chromatography/mass spectrometry. John Wiley and Sons, New York, 1984, 351 p.
4. L. Esteban, La espectrometría de masas en imágenes. ACK Editores, Madrid, 1993, 267p.
5. D. Rood, A practical guide to the care, maintenance, and troubleshooting of capillary gas chromatographic systems, Wiley-VCH, Weinheim, 1999, 323p.
6. M. Oehme, Practical introduction to GC-MS analysis with quadrupoles. Huthig Verlag, Heidelberg, 1998, 195p.
7. F. G. Kitson, B. Larsen, C. N. McEwen, Gas chromatography and mass spectrometry, A practical guide, Academic Press, San Diego, 1996, 381p.
8. H.-J. Hübschmann, Handbook of GC/MS, 2a Ed. Wiley-VCH, Weinheim, 2009, 719p.
9. J. H. Gross. Mass spectrometry: a textbook. Springer, Heidelberg, 2004, 518 p.
10. R. A. W. Johnstone, M. E. Rose, Mass spectrometry for chemists and biochemists. Cambridge University Press, 1996, 501p.
11. C. G. Herbert, R. A. W. Johnstone, Mass spectrometry basics. CRC Press, Boca Raton, Florida, EE. UU. 2003, 474p.
12. E. de Hoffmann, V. Stroobant, Mass spectrometry. Principles and applications. Wiley, New York, 1999, 407p.
13. R. P. W. Scott, Tandem techniques. John Wiley and Sons, New York, 1997, 526p.
14. W. L. Budde, Analytical mass spectrometry. Strategies for environmental and related applications. American Chemical Society, Washington, D.C. 2001, 386p.
15. F. W. McLafferty, F. Tureček. Interpretation of mass spectra. University Science Books, New York, 1993, 371 p.
16. E. Stashenko, J. R. Martínez, *Scientia Chromatographica*, 2(1), 29 (2010).
17. E. Stashenko, J. R. Martínez, *Scientia Chromatographica*, 2(3), 33 (2010).
18. A. T. Lebedev, Espectrometría de masas en química orgánica. Binom, Moscú, Rusia, 2003, 493p. (ISBN 5-94774-052-4).
19. R. Ekman, J. Silberring, A. M. Westman-Brinkmalm, A. Kraj, Mass spectrometry. Instrumentation, interpretation, and applications. Wiley, New York, 2009, 371p.
20. E. Stashenko, J.R. Martínez, *Scientia Chromatographica*, 1(2), 23 (2009).
21. E. E. McLafferty, Tandem mass spectrometry, Wiley, New York, 1983, 254p.
22. R. A. Yost, MS-MS: Tandem mass spectrometry. *Spectra* 9(4), 3 (1983).
23. J. V. Johnson, R. A. Yost, P- E. Kelley, D. Bradford, *Anal. Chem.* 62, 2162 (1990).
24. H. Kaiser, *Spectrochim. Acta B*, 33b, 551 (1978).
25. E. Pitarch, C. Medina, T. Portolés, F. J. López, F. Hernández, *Anal. Chim. Acta*, 583, 246 (2007).
26. P. Plaza, A. Garrido, J. L. Martínez, *J. Chromatogr. A*, 1167, 9 (2007).
27. S. Walorczyk, B. Gnusowski, *J. Chromatogr. A*, 1128, 236 (2006).
28. A. Garrido, M. J. González, F. Arrebola, J. L. Martínez, *Anal. Chem.*, 77, 4640 (2005).
29. K. Peters, C. Waters, M. Moldowan, The biomarker guide, Vol. 1. Cambridge University Press, Cambridge, 2005, 471p.