Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo, v. 24, n. 1, 31-35, 2005. © 2005

UM ESPECTRÔMETRO DE MASSA POR TEMPO DE VÔO COM "REFLECTRON"

E.L.A.Macchione; K.Koide; J.H.Hirata; B.R.Lenzi; J.A.M.Pereira; S.Salem Vasconcelos*; O.Dietzsch
Universidade de São Paulo, Departamento de Física Geral, Laboratório de Instrumentação e Partículas, 05315-970, São Paulo, SP

Recebido: 3 de agosto de 2004; Revisado: 21 de dezembro de 2004

Palavras-chave: espectrometria de massa, tempo de vôo, espelho eletrostático.

RESUMO

São apresentados os resultados de testes de um espectrômetro de massa por tempo de vôo contendo um espelho eletrostático ("Reflectron"), que foi projetado e construído no Laboratório de Instrumentação e Partículas do Instituto de Física da USP. Medidas utilizando o sal iodeto de césio (CsI) e o fulereno (C_{60}) permitiram determinar as características do equipamento.

ABSTRACT

This work shows results obtained by a time of flight mass spectrometer using an electrostatic mirror ("Reflectron"), that was projected and built at the Laboratório de Instrumentação e Partículas do Instituto de Física da USP. Samples of cesium iodine (CsI) and the fulerene (C_{60}) were used to obtain the characteristics of the mass spectrometer.

1. INTRODUÇÃO

A construção de espectrômetros de massa por tempo de vôo no Laboratório de Instrumentação e Partículas da USP tem possibilitado o desenvolvimento da instrumentação associada a estes equipamentos e a análise de substâncias não voláteis, resultando na realização de trabalhos multidisciplinares com grupos de pesquisa ligados a áreas como Química e Bioquímica [1- 4].

Recentemente, foi instalado em uma das máquinas deste laboratório um espelho eletrostático de dois estágios com o objetivo de melhorar a resolução deste equipamento. O espelho eletrostático possibilita que um conjunto de íons com mesma razão m/q, mas apresentado uma distribuição de velocidades iniciais, seja focado temporalmente sobre a região de detecção. Este dispositivo foi idealizado por Mamyrin [5] e permitiu uma melhora significativa na resolução em massa de espectrômetros de tempo de vôo, os quais, associados com técnicas de produção de íons de moléculas como MALDI ("Matrix Assisted Laser Desorption Ionization") e Electrospray, provocaram uma revolução nas análises de biomoléculas tornando-se uma das ferramentas indispensáveis na área da proteômica [6]. Além de corrigir os efeitos da distribuição das velocidades iniciais dos íons, o espelho eletrostático também possibilita o estudo de íons metaestáveis que decaem em vôo, os quais podem traduzir informações estruturais sobre as moléculas analisadas. Este tipo de estudo, conhecido como Post Source Decay (PSD), vem sendo utilizado para decifrar o seqüenciamento de cadeias peptídicas em espectrômetros baseados na técnica MALDI [7]. O alargamento dos picos correspondentes aos íons moleculares estáveis, devido a fragmentação metaestável, também é eliminado pela ação de um espelho eletrostático [8].

2. DESCRIÇÃO DO EQUIPAMENTO

As Figuras 1 e 2 apresentam a montagem do equipamento e uma vista em corte do espectrômetro construído, respectivamente. Sua câmara, feita de aço inox 304, possui flanges com guarnições metálicas padrão CONFLAT. Um sistema de bombeamento, constituído por uma bomba turbomolecular (440l/s) associada a uma bomba mecânica de duplo estágio ($16m^3/h$) (PT 361 kit, Leybolt Vakuum GmbH, Alemanha), permite operar o equipamento a pressões da ordem de 10^{-7}torr. O sistema possui uma pré-câmara usada para introdução de amostras sem a necessidade da quebra do vácuo da câmara principal. O porta-amostras no interior da câmara pode ser movimentado por meio de parafusos micrométricos, associados a foles metálicos nas direções X e Y, permitindo varrer uma superfície de $(15x15)mm^2$.

