

ROTEIRO DA PRÁTICA DE ESPETROMETRIA DE MASSAS

“FUNDAMENTOS DE IONIZAÇÃO EI e ESI E ANÁLISES MS e MS/MS”

OBJETIVO

Adquirir destreza e desenvolver os fundamentos na execução de rotinas analíticas que envolvem a utilização de métodos de espectrometria de massas acoplados a cromatografia de gases (GC), cromatografia líquida (LC) e eletroforese capilar (CE).

INTRODUÇÃO

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica de identificação de substâncias desconhecidas, que normalmente permite determinar a presença de um composto específico em uma determinada amostra (e.g. um praguicida em água) ou determinar a composição de uma amostra desconhecida (e.g. um óleo essencial). Desta forma, é uma técnica frequentemente acoplada a GC, LC e CE. Adicionalmente a MS também é fortemente utilizada para obter informação durante a elucidação da estrutura molecular de um composto novo (e.g. um metabólito extraído e purificado).

A MS permite obter informação sobre a estrutura molecular de um composto a partir da ionização e fragmentação da molécula em pequenos íons, que ao serem analisados em conjunto podem levar à dedução da ordem em que estes fragmentos estão unidos.

Um instrumento de MS é basicamente constituído por uma fonte de íons (onde os fragmentos são gerados), um analisador de massas (que separa os íons segundo sua relação massa/carga) e um detector de íons. Assim, os espectrômetros de massas encontrados hoje no mercado basicamente podem ser classificados segundo sua fonte de íons e/ou o analisador de massas utilizado. As duas principais formas de ionização disponíveis são a ionização por elétrons (EI – *Electron Ionization*), principalmente usada na análise de moléculas pequenas (até 1.000 Da) em acoplamento com a GC; e a ionização por *electrospray* (ESI – *Electrospray Ionization*) usada na análise de moléculas maiores e frequentemente acoplada a LC e CE.

Estas duas formas de ionização, além dos aspectos técnicos e instrumentais, basicamente se diferenciam no tipo de espectros de massas gerados. A EI é considerada uma forma de ionização “forte”, que gera espectros ricos em íons e, portanto, em informação estrutural. Por outro lado, a

ESI é considerada uma forma de ionização branda, que gera espectros com poucos íons, normalmente observando-se apenas o íon *quasi molecular* (molécula protonada ou desprotonada). Esta diferença pode ser observada na Figura 1 que, a modo de exemplo, apresenta o espectro EI (70 eV) do acetaminofeno, disponível na base de dados da NIST (*National Institute of Standards and Technology*) (**Figura 1.a**) e os espectros ESI em modo negativo $(M-H)^-$ e em modo positivo $(M+H)^+$ para a mesma substância (**Figura 1.b**).

