

# Análise seletiva de compostos isobáricos de co-eluição com detecção de massa de quadrupolo único

## Autor

Stephan Meding  
Thermo Fisher Scientific,  
Germering, Alemanha

## Palavras-chave

Espectrômetro de massa de quadrupolo único, ISQ EC, ISQ EM, Vanquish Flex Binary UHPLC, fragmentação na fonte, desmedifame, fenemedifame

## Objetivo

Demonstrar a seletividade adicional ganha através de fragmentação por CID na fonte na discriminação de analitos isobáricos de co-eluição.

## Introdução

Para haver uma análise confiante, é necessária uma detecção da amostra sem ambiguidade. Na cromatografia líquida, geralmente isso é possível através do desenvolvimento de um método que resolve satisfatoriamente os compostos alvos e os identifica com base nos seus respectivos tempos de retenção. Conseqüentemente, a detecção em si (geralmente com base em UV) não precisa ser seletiva. No entanto, se os analitos não podem ser solucionados satisfatoriamente com a cromatografia, a detecção sem ambiguidade ainda é possível usando a detecção de espectrômetros de massa seletiva. Ela consegue medir a massa molecular, padrão isotópico e o padrão de fragmentação dos analitos. Com isso, é possível fornecer informações suficientes para confirmar a identidade de moléculas pequenas. Apesar dessa vantagem, a espectrometria de massas não é comumente usada como detector na cromatografia rotineira já que é vista como algo bastante complexo e difícil. No entanto, os espectrômetros de massa de quadrupolo único Thermo Scientific™ ISQ™ EC e EM são desenvolvidos para operar com cromatógrafos. A sua completa integração com o sistema de dados de cromatografia (CDS) Thermo Scientific™ Chromeleon™, versão 7.2 e o conjunto do método inteligente patenteado Thermo Scientific™ Autospray tornam a operação LC/MS e a análise de dados prática e intuitiva.

Os detectores de massa ISQ EC/EM possibilitam:

- Operação em modo de verificação completa e modo de monitoramento seletivo de íons (SIM), tanto para verificar a faixa de massa para analitos detectáveis quanto para selecionar compostos específicos.
- Tensão ajustável da CID na fonte para a desagregação de analitos e remoção de adutos em baixas tensões ou fragmentação de analitos em altas tensões.
- Taxas de verificação ideais para aplicações de UHPLC ao mesmo tempo que produz limites de detecção na ordem de picograma.
- Altos níveis de robustez dos instrumentos, mesmo com matrizes difíceis, com o novo desenho ortogonal da fonte.

No exemplo de aplicação a seguir, dois analitos isobáricos de co-eluição, desmedifame e fenemedifame foram detectados seletivamente com base em fragmentos únicos gerados através de fragmentação por CID na fonte.

**Tabela 1. Descrição dos analitos**

Analito	CAS	Fórmula química	Peso molecular	Massa monoisotópica [M]	M/z detectado [M+H] <sup>+</sup>
Desmedifame	13684-56-5	$C_{16}H_{16}N_2O_4$	300,31	300,11	301,1
Fenemedifame	13684-63-4	$C_{16}H_{16}N_2O_4$	300,31	300,11	301,1

**Tabela 2. Alimentos e aditivos**

Reagente	Grau	Fornecedor	Número da peça
Acetonitrilo	LC/MS Optima™	Fisher Chemical	A955-212
Acido fórmico	LC/MS Optima™	Fisher Chemical	A117-50
Metanol	LC/MS Optima™	Fisher Chemical	A456-212
Água	Ultra pura, 18,2 MΩ a 25 °C	Sistema de purificação de água ultrapura Thermo Scientific™ Barnstead™ GenPure™ xCAD Plus.	

**Tabela 3. Módulo do sistema UHPLC binário Vanquish Flex**

Módulo	Número da peça
Base do sistema Vanquish Horizon/Flex	VF-S01-A
Bomba binária Vanquish F (com conjunto de misturadores de 35 µL)	VF-P10-A (6044.3870)
Amostrador de divisão Vanquish FT	VF-A10-A
Compartimento de Coluna Vanquish H	VH-C10-A
Detector de comprimento de onda variável F (fluxo de célula SST de 2,5 µL)	VF-D40-A (6074.0360)

**Tabela 4. Colunas Thermo Scientific™ usadas para separação cromatográfica**

Fase estacionária	Tamanho da partícula	Dimensões	Número da peça
Hypersil GOLD™	1,9 µm	2,1 x 100 mm	25002-102130
Hypersil GOLD™	1,9 µm	2,1 x 50 mm	25002-052130

## Experimental

As soluções padrões (10 µg/µL em acetonitrila) de desmedifame e fenemedifame (tabela 1) foram preparadas e armazenadas a 4 °C. A não ser se especificado de outra forma, foram usadas amostras de 100 ng/µL para a análise.

