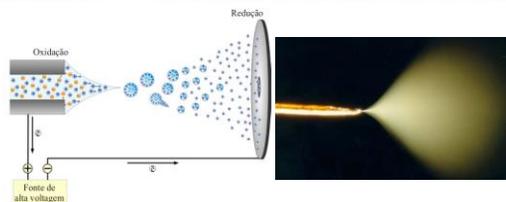


Cromatografia líquida-espectrometria de massas: LC-MS

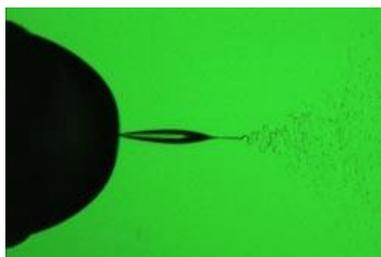
Álvaro José dos Santos Neto

Acoplamento LC-ESI-MS

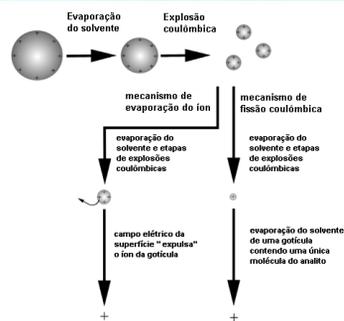


- Melhor opção para análise de fármacos
- Mais compatível com baixas vazões

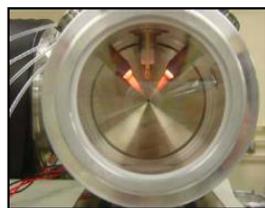
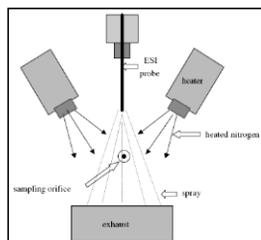
Electrospray - ESI



Mecanismos propostos para a formação de íons individuais em fase gasosa

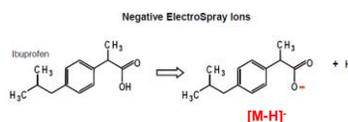
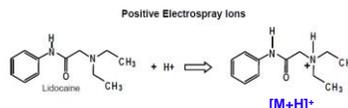


ESI (com assistência pneumática) old term: "Ionspray"



Processo de Formação de Íons em ESI

- **ionização através da separação de cargas:** ocorre em fase líquida, onde analitos com características básicas formam a espécie $[M+H]^+$ (ionização no modo positivo) e analitos ácidos formam a espécie $[M-H]^-$ (ionização no modo negativo).

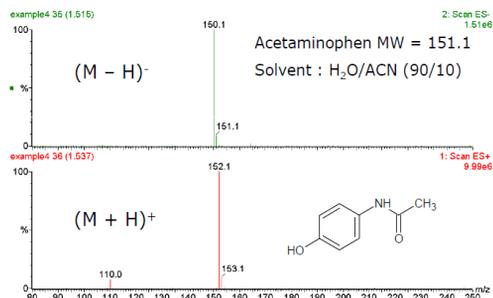


► **Formação de aduto:** analitos polares, sem grupos ácidos ou básicos. Adiciona-se na fase móvel cátions ou ânions que se ligam as moléculas do analito e as tornam ionizadas.

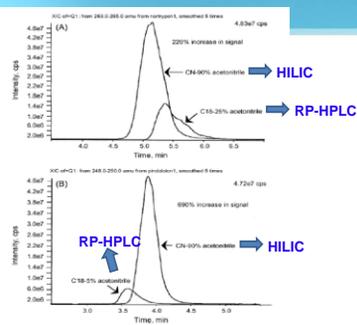
Aduto (modo +)	Íon formado	Aduto (modo -)	Íon formado
[M+Na] ⁺	M+23	[M+HCOO] ⁻	M+45
[M+K] ⁺	M+39	[M+OAc] ⁻	M+59
[M+NH ₄] ⁺	M+18	[M+TFA] ⁻	M+113
[M+CH ₃ OH+H] ⁺	M+33	[M+Cl] ⁻	M+35
[M+CH ₃ CN+H] ⁺	M+42		

► **Reações em fase gasosa:** analitos com grupos ácidos ou básicos não ionizados em fase líquida adquirem carga através de reações com moléculas do solvente em fase gasosa.