O "reflectron" é construído por uma sucessão de anéis cerâmicos e metálicos terminados também por flanges com guarnições metálicas feitas, neste caso, de anéis de alumínio com 0,5 mm de diâmetro que são esmagados entre ressaltos nelas existentes. Sua rigidez e estanqueidade são suficientes para que o corpo do próprio "reflectron" seja usado como parte da câmara de vácuo. Os anéis metálicos servem de passadores elétricos, onde são aplicadas as tensões de polarização do "reflectron". Internamente, encontram-se instaladas três grades de Ni com 90% de transmissão (Buckbee Meals – EUA), que definem duas regiões de aceleração (dois estágios) para os íons.

A formação de íons ocorre pela incidência de pulsos de laser de nitrogênio (337nm) sobre a amostra a um ângulo de 45°. O pulso do laser possui uma energia de 120μJ, dura 3 ns (Laser Science, Inc., EUA) e tem freqüência variável entre 1 e 20 Hz. O feixe do laser é focalizado sobre a amostra por meio de uma lente de quartzo de comprimento focal de 10cm (Optovac, Brasil) instalada no interior da câmara de vácuo. Um sistema de manipulação permite ajustar a posição angular e a distância da lente, o que possibilita focalizar o feixe sobre a amostra sem a quebra de vácuo da câmara principal. Um sistema de visualização utilizando uma câmera CCD auxilia a observação da superfície da amostra na região onde o feixe de laser incide.

Os íons formados são acelerados para o interior do tubo de vôo por uma diferença de tensão aplicada entre a amostra e

* suzana@fge.if.usp.br

uma grade de aceleração posicionada a 5mm da superfície da amostra. No interior do tubo de vôo, próximo à grade de aceleração, encontram-se uma lente Eizel e uma placa defletora usadas para aumentar a transmissão dos íons na região do tubo de vôo.

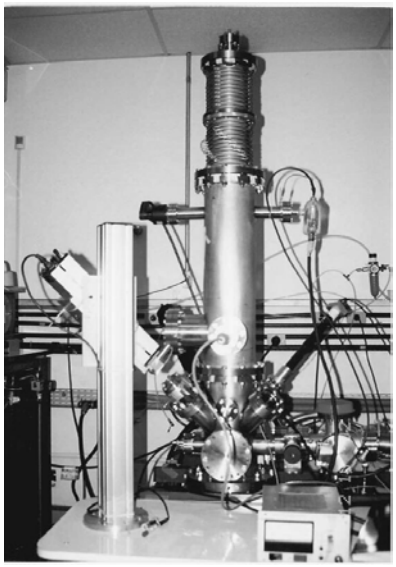

Figura 1 – Espectrômetro de massa por tempo de vôo com espelho eletrostático montado.

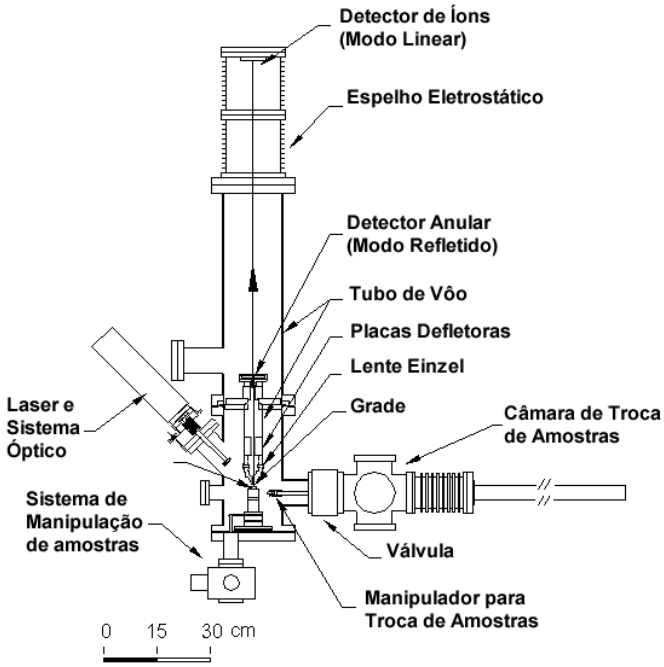

Figura 2 – Vista em corte do espectrômetro de massa mostrando detalhes internos do equipamento.