A separação cromatográfica foi realizada usando solventes grau LC/MS (tabela 2) no sistema de UHPLC binário Thermo Scientific™ Vanquish™ Flex (tabela 3). Para a análise inicial dos compostos com base em UV e a verificação final do método, foi usada uma coluna de 100 mm; para o desenvolvimento do método, foi usada uma coluna de 50 mm (tabela 4). Foi usado um capilar MP35N de 75 cm com diâmetro interno de 100 µm (nº de peça 6042.2390) para conectar o sistema UHPLC ao detector de massas ISQ EC.

O detector de massa é completamente integrado ao software Chromeleon 7.2 CDS, que foi usado para a operação do sistema e subsequente análise de dados.

Tabela 5. Condições da LC/MS para os ensaios iniciais

Parâmetro	Valor
Fase móvel	A: Água com ácido fórmico 0,1% B1: Acetonitrila com ácido fórmico 0,1% B2: Metanol com ácido fórmico 0,1%
Gradiente	0–0,5 min: 2% B 0,5–10 min: 2–98% B 10–15 min: 2% B
Taxa de fluxo	0,4 mL/min
Temperatura da coluna	pré-aquecedor passivo, modo de ventilação forçada 40 °C
Volume de injeção	0,1 µL
Detecção UV	254 nm, 100 Hz
Configurações de fonte	Padrão (modo fácil)
Verificação completa	
Tempo	0–15 min
Faixa de massa	200–500 <i>m/z</i>
Tempo de residência	0,2 s
Polaridade	Positiva
Tensão da fonte CID	20 V

Tabela 6. Condições da LC/MS para o método de *screening*

Parâmetro	Valor
Fase móvel	A: Água com ácido fórmico 0,1% B1: Acetonitrila com ácido fórmico 0,1%
Gradiente	0–0,5 min: 40% B 0,5–2,5 min: 40–60% B 2,5–5 min: 40% B
Taxa de fluxo	0,4 mL/min
Temperatura da coluna	pré-aquecedor passivo, modo de ventilação forçada 40 °C
Volume de injeção	1,0 µL
Detecção UV	254 nm, 100 Hz
Configurações de fonte	Padrão (modo fácil)
Verificação completa	
Tempo	0–5 min
Faixa de massa	150–350 <i>m/z</i>
Tempo de residência	0,2 s
Polaridade	Positiva
Tensão da fonte CID	20–100 V em gradações de 10 V

Tabela 7. Condições da LC/MS para o desenvolvimento do método

Parâmetro	Valor
Fase móvel	A: Água com ácido fórmico 0,1% B1: Acetonitrila com ácido fórmico 0,1%
Gradiente	0–0,5 min: 40% B 0,5–2,5 min: 40–60% B 2,5–5 min: 40% B
Taxa de fluxo	0,4 mL/min
Temperatura da coluna	pré-aquecedor passivo, modo de ventilação forçada 40 °C
Volume de injeção	1,0 µL
Detecção UV	254 nm, 100 Hz
Configurações de fonte	Padrão (modo fácil)
Verificação SIM (principal)	
Tempo	0–5 min
Massa	301,12 <i>m/z</i>
Tempo de residência	0,1 s
Largura SIM	0,4 Da
Polaridade	Positiva
Tensão da fonte CID	0–100 V em gradações de 10 V 20–40 V em gradações de 2 V
Verificação SIM (fragmento de desmedifame)	
Tempo	0–5 min
Massa	182,08 <i>m/z</i>
Tempo de residência	0,1 s
Largura SIM	0,4 Da
Polaridade	Positiva
Tensão CID na fonte	0–100 V em gradações de 10 V 50–70 V em gradações de 2 V
Verificação SIM (fragmento de fenemedifame)	
Tempo	0–5 min
Massa	168,07 <i>m/z</i>
Tempo de residência	0,1 s
Largura SIM	0,4 Da
Polaridade	Positiva
Tensão CID na fonte	0–100 V em gradações de 10 V 50–70 V em gradações de 2 V