Exemplos de espectros de massas obtidos por ESI nos modos positivo e negativo



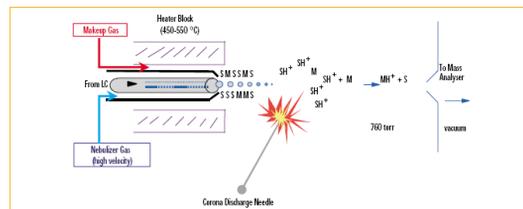
Eficiência de Ionização : HILIC x RP-HPLC



Ref.: Needham, S.R.; Brown, P.R.; Duff, K.; Bell, D. *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 160.

Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI)

Vazões: ~1,0 mL/min

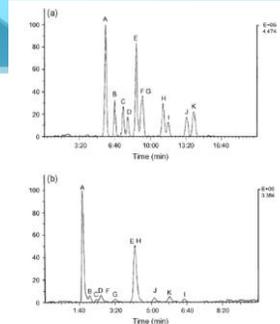


Efeito da Fase Móvel em APCI (+)

- Em APCI a ionização ocorre em fase gasosa: pouca influência da química em solução.
- A escolha da F.M. deve basear-se na afinidade do analito pelo próton (modo +), que deve ser maior do que aquelas dos solventes utilizados.

	IE (eV)	PA (kJ/mol)
Nitrogen	15.581	493.8
Oxygen	12.1	421.0
Carbon dioxide	13.777	540.5
Water	12.6	691.0
Methanol	10.84	754.3
Ethanol	10.48	726.4
Acetonitrile	12.2	779.2
Ammonia	10.07	853.0
n-Hexane	10.13	-
Chloroform	11.37	-
2-Propanol	10.17	793
Isobutane	9.89	-
Benzene	9.243	750.4
Toluene	8.83	784.0
Acetone	9.703	812.0
Anisole	8.20	839.6

IE: energia de ionização; PA: afinidade pelo próton



Total ion current (TIC) obtained from APCI LC/MS analysis of a mixture containing 11 steroids. The gradient systems used were methanol/1% acetic acid (a) in water and acetonitrile/1% acetic acid in water (b). The 11 standards used were: A: testosterone; B: DHEA; C: progesterone; D: 5α-DHT; E: progesterone; F: allo-TREDC; G: androstenedione; H: progesterone; I: 5α-DHT; J: progesterone; K: allopregnanolone (reproduced with permission from ref. [13]).

Efeito do uso do MeOH e de ACN como fase móvel em APCI (+)

Ref.: Kostianen, R.; Kaupilla, T. J. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 685-699.

Fotoionização a Pressão Atmosférica (APPI)

Saída HPLC
Gás de nebulização
Nebulizador (sprayer)
Vaporizador (aquecedor)
Lâmpada UV
Gás de secagem
Capilar

- Pode ser usado um dopante
Ex. Tolueno

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

Processos de ionização em APPI (+)

➔ Ionização direta

➔ Ionização com auxílio de um “dopante”

$M + h\nu \rightarrow M^{+\bullet} + e^{-}$	direta	(1)
$M^{+\bullet} + S \rightarrow MH^{+} + [S-H]^{\bullet}$		(2)
$D(\text{dopant}) + h\nu \rightarrow D^{+\bullet} + e^{-}$		(3)
$D^{+\bullet} + M \rightarrow M^{+\bullet} + D$, if $IE(M) < IE(D)$		(4)
$D^{+\bullet} + S(\text{solvent molecule}) \rightarrow [D-H]^{\bullet} + SH^{+}$, if $PA(S) > PA([D-H]^{\bullet})$		(5)
$SH^{+} + M \rightarrow MH^{+} + S$, if $PA(M) > PA(S)$		(6)
$S + h\nu \rightarrow S^{+\bullet} + e^{-}$	dopante	(7)

*M: análio de interesse;
D (dopante): acetona ou tolueno;
IE: energia de ionização;
PA: afinidade pelo próton.*

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

Molecular weight

(APPI) APCI APESI

Size exclusion Gel permeation
Size exclusion Gel filtration

Normal phase
Supercritical fluid
Reversed phase
Affinity
Ion exchange

APESI
APCI (APPI)

Apolar Medium polarity Polar Ionic

Electrospray Max 6482
APCI Max 21869
APPI Max 118366

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

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

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

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

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

➔ Ésteres de testosterona: baixo PM e polaridade média

1 propionato de testosterona
2 fenilpropionato
3 caproato
4 decanoato

(b) Pico 2 em APCI
(c) Pico 2 em ESI

Sandra, P. et al., LC-GC Europe, 2001.

Modo de análise: positivo ou negativo

1. Diodo Array
2. Scan ES+
3. Scan ES-

Positive electrospray
Negative electrospray

Há problema em não fazer preparo de amostra????