O equipamento pode operar no modo direto, sem o uso do espelho eletrostático, onde os íons percorrem uma distância de 1,0m, ou no modo refletido, perfazendo um vôo com 1,8m de comprimento. No primeiro caso, um detector posicionado na tampa superior permite a medida dos íons e no modo refletido é usado um detector anular com orifício de 6 mm de diâmetro que permite a passagem dos íons da região da fonte para o interior do tubo de vôo, como indicado na Figura 2.

3. SISTEMAS DE DETECÇÃO E AQUISIÇÃO

Os detectores utilizados no espectrômetro são multiplicadores de elétrons, sendo que o usado no modo direto é um multiplicador feito de microesferas com 6 cm^2 de área útil (*microsphere plates* – MSP, El-Mul, Israel) e no modo refletido uma placa de micro-canais de 12 cm^2 de área útil (*microchannel plates* – MCP, Burle, EUA). Ambos funcionam com o princípio de que os íons, ao colidirem com a superfície dos detectores, produzem elétrons secundários que são acelerados e colidem nas superfícies internas desses dispositivos. Essas colisões geram novos elétrons secundários, cujo resultado final é um processo de avalanche que produz um ganho de 10^6 a 10^7 elétrons por íon incidente [9, 10]. As tensões de polarização usadas são de +3400V para o MSP e +2400V para o MCP anular. Os elétrons formados nos multiplicadores são coletados em anodos e formam um sinal elétrico que é enviado para as subseqüentes etapas do sistema de aquisição.

A Figura 3 apresenta um esquema do sistema de aquisição utilizado no espectrômetro de massa. Os sinais provenientes dos dois detectores são enviados por meio de capacitores de desacoplamento até pré-amplificadores rápidos (VT120, ORTEC, EUA).

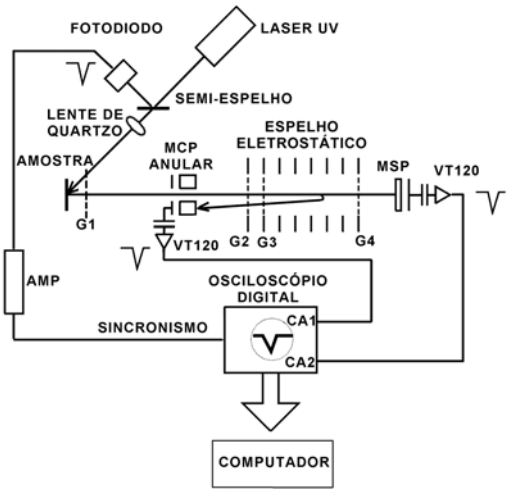

Figura 3 – Esquema do sistema de aquisição usado com o espectrômetro de massa.

A medida do tempo de vôo é realizada através de um osciloscópio digital com largura de banda de 1,5 GHz e taxa de amostragem máxima de 8GSa/s (Hewllet Packard, modelo 54845A, EUA). O disparo do osciloscópio é dado por um sinal proveniente de um fotodiodo que detecta uma fração do pulso do laser desviado por um semi-espelho. A seqüência de pulsos gerados pelos sucessivos íons, em outras palavras o espectro de tempo de vôo, é amostrada e armazenada na memória do osciloscópio para posteriormente ser transferida a um microcomputador. A cada pulso do laser o osci-

loscópio registra a forma do sinal fazendo uma média com os sinais medidos anteriormente.

4. RESULTADOS

Para testar o sistema formado pelo espectrômetro mais o espelho eletrostático foi utilizada uma amostra do sal CsI evaporada sobre um substrato polido de alumínio, cuja espessura era de aproximadamente 4000 Å. Após a formação dos íons pela incidência de fótons do laser, estes foram acelerados com uma diferença de potencial de +12kV, fazendo com que os íons de Cs_2I^+ (m=392,7u), por exemplo, atravessassem o tubo de vôo, no modo direto, em aproximadamente 15,3μs. A Figura 4 apresenta a forma de pulso média, obtida para íons de Cs_2I^+, capturados pelo osciloscópio digital a uma taxa de amostragem de 2GSa/s após 200 pulsos de laser. A largura à meia altura dessa distribuição é de 8,5ns, o que fornece uma resolução em massa (R = M/ΔM) para o sistema da ordem de 900.