Tabela 8. Condições LC/MS para verificação do método

Parâmetro	Valor
Fase móvel	A: Água com ácido fórmico 0,1% B1: Acetonitrila com ácido fórmico 0,1%
Gradiente	0–0,5 min: 2% B 0,5–10 min: 2–98% B 10–15 min: 2% B
Taxa de fluxo	0,4 mL/min
Temperatura da coluna	pré-aquecedor passivo, modo de ventilação forçada 40 °C
Volume de injeção	1,0 µL
Detecção UV	254 nm, 100 Hz
Configurações de fonte	Padrão (modo fácil)
Verificação completa	
Tempo	0–15 min
Faixa de massa	150–350 <i>m/z</i>
Tempo de residência	0,2 s
Polaridade	Positiva
Tensão da fonte CID	28 V
Verificação SIM (principal)	
Tempo	0–15 min
Massa	301,12 <i>m/z</i>
Tempo de residência	0,1 s
Largura SIM	0,4 Da
Polaridade	Positiva
Tensão da fonte CID	28 V
Verificação SIM (fragmento de desmedifame)	
Tempo	0–15 min
Massa	182,08 <i>m/z</i>
Tempo de residência	0,1 s
Largura SIM	0,4 Da
Polaridade	Positiva 58
Tensão da fonte CID	V
Verificação SIM (fragmento de fenemedifame)	
Tempo	0–15 min
Massa	168,07 <i>m/z</i>
Tempo de residência	0,1 s
Largura SIM	0,4 Da
Polaridade	Positiva
Tensão da fonte CID	58 V

## Resultados e discussão

Inicialmente, tentou-se a separação cromatográfica com base em UV de desmedifame e fenemedifame usando uma coluna Hypersil GOLD de 10 cm (tabela 4), com um gradiente linear genérico de 10 min ou com acetonitrila ou com metanol como fase orgânica (tabela 5). Na cromatografia, uma resolução de 1,5 é muitas vezes considerada o limite inferior para a

separação cromatográfica aceitável. Para os dois analitos, o método de separação resultou em uma resolução (de acordo com EP) de 0,40 para acetonitrila e 0,36 para metanol (figura 1). Portanto, a separação cromatográfica foi considerada insuficiente. Ainda, a análise com base em UV da mistura dos analitos resultou em apenas um pico um pouco mais amplo do que os picos individuais das análises das amostras de desmedifame ou fenemedifame puras.

Dessa forma, a co-eluição foi imperceptível com a detecção UV.

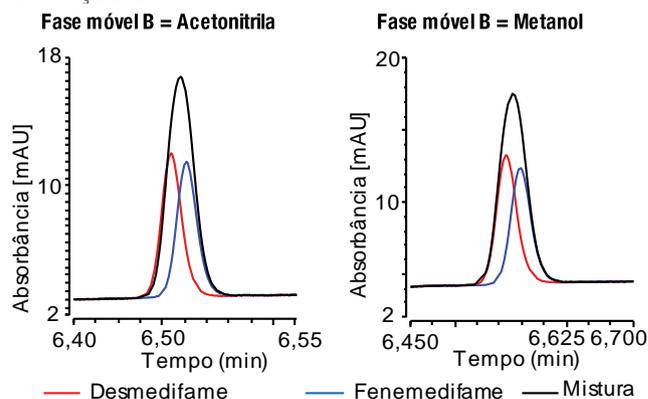


Figura 1. Separação cromatográfica de desmedifame e fenemedifame. A detecção dos picos foi com base em UV (254 nm). Usando acetonitrila, obteve-se uma resolução de 0,40; usando metanol, obteve-se uma resolução de 0,36 (de acordo com EP).

A detecção por MS geralmente consegue superar o problema da resolução cromatográfica insuficiente já que os analitos são detectados seletivamente através de suas respectivas massas moleculares. Consequentemente, os analitos podem ser separados e analisados individualmente por meio de cromatogramas de íons extraídos (EICs) suando as suas massas moleculares específicas.

Infelizmente, o desmedifame e o fenemedifame possuem a mesma massa molecular (tabela 1), dessa forma, a detecção de espectrômetros de massa não consegue distinguir de imediato os dois compostos. Entretanto, eles possuem estruturas químicas diferentes (figuras 2A e 2B), que podem ser exploradas para a separação de espectrômetros de massa.

Isso é feito rotineiramente com os espectrômetros de massas triplo quadrupolo, em que os compostos são fragmentados dentro do espectrômetro de massa e os fragmentos derivados dos compostos são detectados logo em seguida.