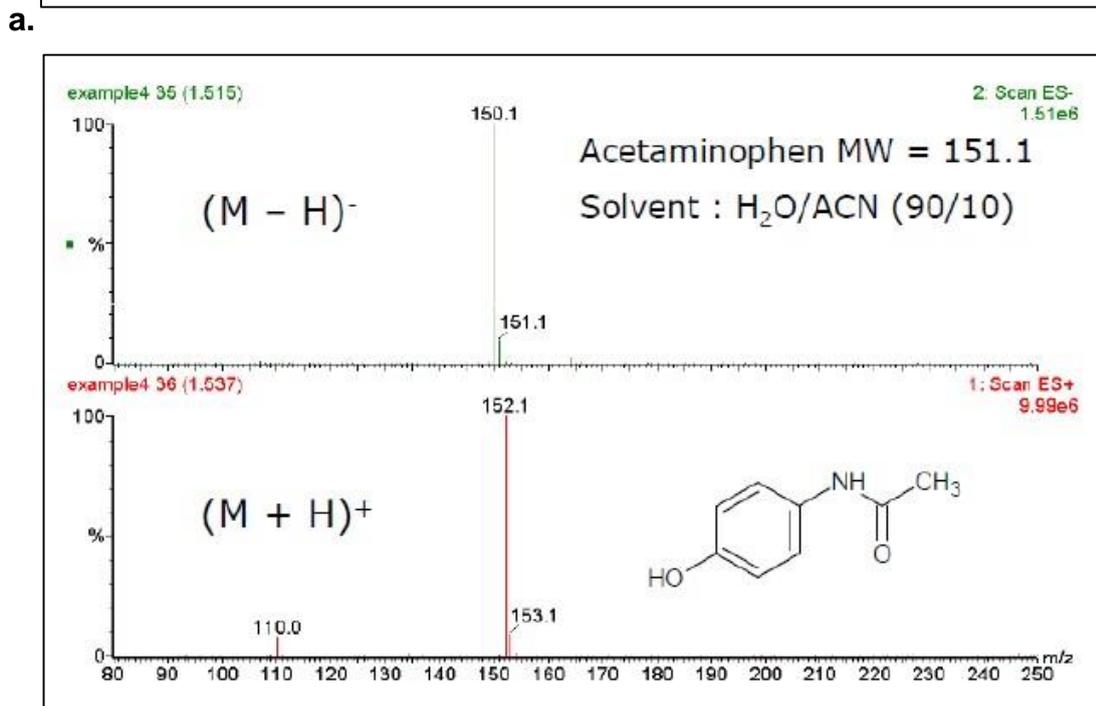
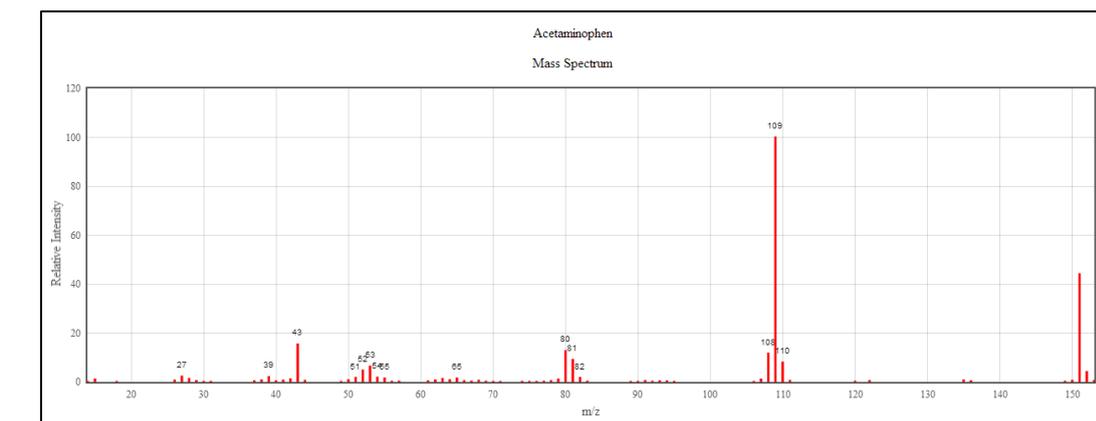


Figura 1. Espectros de massas do acetaminofeno. **a)** espectro de IE; e **b)** espectros de ESI.

Identificação com espectros de massas de EI (GC-MS)

Os espectros de EI frequentemente são usados com finalidade de identificação em aplicações de GC-MS, com grande versatilidade, uma vez que, quando uma molécula é ionizada por elétrons, esta sempre fragmenta da mesma forma, gerando os mesmos fragmentos e na mesma proporção. Dessa forma, o espectro assim obtido é tido como uma impressão digital da molécula analisada, o que possibilita sua identificação presuntiva mediante comparação com espectros de EI armazenados em bases de dados. Assim, existem diversas bases de dados de espectros de massas de diversos tipos de substâncias (feromônios, óleos essenciais, fármacos, drogas ilícitas etc), que podem chegar a conter espectros de 50 mil substâncias diferentes, muitas destas podem ser adquiridas e incorporadas no software do GC-MS, de forma que a comparação iterativa dos espectros obtidos experimentalmente com os “teóricos” pode realizar-se de forma automatizada. Existem também algumas bibliotecas de espectros de massas de EI de acesso livre, em formato impresso ou digital, que eventualmente podem ser usadas para identificação por comparação manual tais como:

- NIST (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>)
- SDBS (http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi)
- Livro: Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Robert P. Adams.