Utilizando o espelho eletrostático polarizado a um potencial de +14kV, o tempo de vôo dos íons Cs_2I^+ no espectrômetro é aproximadamente igual a 26,1 μs. Nesta configuração, com a taxa de amostragem do osciloscópio também de 2GSa/s, os valores aproximados da largura do sinal à meia altura e da razão R = M/ΔM passam a ser, respectivamente, 5,5 ns e 2300, como indicado na Figura 5.

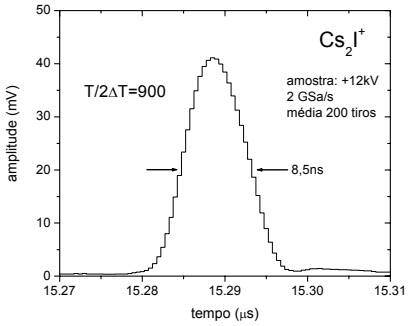

Figura 4 - Sinal formado pela média de 200 pulsos gerados por íons Cs_2I^+ com o espectrômetro no modo direto.

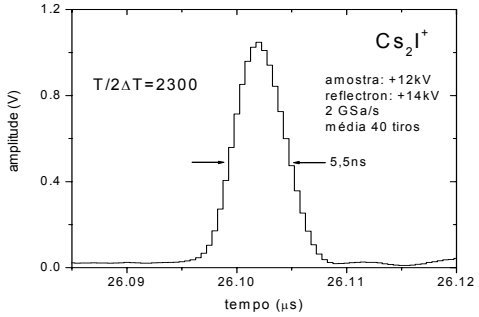

Figura 5 - Sinal formado pela média de 40 pulsos gerados por íons Cs_2I^+ no modo refletido.

Também foi utilizada uma amostra de C_{60} (m=720u) em medidas com o espectrômetro de massa. Uma solução saturada do material dissolvida em tolueno foi gotejada sobre um substrato de alumínio e deixada secar. As medidas foram realizadas com a amostra polarizada em -15kV e com o espelho eletrostático operando com -16 kV. No modo direto, os íons de C_{60} propagam-se pelo tubo de vôo em aproximadamente 18,5μs, e, no refletido, em 33,1μs. Os espectros correspondentes são apresentados nas Figuras 6, para o modo direto, e 7, para o modo refletido.

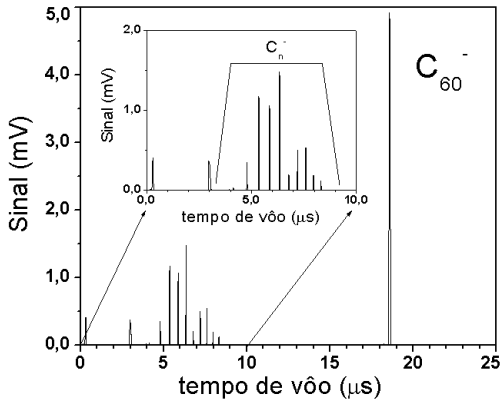

Figura 6 - Espectro de íons C_{60}^- no modo direto. Os picos correspondentes aos aglomerados C_n^- estão em destaque.

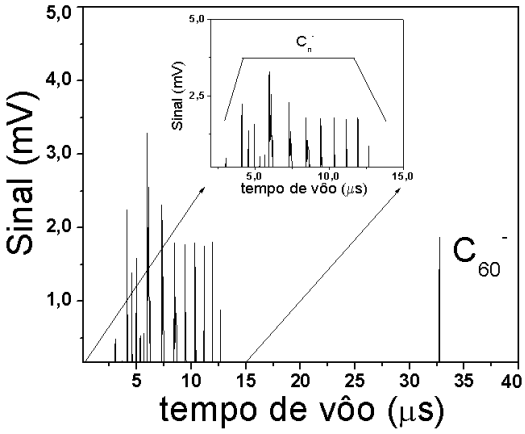

Figura 7 - Espectro de íons C_{60}^- no modo refletido. Os picos correspondentes aos aglomerados C_n^- estão em destaque.