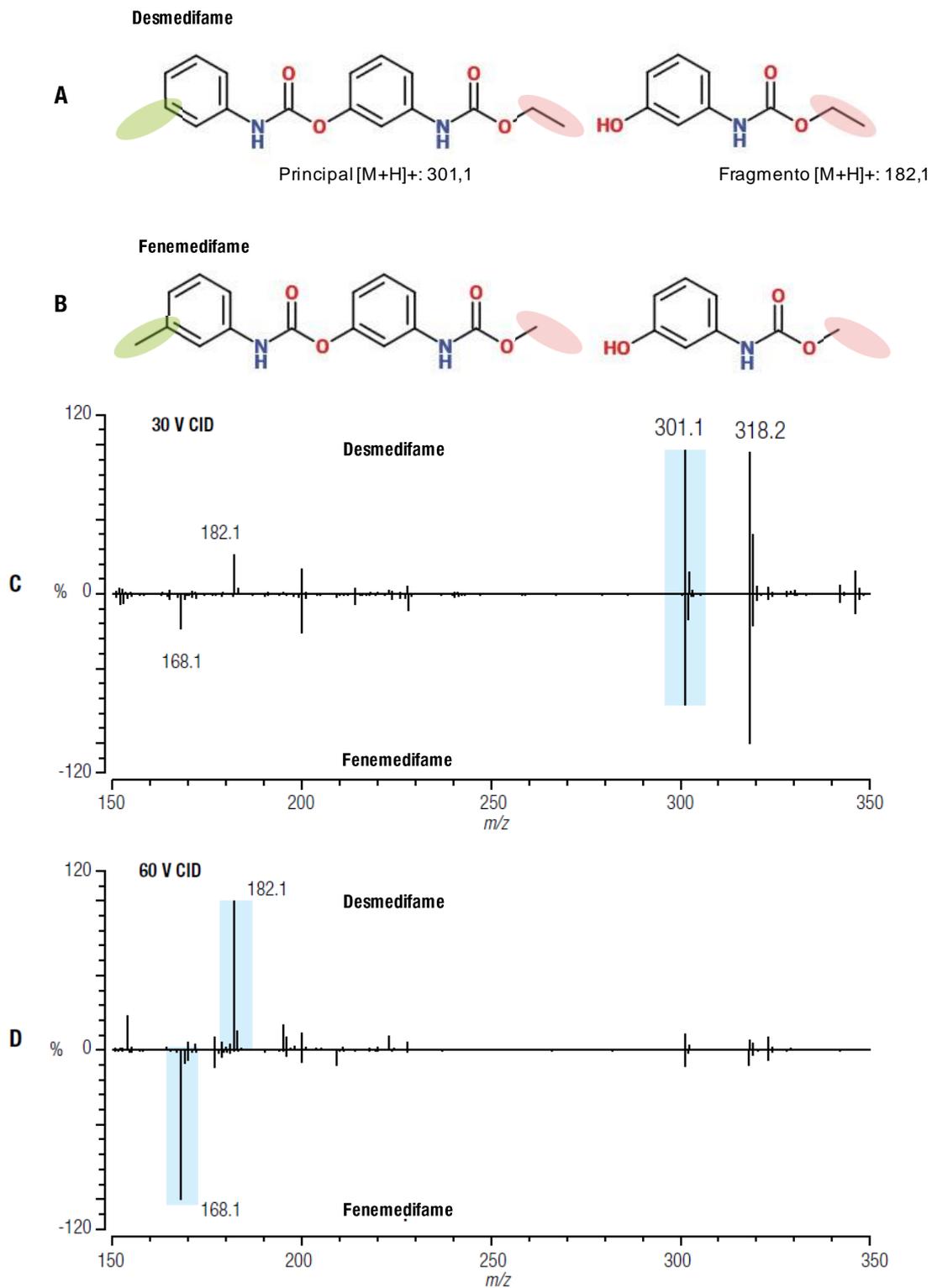


Figura 2 (A e B). Estruturas químicas do desmedifame e fenemedifame e seus respectivos fragmentos detectáveis. As diferenças estruturais dos dois compostos e seus respectivos fragmentos estão indicadas em verde e vermelho. As massas monoisotópicas de espécies protonadas, carregadas individualmente estão indicadas abaixo das estruturas químicas.

Figura 2 (C e D). Gráficos espelhos dos espectros das massas por verificação completa de desmedifame (superior) e fenemedifame (inferior) com baixa tensão (30 V) e alta tensão (60 V) CID na fonte. No CID com tensões de 30 V, os compostos protonados ( $m/z$  301,1) e seus adutos de amônia ( $m/z$  318,2) são as espécies dominantes. No CID com tensão de 60 V, os respectivos fragmentos,  $m/z$  182,1 para desmedifame e  $m/z$  168,1 para fenemedifame são as espécies dominantes.