É importante ressaltar que, embora sejam obtidos índices de similaridade próximos a 100% de coincidência, a comparação dos espectros de EI não é suficiente para identificar inequivocamente uma substância, outros parâmetros como o tempo de retenção ou os índices de retenção de Kovats devem ser utilizados, para fornecer a identidade do composto com maior segurança. Assim, quando se conta com padrões de referência da substância procurada, além de obter um alto índice de similaridade do espectro obtido experimentalmente com o disponível na base de dados, é necessário que o tempo de retenção do composto coincida com o observado para o padrão, quando este é injetado nas mesmas condições cromatográficas. Quando não se conta com padrões de referência, então deve ser calculado o índice de retenção do composto e compará-lo com os relatados na literatura, nas mesmas condições cromatográficas. Para isto deve ser injetado um padrão de hidrocarbonetos (C₄ – C₃₄) nas mesmas condições cromatográficas da amostra e mediante a seguinte expressão:

$$KI(x) = 100P_z + 100[\log RT(x) - \log RT(P_z)] / [\log RT(P_{z+1}) - \log RT(P_z)]$$

Onde RT – tempo de retenção e $RT(P_z) < RT(x) < RT(P_{z+1})$; sendo P_z o hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente menor ao do composto de interesse x .

Para maior rigorosidade na identificação, frequentemente é requerida a coincidência dos índices de Kovats em duas colunas cromatográficas diferentes (uma polar e uma apolar).

Além da análise em modo *full scan* que produz os espectros completos das moléculas, existe outro modo de análise, que pode ser usado quando o composto procurado é conhecido. Quando se está procurando um composto em uma amostra, frequentemente não é necessário monitorar todos os íons formados, sendo possível programar o analisador do espectrômetro e monitorar somente alguns íons característicos do composto, com um ganho significativo na razão sinal/ruído. Neste caso, o cromatograma obtido é altamente seletivo e só costuma apresentar o pico cromatográfico correspondente ao composto em questão. Este modo de aquisição em MS é denominado SIM, monitoramento de íon selecionado (do inglês, *selected ion monitoring*). Também neste caso, para maior rigorosidade na identificação, é necessária a coincidência do tempo de retenção com o observado para o padrão do composto e, normalmente, a coincidência entre as abundâncias relativas obtidas do monitoramento de dois ou mais íons característicos da molécula (entre o padrão e a amostra desconhecida).

Identificação com espectros de massas de ESI (LC-MS)

Tal como pode ser observado na Figura 1, os espectros de ESI muitas vezes só apresentam íons moleculares protonados ou desprotonados, que não aportam informação estrutural além da massa molecular, o que poderia impossibilitar a identificação dos compostos quando esta forma de ionização é utilizada. No entanto várias abordagens têm surgido nos últimos anos para superar estas limitações. Uma delas consiste na utilização de analisadores de massas de alta resolução, que permitem obter a massa exata do composto, e portanto reduz significativamente o número das possíveis fórmulas moleculares identificadas. Outra abordagem, bastante versátil e amplamente utilizada na atualidade, é a espectrometria de massas sequencial (MS/MS), *tandem mass spectrometry* em inglês. Uma opção é a utilização de analisadores aprisionadores de íons (*ion traps*). Esses analisadores permitem a fragmentação dos íons aprisionados de modo a se obter espectros dos íons produtos, em analogia aos espectros de EI. Em termos gerais, além desses equipamentos (*ion traps*) que possibilitam a MS/MS sequencialmente no tempo, existem outros que fazem a análise MS/MS sequencialmente no espaço, os comumente chamados quadrupolos de triplo estágio (TSQ – *triple stage quadrupole*) ou simplesmente nomeados triplo quadrupolos (TQD – *triple quadrupole detector*).