Os valores de resolução, R, dos picos correspondentes aos aglomerados C_n^- foram calculados para cada caso e os resultados aparecem na Tabela I e na Figura 8. Percebe-se claramente o incremento na resolução do instrumento no modo refletido para todos os íons analisados. A variação de 1 ordem de grandeza na resolução para o pico correspondente ao C_{60} nos modos direto e refletido (Tabela I) é a principal evidência para a existência de uma fração de íons metaestáveis da molécula de C_{60} que se dissociam em vôo. Uma análise comparativa dos espectros obtidos no modo direto (Figura 6) e no modo refletido (Figura 7) mostra que as intensidades relativas dos sinais correspondentes aos íons C_{60}^- e C_n^- apresentam comportamentos diferentes: no modo direto o sinal dos íons C_{60}^- tem intensidade maior que os sinais dos íons C_n^- e no modo refletido ocorre o inverso. Este resultado sugere que a incidência do laser na amostra provoca a emissão de íons C_{60}^- metaestáveis. Indica ainda a possível

fragmentação de íons C_{60}^- em vôo pois as moléculas intactas e os fragmentos moleculares teriam o mesmo tempo de vôo no modo direto e tempos distintos no modo refletido.
Além disso, a oscilação em torno da reta na Figura 8 também pode ser considerada como resultado da fragmentação metaestável. Pode-se ver nesta figura que existe uma sistemática na oscilação dos pontos experimentais. Esta sistemática pode ser entendida considerando que a energia liberada na quebra varia para cada tipo de fragmento.

Tabela I - Valores experimentais da resolução para diferentes aglomerados de carbono nos modos direto e refletido.

n	R_{direto}	$R_{refletido}$
4	121	362
5	139	437
6	148	478
7	152	468
8	190	472
9	190	445
10	215	489
11	264	527
12	258	480
60	143	1700

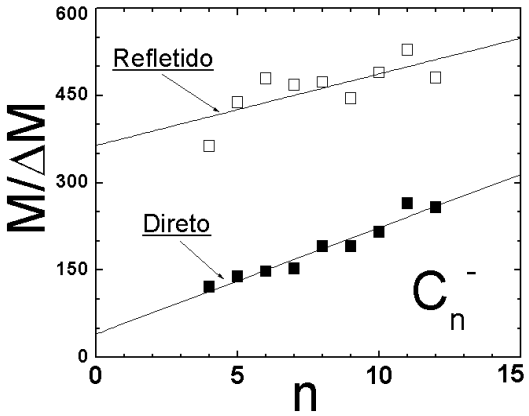

Figura 8 – Valores da resolução para os aglomerados C_n^- nos modos direto e refletido. As retas foram aplicadas para guiar a visão.

As Figuras 9 e 10 apresentam os resultados das medidas para íons positivos de C_{60}. Observa-se que no modo refletido é possível separar os sinais relativos à distribuição isotópica do carbono. Assim como no caso dos íons negativos, a resolução para esta faixa de massa é de aproximadamente 1700.

5. CONCLUSÕES

O espelho eletrostático instalado no espectrômetro de massa por tempo de vôo possibilitou a melhora da resolução do equipamento, como evidenciado em medidas realizadas com o sal CsI e o C_{60}. As medidas realizadas para os aglomerados C_n^- indicam a existência de estados metaestáveis da molécula de C_{60} e demonstram o incremento na resolução do pico correspondente ao C_{60}^-, devido à eliminação do efeito da fragmentação metaestável pela ação do espelho eletrostático.

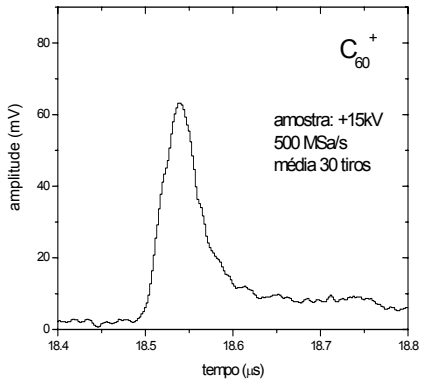

Figura 9 – Sinal formado pela média de 30 pulsos gerados por íons C_{60}^+ com o espectrômetro no modo direto.

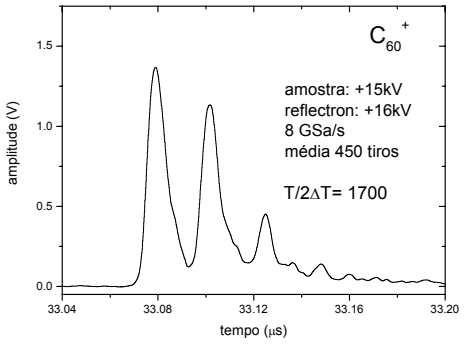

Figura 10 – Sinal formado pela média de 450 pulsos gerados por íons C_{60}^+ com espectrômetro no modo refletido.

Como continuidade deste trabalho, serão realizadas medidas com amostras padrão de biomoléculas, que permitirão testar o conjunto formado pelo espectrômetro de massa mais o espelho eletrostático para este tipo de material.

6. REFERÊNCIAS

1. PINTO JR., E.; MACCHIONE, E.L.A.; KOIDE, K.; HIRATA, J.H.; VASCONCELOS, S.S.; DIETZSCH, O.; LOPES, N.P.; COLEPICOLO, P. Isolamento e Caracterização de carotenóides da Alga Marinha Gonyaulax Poliedra (Stein). XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 1999, Poços de Caldas. Sociedade Brasileira de Química - Programa e Resumos., 1999, v. 2, p. 205.
2. SCARANO JR., S.; ALVES, J.R.V.; CIPOLI, A.K.; MAGALÃES, M.A.P.; PINTO JR., E.; MACCHIONE, E.L.A.; KOIDE, K.; HIRATA, J.H.; VASCONCELOS, S.S.; DIETZSCH, O.; LOPES, N.P.; COLEPICOLO,P. Medidas de Massa de Carotenóides através da Técnica de 252Cf-PDMS. XX CBRAVIC: Congresso Brasileiro de Aplicações de Vácuo na Indústria e na Ciência, 1999, São Paulo.

3. BATTAGLIA, M.; MACCHIONE, E.L.A.; SINNECKER, P.; TERRA, M.H.; MARQUEZ, U.M.L. Síntese enzimática, extração e purificação de feoforbídeo-A de folhas de espinafre. Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP, 7/Seminário de Pós-Graduação, 17/Reunião de Iniciação Científica, 10/Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, 37 : 2002 : São Paulo; Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas São Paulo, v. 38, supl. 1, p. 73 res. ALN65, 2002.
4. DIETZSCH, O.; HIRATA, J.H.; KOIDE, K.; LENZI, B.R.; MACCHIONE, E.L.A.; VASCONCELOS, S.S.; PEREIRA, J.A.M. Um espectrômetro de massa para análise de biomoléculas. Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada, 26: 2003: Caxambu; Resumos, São Paulo, SBF, 2003.
5. MAMYRIN, B.A., *Int. J. of Mass Spec. and Ion Proc.* 131 (1994) 1.
6. AEBERSOLD, R.; MANN, M., *Nature* 198 (2003) 422.
7. SPENGLER, B., *J. of Mass Spectr.* 32 (1997) 1019.
8. INGENDOH, A.; KARAS, M.; HILLENKAMP, F.; GIESSMANN, U., *Int. J. of Mass Spe. and Ion Proc.* 131 (1994) 345.
9. WIZA, J.L., *Nucl. Instr. & Meth.* 88 (1979) 587.
10. TREMSIN, A.S.; PEARSON, J.F.; LEES, J.E.; FRASER, G.W., *Nucl. Instr. & Meth. A* 368 (1996) 719.