Essa abordagem é denominada monitoramento de reação seleccionada (SRM). Ela requer um primeiro quadrupolo para a seleção do composto, um segundo quadrupolo atuando como célula de fragmentação e um terceiro para a detecção de fragmentos específicos. Portanto, isso não pode ser realizado com um espectrômetro de massa de quadrupolo único. Contudo, o detector de massa ISQ EC/EM oferece uma alternativa. Pode-se adicionar uma tensão de offset (desvio) ao tubo de transferência de íons e o cone do skimmer (figura 3). Isso resulta em uma aceleração mais rápida dos íons no octopolo Q00. Ao passar por ele, os íons poderão colidir com as moléculas do nitrogênio residual e, devido ao aumento de sua velocidade, fragmentar de forma semelhante à célula de colisão de um espectrômetro de massas triplo quadrupolo. Por isso, o processo é chamado de dissociação induzida por colisão na fonte ou CID na fonte. A tensão do potencial adicional determina a velocidade dos analitos e, conseqüentemente, se fragmentarão ou não na colisão com as moléculas de nitrogênio. O CID na fonte em tensões baixas (até aproximadamente 30 V) principalmente a perda de adutos, como o sódio, potássio, amônia ou solvente é detectável, muitas vezes resultando em intensidades de sinal maiores para as espécies de analitos protonados. Em tensões mais altas (acima de 30 V), as ligações covalentes dentro das moléculas podem se romper e ocorrer a fragmentação real. Aumentando mais a tensão (acima de 60 V) os próprios fragmentos poderão fragmentar. O padrão de fragmentação e as tensões ideais para CID na fonte dependem da respectiva força das ligações covalentes dentro das moléculas de analito. As ligações lábeis tendem a fragmentar em tensões mais baixas da CID na fonte.

A fim de examinar se a fragmentação por CID na fonte era viável para os nossos analitos, foram analisadas amostras puras de desmedifame e fenemedifame. Um método de cinco minutos (tabela 6) usando uma coluna Hypersil GOLD de 5 cm (tabela 2) foi usada para examinar se os dois compostos exibiam padrões de fragmentação distintos. A aquisição de MS foi realizada no modo de verificação completa ( $m/z$  150–350) para identificar fragmentos desconhecidos. Foram ensaiadas tensões da CID na fonte entre 20 e 100 V. Para CID na fonte em tensões baixas, os analitos intactos ( $m/z$  301,1) e seus adutos de amônia ( $m/z$  318,2) são claramente detectáveis (figura 2C). Aumentando a tensão da CID na fonte resultou em redução dos sinais dos analitos intactos ao mesmo tempo que surgia sinais novos: para desmedifame em  $m/z$  182,1 e para fenemedifame em  $m/z$  168,1 (figura 2D). As duas massas de fragmentos foram específicas para cada analito e não estavam presentes para o outro composto. Isso indicou que ao aumentar a tensão da CID na fonte fragmentou de forma eficiente os analitos e que somente os fragmentos  $m/z$  182,1 e  $m/z$  168,1 puderam ser usados para detecção seletiva. Considerando as estruturas químicas dos analitos, a estrutura dos fragmentos observados pôde ser deduzida (figuras 2A e 2B). O desmedifame contém um grupo metóxi e o fenemedifame, um grupo etóxi, resultando na diferença de massa de 14 Da para os dois fragmentos, que foi detectada.