No desenvolvimento da presente prática um dos equipamentos utilizados é nomeado LTQ (*linear trap quadrupole*), o qual é um tipo de aprisionador de íons (*ion trap*) no formato de um quadrupolo linear e permite, neste caso, MS/MS sequencial no tempo. Em termos gerais, estes equipamentos permitem a operação em modo *full scan*, gerando espectro completo de íons produtos, ou em modo de reação selecionada (SRM – *selected reaction monitoring*), monitorando íons produtos específicos, fragmentados a partir de íons precursores previamente selecionados. Além disso, por ser um analisador sequencial no tempo, também permite fragmentações de gerações sucessivas de íons, por exemplo, uma segunda etapa de fragmentação a partir de íons previamente fragmentados obtidos de um íon molecular precursor (MS³). Tecnicamente esse instrumento permite realizar inúmeros experimentos sequenciais, sendo denominado como MSⁿ, desde que a abundância dos íons aprisionados permita a suficiente detecção dos íons, após as sucessivas etapas de aprisionamento, fragmentação e análise. Alguns dos modos de operação de um espectrômetro sequencial seguem descritos abaixo:

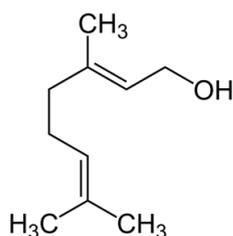
- **Monitoramento de íons produtos:** quando se deseja obter informação estrutural do composto. Um espectro de íons produtos é obtido (*trap* operando em MS/MS). Os íons específicos de determinada razão massa/carga (*m/z*) são, sequencialmente no tempo, isolados, fragmentados, e, posteriormente, todos os íons produtos são analisados, sendo registrados na forma de um espectro.

- **Monitoramento de reação selecionada (SRM):** Utilizado quando se deseja confirmar a presença de um composto determinado em uma amostra. Frequentemente para maior rigorosidade na identificação se recomenda o monitoramento de pelo menos duas reações selecionadas. Basicamente, no processo sequencial, o íon precursor é isolado, fragmentado, e, posteriormente, apenas os íons produtos selecionados são monitorados, sem resultar em um espectro completo.

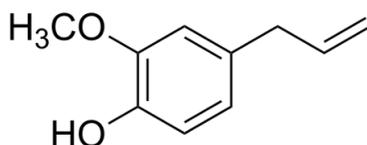
PARTE EXPERIMENTAL

Identificação com espectros de massas de EI (GC-MS) – análise de eugenol, geraniol e cumarina

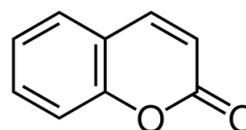
O eugenol, o geraniol e a cumarina são compostos que se caracterizam pelo seu odor característico e que são encontrados em alguns óleos essenciais. O geraniol é um monoterpreno com 10 átomos de carbono que além de ser empregado como fragrância apresenta uma grande capacidade de repelir insetos. Além disso, é produzido pelas glândulas olfativas de algumas espécies de abelhas. O eugenol se caracteriza pelo seu odor de cravo. Este foi isolado pela primeira vez em 1929, e atualmente é amplamente produzido na Índia e utilizado em grande escala na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética, de perfumaria e de cigarros. A cumarina é responsável pela atividade expectorante e broncodilatadora do guaco, uma planta com comprovada ação no tratamento de doenças que atacam o sistema respiratório, como tosse, dor de garganta, gripe e bronquite. Segue abaixo as estruturas químicas dessas substâncias:



Geraniol



Eugenol



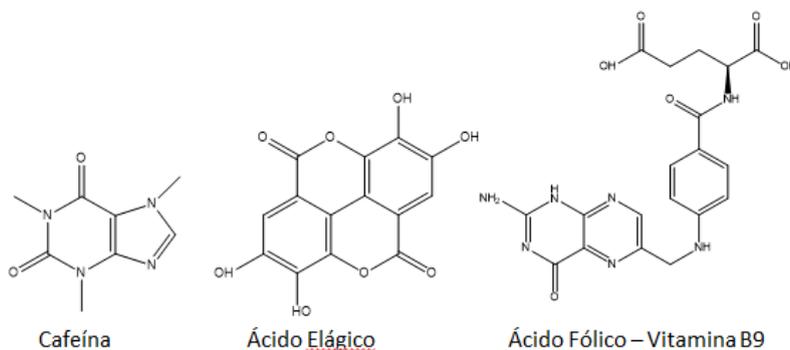
Cumarina

1. Programe o GC-MS para detecção no modo *full scan*, conforme instruções do professor.
2. Programe a injeção automática de 1 μL da solução preparada no GC-MS e obtenha o cromatograma total de íons (TIC) e os correspondentes espectros de massas. Tome nota dos tempos de retenção observados para cada um dos compostos.
3. Obtenha uma média dos espectros de massas de cada um dos picos cromatográficos observados e faça a identificação, por comparação nas bibliotecas disponíveis no software do equipamento. Tome nota dos principais íons observados em cada um dos espectros obtidos.
4. Procure os espectros de eugenol, geraniol e cumarina em outras bases de dados, e.g. na SDBS e no livro de Adams. Compare esses espectros com os obtidos experimentalmente, e os encontrados no *software*. Quais as conclusões?
5. Observe os principais íons presentes no espectro do eugenol, geraniol e cumarina e programe o GC-MS para aquisição no modo SIM.

6. Injete novamente 1 μL da solução preparada. Qual a diferença encontrada entre este cromatograma e o anterior? Qual a diferença encontrada nos espectros de massas registrados?

7. Conforme instruções do professor, faça alterações na velocidade de varredura do analisador de massas, em modo *full scan* e/ou SIM. Observe a variação na razão sinal/ruído dos picos cromatográficos e na precisão das áreas integradas de cada pico.

Identificação com espectros de massas de ESI (infusão direta) – Análise de cafeína, ácido fólico e ácido elágico.



1. Prepare uma solução 10^{-4} M de cafeína, ácido fólico e ácido elágico em metanol.
2. Preencha a seringa de infusão direta do MS e coloque-a na bomba para infusão.
3. Obtenha o espectro de massas da mistura em modo positivo e negativo, operando no modo *full scan*.
4. Observe o espectro de massas obtido em modo positivo e procure os íons *quasi moleculares* de cada um dos compostos analisados.
5. Observe o espectro de massas obtido em modo negativo e procure os íons *quasi moleculares* de cada um dos compostos analisados. Qual diferença pode ser observada entre os espectros obtidos em modo positivo e negativo? Explique a origem destas diferenças.
6. Selecione para fragmentação o íon *quasi molecular* da cafeína no espectro em modo positivo e obtenha o espectro de íons produtos deste íon. Varie pouco a pouco (de 10 em 10 unidades, iniciando em 5) a energia de fragmentação. Tome nota dos diferentes íons formados, com cada uma das energias utilizadas. Quais diferenças entre os espectros obtidos? Explique a origem das diferenças.
7. Repita o passo anterior com os íons *quasi moleculares* do ácido fólico e do ácido elágico em modo negativo.
8. Qual diferença encontrada entre as energias mínimas requeridas para fragmentar cada uma destas moléculas? Explique estas diferenças em termos da estrutura molecular.
9. Atribua possíveis estruturas moleculares aos principais íons fragmentos observados nos espectros de íons produtos de cada um dos compostos analisados. Podem ser usadas as ferramentas disponíveis para estes propósitos no software *ChemDraw* e no site *ChemSpider* (<http://www.chemspider.com/>).
10. Compare os resultados com os espectros de alta resolução, obtidos no analisador Orbitrap, os quais serão apresentados no dia da aula (e também se encontram disponíveis no ambiente MOODLE, no tópico da respectiva prática).