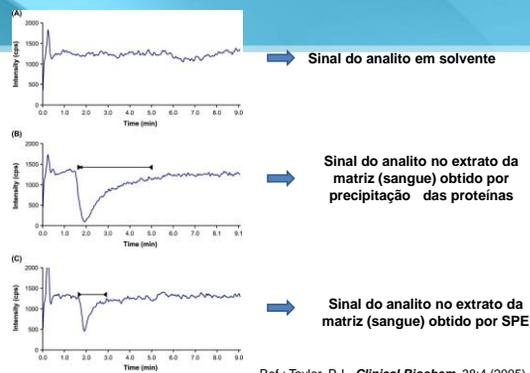
- Supressão do sinal do analito
 - Matriz (macromoléculas)
 - Interferentes (fármacos; endógenos)
- Contaminação do equipamento
- Perda de exatidão e precisão
- Resultados sem confiança ???



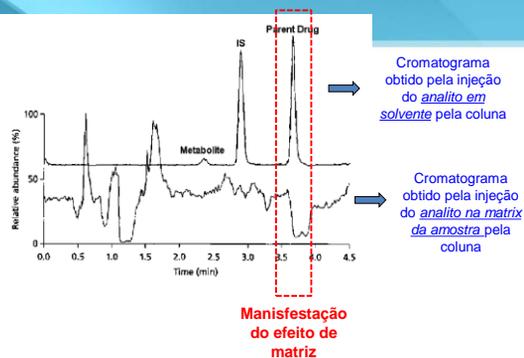
EFEITO DE MATRIZ EM LC-MS

- ➔ **Efeito de matriz** consiste (comumente) na diminuição do sinal de um determinado analito, na presença de compostos interferentes da matriz na qual a substância está sendo analisada.
- ➔ O efeito de matriz é avaliado comparando-se a resposta do analito em solvente puro, com a resposta do analito no extrato da matriz em estudo.
- ➔ O efeito de matriz se manifesta em LC-MS, geralmente, durante o processo de ionização. A técnica de ESI é a mais propensa a apresentar esse efeito (química em solução).

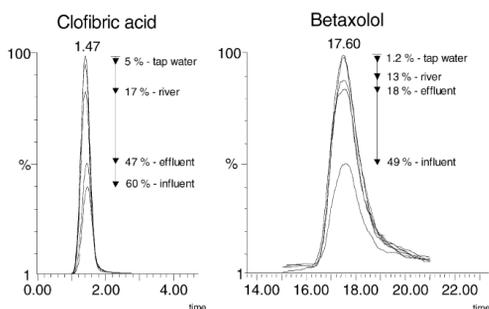
Efeitos de matriz verificados por infusão pós-coluna



Manifestação do efeito de matriz em amostra biológica



Efeito de matriz (ESI) em diferentes tipos de água

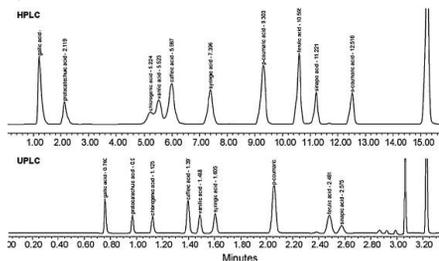


Estratégias para Eliminar ou Diminuir o Efeito de Matriz

- ➔ **Primeira estratégia:** eliminar ao máximo os constituintes da matriz responsáveis pelo efeito.
- ➔ **Segunda estratégia:** reduzir ou eliminar a influência dos efeitos de matriz na exatidão e/ou precisão do método.

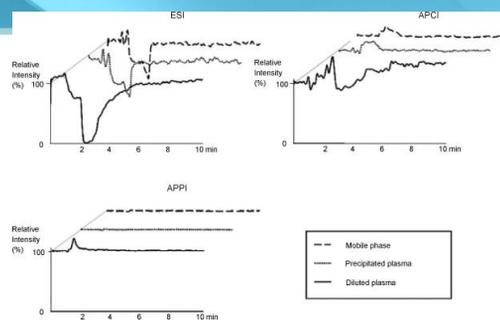
Remoção dos constituintes da matriz: melhora no processo cromatográfico

➔ Substituir a técnica de HPLC por UHPLC



Separação de compostos fenólicos: UHPLC – menor tempo total de análise e picos mais estreitos (diminui a possibilidade de efeito de matriz)

Efeito de matriz: ESI x APCI x APPI



Ref.: Marchi, I.; Rudaz, S.; Selman, M.; Veuthey, J.L. *J. Chromatogr.B* 845 (2007)