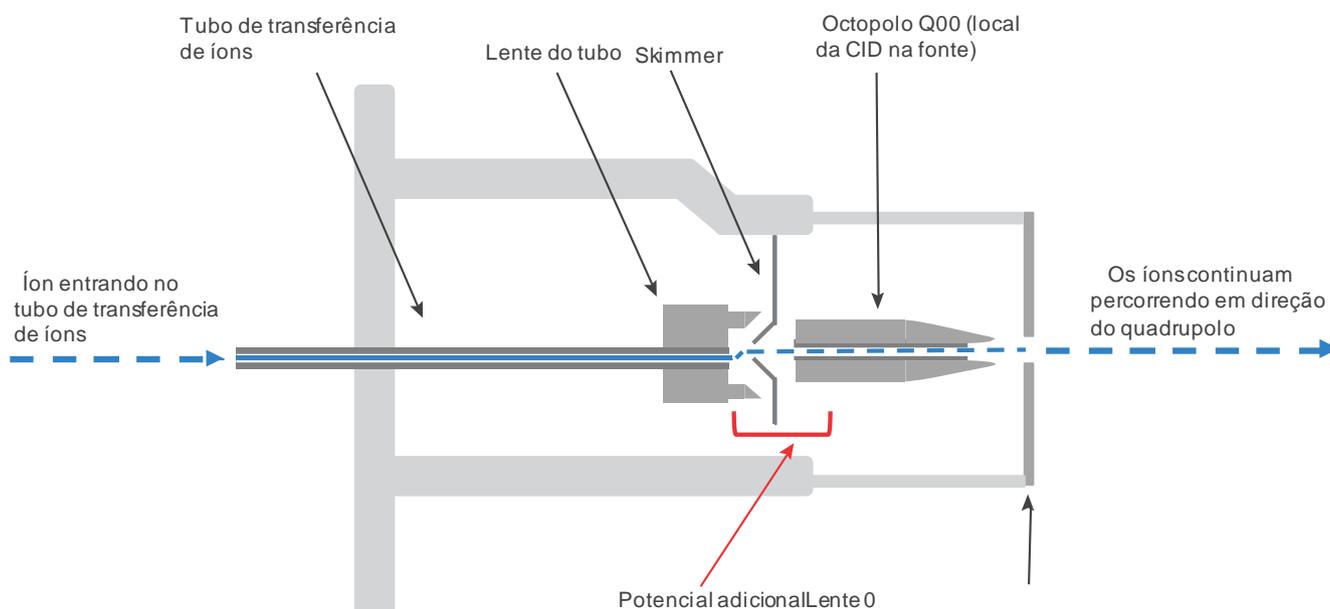


Figura 3. Dissociação induzida por colisão (CID) na fonte. Os componentes envolvidos na facilitação da CID na fonte estão representadas de forma esquemática. Uma tensão de offset (desvio) é aplicada ao tubo de transferência de íons, lente do tubo e skimmer. Isso resultou em um aumento do potencial entre eles e o octopolo Q00 acelerando ainda mais os íons viajando em direção ao octopolo Q00. Dentro do octopolo, as moléculas de analito poderão colidir com as moléculas do nitrogênio residual e fragmentar se a energia cinética das moléculas forem alta o suficiente. Fragmentos com a o mesmo estado de carga da molécula principal continua a viajar em direção do quadrupolo.

Depois de identificar os fragmentos únicos, a detecção dos compostos intactos e fragmentados foi otimizada. As amostras puras de desmedifame e fenemedifame foram analisadas com o método de 5 minutos usado anteriormente, mas as configurações de detecção por MS foram alteradas (tabela 7). Ao invés das verificações completas, foram realizadas verificações por SIM para a massa intacta e fragmentos. Diferentes tensões para CID na fonte foram ensaiadas para identificar os valores que oferecem a melhor intensidade de sinal (tabela 7):

- Aumentar a tensão da CID na fonte de 0 para 30 V resultou em aumento do sinal para as massas intactas de desmedifame e fenemedifame (figuras 4A e 4B). Ao mesmo tempo, a fragmentação de analito se torna detectável na tensão de 30 V para CID na fonte. O aumento da intensidade da massa intacta ao aumentar a tensão da CID na fonte de 0 para 30 V se deve à remoção de adutos. O aduto de amônia ( $m/z$  318,2) é a massa dominante em 0 V e em 30 V a sua intensidade é inferior a  $m/z$  301,1 (figuras 4C e 4D, página 8).
- Aumentar ainda mais a tensão da CID na fonte resulta em diminuição do sinal da massa intacta e aumento do pico da massa dos fragmentos, em 60 V os dois fragmentos de analito exibem a intensidade mais alta. Acima de 60 V os sinais  $m/z$  182,1 e 168,1 diminuem, pois fragmentam eles mesmos.

A otimização inicial foi feita com gradações de 10 V, que geralmente é suficiente para as aplicações rotineiras. Neste caso, foi conduzida uma segunda rodada de otimização, em que a otimização da tensão da CID na fonte foi realizada de 20 a 40 V (para os analitos intactos) ou 50 a 70 V (para os fragmentos) em gradações de 2 V. Isso resultou no valor ideal de 28 V para os analitos intactos e 58 V para os fragmentos (os dados não são exibidos).

Por último, as configurações otimizadas de MS, em combinação com a coluna Hypersil GOLD de 10 cm e o gradiente linear de 10 minutos (tabela 8), foram aplicadas às amostras contendo diversas proporções para desmedifame e fenemedifame (tabela 9, página 9).

Com a detecção com base em UV, a mistura dos dois analitos resultou em um pico cromatográfico único que era um pouco mais amplo do que os picos observados para as amostras puras, mas sem exibir formato de pico incomum, como picos com cauda ou picos com frente (figura 5 parte superior, página 9). Dessa forma, seria impossível determinar se o pico observado continha mais do que um analito. O mesmo vale para a detecção de espectrômetros de massa dos íons principais (dados não exibidos). Usando as verificações de SIM dos dois fragmentos permitiram a detecção seletiva dos dois analito (figura 5 parte inferior, página 9). As amostras puras exibiram alta seletividade. Nenhum fragmento de desmedifame foi detectável na amostra de fenemedifame e vice versa. A análise das misturas das amostras resultaram em detecção seletiva dos dois componentes, indicando claramente que o desmedifame e o fenemedifame podem ser facilmente analisados em paralelo.

## Conclusão

A espectrometria de massas aumenta a confiança dos dados cromatográficos fornecendo a massa molecular dos analitos detectados. Em combinação com o tempo de retenção do analito, geralmente é suficiente para a confirmação de massa. No entanto, em alguns casos são necessárias informações adicionais. Caso o tempo de retenção e a massa molecular não sejam distintos, a seletividade adicional se faz então necessária. Com os detectores de massa ISQ EC ou EM, isso pode ser obtido usando fragmentação por CID na fonte. Aplicar tensões apropriadas para CID na fonte resulta em fragmentação do íon principal e, na maioria dos casos, íons de fragmentos distintos que podem ser usados para detectar seletivamente os analitos isobáricos de co-eluição.

## Agradecimentos

O desmedifame e fenemedifame foram gentilmente cedidos por Dr. Kalle Uroic, Bayer AG, Monheim, Alemanha.

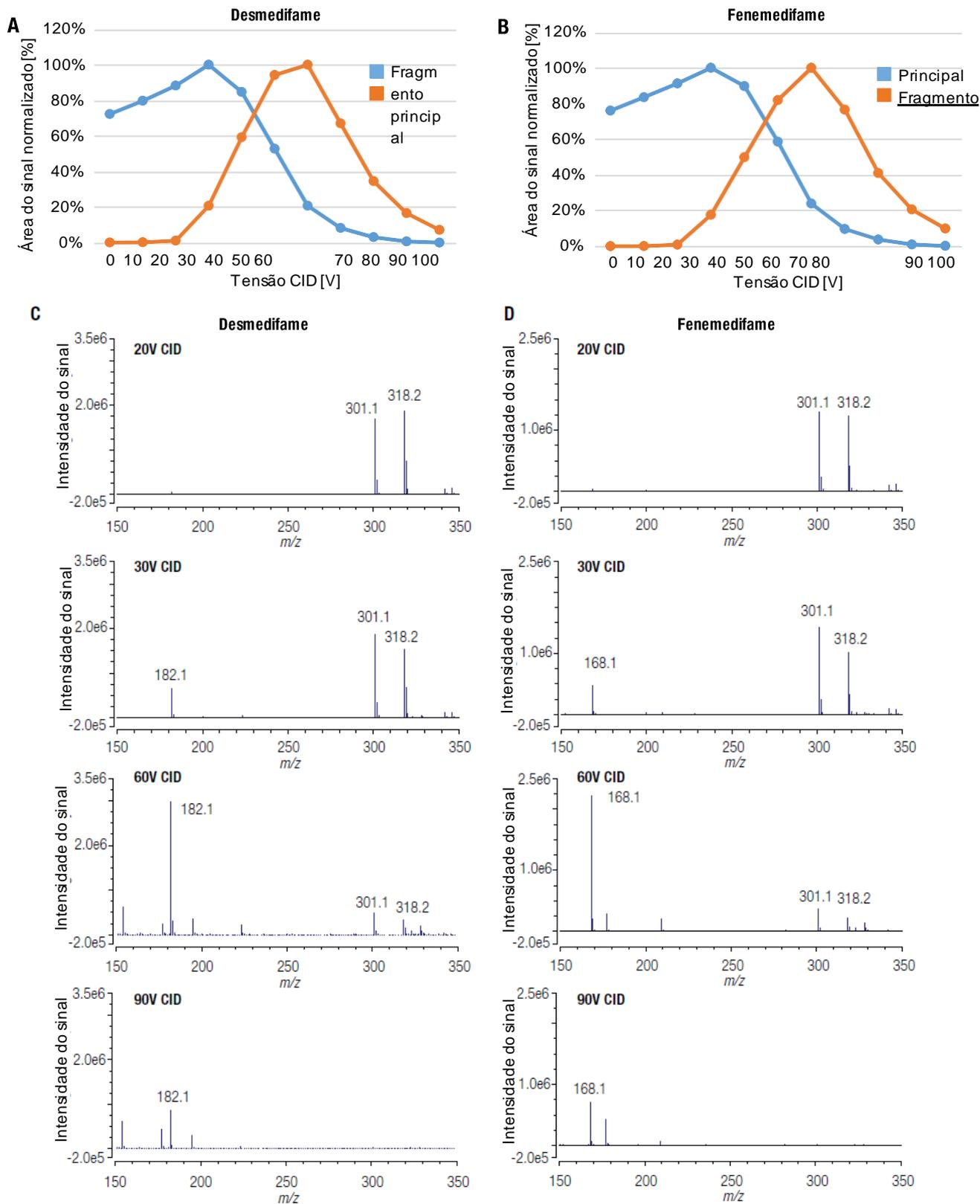


Figura 4. Otimização da eficiência de fragmentação. A e B. Intensidades do sinal das verificações por SIM para íons principais e íons de fragmento em diferentes tensões para CID. C e D. Espectros representativos das massas em verificação completa nas tensões de 20, 30, 60 e 90 V mostrando a diminuição dos íons principais com o aumento da tensão da CID e aumento inicial dos íons de fragmento com o aumento da tensão da CID e a diminuição posterior com a CID em tensão de 90 V.

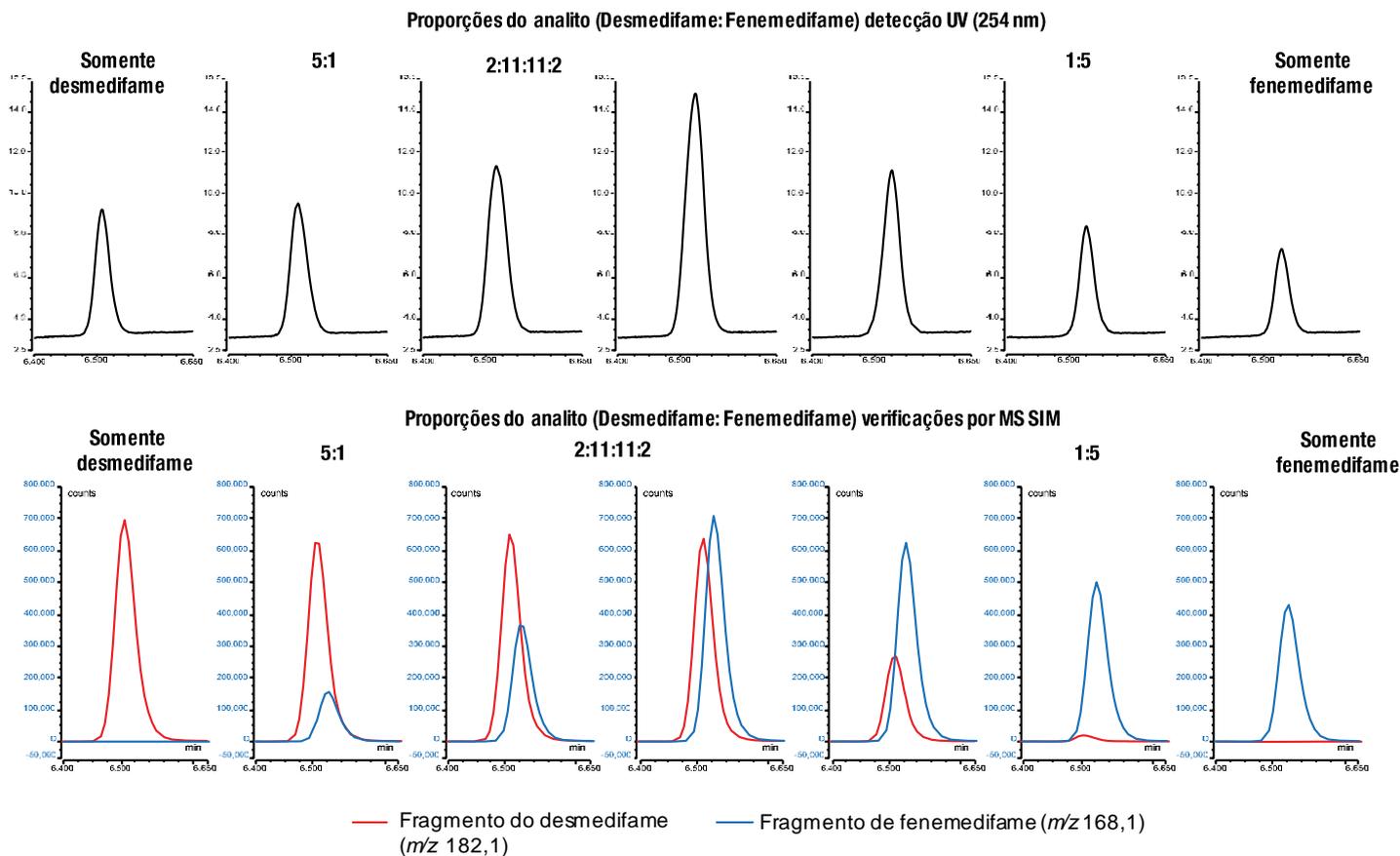


Figura 5. Análise das misturas das amostras com diferentes proporções de desmedifame e fenemedifame. As proporções das misturas das amostras estão indicadas na parte superior, os cromatogramas UV são mostrados no meio e as verificações SIM sobrepostas dos fragmentos são mostradas na parte inferior.

Tabela 9. Proporção dos analitos e quantidades de amostras usadas para verificação da detecção de analitos seletivos

Proporção (Desmedifame: Fenemedifame)	Quantidade na coluna	
	Desmedifame	Fenemedifame
Pura	10 ng	-
5:1	10 ng	2 ng
2:1	10 ng	5 ng
1:1	10 ng	10 ng
1:2	5 ng	10 ng
1:5	2 ng	10 ng
Pura	-	10 ng

Saiba mais em [thermofisher.com/SingleQuadMS](http://thermofisher.com/SingleQuadMS)

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC