

# Cromatografia de Líquidos e Interface LC-MS\*

ALEXANDRE J.C.D. BRITO\*\*,  
PAULO J. SALVADOR\*\*\*  
E RAFAEL B. CHUST\*\*\*\*

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem-se verificado um constante desenvolvimento da instrumentação e aplicações para Cromatografia de Líquidos (HPLC), procurando tirar o maior partido possível desta potente técnica analítica.

O objectivo deste artigo centra-se na apresentação e discussão dos desenvolvimentos levados a cabo a nível de instrumentação (sistemas de injeção de amostras, bombeamento de solventes, detecção e tratamento de dados) pelo Departamento de Investigação e Desenvolvimento de KONIK INSTRUMENTS, relatando a sua evolução em paralelo com as necessidades actuais do cromatografista.

Complementarmente, serão discutidos os últimos avanços a nível das interfaces LC-MS (Cromatografia de Líquidos-Espectrometria de Massa), assinalando a sua evolução até ao estágio actual e as tendências futuras neste campo analítico.

## 2. O CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS

Vários passos se verificaram com o decorrer dos anos relativamente à técnica e à instrumentação para cromatografia de líquidos, onde há a salientar:

- a primeira experiência em cromatografia de líquidos, utilizando como meio impulsor a gravidade, por M. S. Tswett (1872-1919) – tido como o “pai da cromatografia” – em 1906, na qual se levou a cabo a separação de pigmentos vegetais, conseguindo purificar a clorofila por cromatografia de adsorção;

- o primeiro Prémio Nobel (Química) para a Cromatografia, obtido por A. J. P. Martin e R. L. M. Synge (Reino Unido), em 1952;

- a construção do primeiro cromatógrafo de líquidos, em 1964, por Csaba Horváth (1930-), o qual permitia pressões de trabalho da ordem de 4000 psi (270 atm).

e passando pela primeira separação por gradiente de solventes (1967 – Csaba Horváth – EUA) até aos instru-

mentos, acessórios e consumíveis actualmente em comercialização, muitas barreiras tecnológicas foram ultrapassadas e muitos problemas analíticos resolvidos.

### 2.1 – Configuração de um Cromatógrafo de Líquidos Moderno

A configuração de um cromatógrafo de líquidos engloba pelo menos quatro componentes fundamentais:

- Sistema de Injeção ou Injetor
- Sistema de Bombagem ou Bomba de Solventes
- Sistema de Detecção ou Detector
- Sistema de Tratamento de Dados

De seguida, procuraremos salientar os passos mais importantes na sua evolução até ao estágio actual.

### 2.2 – Sistemas de Injeção

Relativamente aos sistemas de injeção, a evolução foi na realidade relativamente pequena, dado que os engenheiros industriais obviaram muito dos passos necessários para ir de encontro aos requisitos exigidos pelos cientistas e investigadores em cromatografia de líquidos, os quais afortunadamente apenas tiveram de adaptar válvulas vulgarmente utilizadas na indústria para a injeção cromatográfica.

As primeiras válvulas utilizadas por Csaba Horváth foram as válvulas “deslizantes” de 4 entradas, onde se dispunha de dois canais alternativos: um de injeção ou carga de amostra (load) e outro de injeção no cromatógrafo (inject). Com o aumento de pressão, estas válvulas demonstraram-se limitadas por se revelarem pouco estanques.

Actualmente, são universalmente utilizadas as válvulas de injeção de 6 vias, cuja concepção e/ou fabricante permitem que sejam válvulas de injeção de volume fixo ou de volume variável – dependendo a sua funcionalidade da sua própria estanquidade.

### 2.3 – Sistema de Bombagem

Foi precisamente em relação aos sistemas de bombagem que sur-

giram as primeiras limitações tecnológicas no desenvolvimento dos cromatógrafos de líquidos.

Como se afirmava em 1941, num artigo no *Journal of Biochemistry* (1358-1368, 1941), da autoria de A. J. P. Martin (1910-) e R. L. M. Synge (1914-), em cromatografia de líquidos “a única forma de obter a mais baixa HETP (altura equivalente a um prato teórico) será utilizando partículas com a menor dimensão possível e uma elevada diferença de pressões ao longo da coluna”.

Assim sendo, e havendo a possibilidade tecnológica de obter partículas de pequenas dimensões (menos de 60 microns), seria necessário desenvolver um sistema de bombagem que permitisse gerar e suportar altas pressões na cabeça da coluna, por forma a garantir uma diferença de pressões entre esta e a pressão à saída da mesma (cujo valor será de 1 a 5 atm), gerando ainda pulsações de fluxo tão reduzidas quanto possível.

Assim, as características fundamentais de um Sistema de Bombagem deverão ser as seguintes:

- fluxo estável e isento de pulsações, por forma a prevenir contribuições indesejáveis a nível do sistema de detecção;
- ampla gama de fluxos, permitindo uma maior flexibilidade;
- reprodutibilidade do volume deslocado, por forma a permitir reprodutibilidade de tempos de retenção, salientando as características qualitativas da cromatografia de líquidos;
- resistência a altas pressões (400 a 500 atm), pelas razões previamente enunciadas.

### 2.3.1 – Sistema de Bombagem de Pistão Simples

O primeiro sistema utilizado, no fim da década de 50 – ainda antes de Csaba Horváth – baseou-se numa bomba de pistão simples, cuja concepção se inspirou nas bombas de seringa, a qual se completava com a fase móvel desejada e posteriormente seria despejada à cadência e consequentemente ao fluxo desejado.

As vantagens óbvias de tal sistema residiam na inexistência de pulsações, dado que o movimento de esvaziamento do pistão é constante, e a facilidade de controle de fluxos, uma

vez que apenas temos de controlar a velocidade linear de um único eixo.

Tais vantagens eram contrabalançadas por um rol de várias desvantagens, entre as quais se contam a necessidade de completar o cilindro onde se movimenta o pistão ao fim de cada cromatograma e a óbvia dificuldade em garantir uma elevada estanquidade, a despressurização do sistema sempre que se completa o cilindro, pondo em causa a estabilidade do leito cromatográfico, a dificuldade no desenvolvimento de métodos, dado ser necessário trabalhar com o cilindro completo com uma fase móvel de dada composição, obrigando, caso não seja a fase mais adequada à separação, a reencher-lo ao fim de cada cromatograma, redundando em falta de flexibilidade no desenvolvimento de aplicações e a um gasto suplementar de solventes e tempo e, por último, o aparato instrumental necessário, dado que sendo as dimensões das partículas relativamente elevadas (40-60 microns contra os 3-5-10 microns actuais), os fluxos deveriam ser forçosamente baixos para permitir uma boa resolução e por outro lado os tempos de análise desusadamente elevados – actualmente, separamos 4 ácidos nucleicos em 5 minutos a um fluxo de 1 ml/min (o que implica um gasto de cerca de 5 ml de eluente), enquanto a mesma separação tomava mais de 2 horas a 0,2 ml/min (o que implica 5 vezes mais gasto de eluente), bem como a quase impossibilidade de operação em gradiente de solventes, por todas as razões anteriormente referidas.

De seguida, no início da década de 60, foram desenvolvidos os primeiros sistemas baseados em bombas de pistão simples – entre os quais se conta o sistema de Csaba Horváth – cuja operação se baseia no movimento de vai-vém de um pistão numa câmara de volume limitado, dispondo de duas válvulas anti-retorno (à entrada e à saída), e que, por forma a diminuir as pulsações, utiliza uma velocidade de avanço (impulsão de solvente) consideravelmente mais lenta (cerca de 8 a 10 vezes) que a velocidade de retrocesso (alimentação do pistão). Tal sistema provou-se fiável, resistente e resolveu tecnologicamente (pela incorporação das válvulas anti-retorno e vedantes de alta resistência) um dos problemas maiores da cromatografia de líquidos – a alta pressão de trabalho. Outra vantagem óbvia é a possibilidade de utilização de duas ou mais bombas em paralelo para obtenção de gradientes de solventes. No entanto, tal sistema (ainda utilizado por alguns fabricantes actuais, dada a sua simplicidade e baixo

custo), tem uma desvantagem inerente à sua própria concepção: a geração de pulsos, os quais transmitidos ao detector, dão origem a picos “fantasmas”, os quais não sendo demasiado notados em detectores espectrofotométricos (UV-VIS e fluorimétricos), impedem a sua utilização com detectores altamente sensíveis a pulsos, como sejam os detectores de índice de refração diferencial, electroquímico, de condutividade electrolítica e, o mais sensível de todos, o espectrómetro de massa (cujas razões serão explanadas mais adiante).

### 2.3.2 – Sistema de Bombagem de Pistão Duplo

No último estágio de desenvolvimento, que é o actual, o sistema de bombagem utilizado é o de duplo pistão de movimento recíproco, que tal como o sistema de pistão simples anteriormente descrito, dispõe de distintas velocidades consoante a fase em que se encontram – mais lenta quando em fase de impulsão e mais rápida quando em fase de carga.

Este sistema apresenta vantagens sobre todos os demais, dado que, dispondo das mesmas características mecânicas das bombas de pistão simples, suprime as pulsações através do movimento alternado dos seus pistões (carga pistão 1 / descarga pistão 2 seguida de descarga pistão 1 / carga do pistão 2).

Resumidamente, temos como vantagens fundamentais dos sistemas de duplo pistão recíproco, e quase como extrapolação do sistema de pistão simples, uma relativa simplicidade mecânica, elevada fiabilidade, possibilidade de operar a altas pressões e ausência de pulsações.

Os cromatógrafos de líquidos KONIK HPLC 500 B utilizam o sistema de bombagem de duplo pistão recíproco em série, ao que adicionamos uma velocidade diferencial de movimento de pistão com o fim de reduzir as variações de pressão (pulsações). O princípio de funcionamento consiste em utilizar duas câmaras e apenas duas “check valves” (válvulas anti-retorno): uma à entrada do pistão 1 (ou de alimentação) e outra à saída do pistão 2 (ou de bombagem). Além disso, o pistão 1 trabalha a uma velocidade cerca de 30% mais rápida que o pistão 2 – tal resulta em que evitamos os momentos “mortos” do pistão 2 (que devido à sua menor velocidade quase não apresenta pulsações) garantindo uma bombagem constante através do pistão 1 (muito mais rápido porém muito mais pulsante).

Como exemplo das unidades mais modernas, podemos referir que as características fundamentais do sistema de bombagem do cromatógrafo de líquidos KONIK HPLC 500 B são as seguintes:

- total ausência de pulsações em toda a gama de fluxos, permitindo a operação em HPLC *microbore* e analítica, dado o conceito dinâmico do movimento dos pistões;

- opções de cabeças analítica (0,01 a 8 ml/min) e semi-preparativa (0,06 a 48 ml/min), permitindo uma maior flexibilidade na utilização do sistema;

- opção biocompatível/iônica, com peças fixas e móveis em PEEK (cabeças), Teflon (retentores), rubi (válvulas anti-retorno) e safira (pistões), permitindo a sua utilização com soluções e tampões de pH entre 1 e 14;

- possibilidade de operar a altas pressões (500 atm - 7000 psi), em quaisquer das opções (analítica, semi-preparativa ou biocompatível);

- sistema de lavagem automática de êmbolo em todas as versões, como equipamento standard, prevenindo a precipitação de tampões nos pistões e diminuindo a necessidade de intervenção/assistência técnica ao equipamento;

### 2.3.3. – Controle de Sistemas de Bombagem. Gradientes de Solventes

Outra área de desenvolvimento em que se verificou uma grande evolução foi no controle do sistema de bombagem. Nos primeiros sistemas comercializados, a selecção do fluxo efectuava-se por passos discretos, geralmente de 0.1 ml/min, por meio de um controle analógico que transmitia através de um circuito eléctrico/electrónico uma frequência de referência para o motor eléctrico.

Actualmente, apesar de alguns fabricantes utilizarem nos seus modelos de baixo de gama o sistema analógico, o controle dos cromatógrafos é efectuado por meio de um microprocessador incorporado – o qual permite não apenas controlar os caudais da bomba como também a pressão da mesma (por programação de máximos e mínimos), a programação de gradientes (sejam eles a baixa ou a alta pressão), acessórios externos (injectores automáticos, fornos de colunas, detectores programáveis, sistemas de tratamento de dados, válvulas de comutação, etc.) e outros.

A evolução dos sistemas de bombagem aponta para sistemas totalmente controlados através de um computador e por meio de um programa de aplicações (software) dedicado e de

uma interface tipo RS-232, permitindo então não só o controle de fluxos como a integração, sob o mesmo ambiente, do controle dos sistemas de detecção, injeção e tratamento de dados.

Por sua vez, o gradiente de solventes e a sua programação também contaram com uma notável evolução, principalmente no decorrer da década de 70 e 80. Os primeiros sistemas utilizados baseavam-se na técnica dos fluxos parciais, ou seja, consoante a contribuição parcial desejada de cada solvente, operava-se manualmente o fluxo de cada sistema de bombagem por forma a obter-se o fluxo final pretendido. Como facilmente se depreende, tal sistema requeria a total dedicação do seu operador, pois a obtenção de um cromatograma demorava em média 1 a 2 horas, revelando-se a sua operação totalmente contra-producente.

No início da década de 70, foram desenvolvidos os primeiros sistemas de gradientes com controle automatizado, onde se permitia controlar o fluxo de duas bombas isocráticas – cada uma delas com um dos solventes desejados – permitindo a programação da variação dos seus fluxos parciais por determinado período de tempo e por conseguinte, da composição do eluente. Este sistema é denominado sistema de gradiente binário a alta pressão e encontra-se actualmente “em vias de extinção”.

As principais vantagens do sistema de gradientes a alta pressão resumem-se à ausência de “bolhas” durante a mistura de solventes, dado que a mesma ocorre a uma pressão geralmente superior a 80-100 atm, sendo esta mistura bastante optimizada pelo facto de dar-se a alta pressão, garantindo uma elevada reprodutibilidade do método (desde que se use o mesmo sistema cromatográfico), somando por último a vantagem adicional de que em caso de avaria de uma das unidades de bombagem, continuará a dispôr-se de um cromatógrafo isocrático.

As desvantagens de um tal sistema residem na irreprodutibilidade de resultados/composições de solventes aquando da sua passagem a um sistema isocrático, dado que uma mistura a alta pressão, e considerando as distintas compressibilidades dos solventes, não tem forçosamente a mesma composição que uma mistura efectuada à pressão atmosférica, bem como a irreprodutibilidade de resultados/composições de solventes de sistema para sistema, dadas as distintas compressibilidades obtidas por distintos sistemas de bombagem. Por outro lado, temos uma maior complexidade mecânica, pela

existência de duas bombas de solventes, que devem actuar de forma coordenada e por conseguinte originando um frequente recurso a assistência técnica e um elevado custo na aquisição e manutenção, pelas mesmas razões.

Em 1984, KONIK INSTRUMENTS desenvolveu o seu segundo cromatógrafo de líquidos, o KONIK KNK-500G (precursor do KONIK HPLC-500-G e que substituiu o seu predecessor KONIK KNK-8800, lançado em 1979), onde pela primeira vez se empregou, a nível mundial, o sistema de gradientes quaternário a baixa pressão. Neste sistema, o gradiente de solventes é obtido através da abertura e fecho coordenados de uma válvula de quatro vias, a qual actua proporcionalmente à composição de eluente desejada.

As principais vantagens deste sistema em relação ao sistema de gradientes a alta pressão encontram-se ao nível da simplicidade e fiabilidade mecânica – dado que se necessita apenas de uma bomba ao invés de duas – exigindo porém um sofisticado controle por microprocessador. Como vantagem adicional, temos que a mistura dos componentes do eluente ocorre à pressão atmosférica, permitindo a directa aplicação a um sistema isocrático de um método isocrático desenvolvido por tal sistema de gradientes, misturando na composição encontrada os componentes da fase móvel, o que não ocorre com o sistema a alta pressão, dadas as distintas compressibilidades de cada um deles. A única eventual desvantagem com que nos deparamos é a necessidade de utilizar um sistema de desgasificação por aspersão de hélio para evitar a formação de bolhas de ar e otimizar a mistura dos componentes do eluente, o que em todo o caso é aconselhável em qualquer sistema cromatográfico – seja ele de mistura a alta ou de baixa pressão, de gradientes ou isocrático.

Resumidamente, temos a concluir como vantagens do sistema de gradientes a baixa pressão os seguintes factores:

- simplicidade mecânica, dado apenas necessitar de uma bomba de solventes;
- mistura de solventes à pressão atmosférica, o que garante total reprodutibilidade de composições de solventes para a sua utilização isocrática;
- total reprodutibilidade de métodos, independentemente do sistema cromatográfico, dado o já anteriormente exposto;
- custo reduzido;
- reduzidas dimensões, o que

permite uma razoável economia de espaço laboratorial;

– controle totalmente automatizado por meio do microprocessador incorporado na unidade cromatográfica, necessitando de uma mínima intervenção do utilizador;

– capacidade para gradientes de até 4 solventes.

e como desvantagens:

– necessidade de aspergir um gás inerte (usualmente hélio) nos solventes, por forma a saturá-los e prevenir a eventual formação de “bolhas” de ar durante a mistura;

– necessidade de controle por microprocessador incorporado na unidade cromatográfica.

A título de referência, os termos “high performance liquid chromatography (HPLC)” (cromatografia de líquidos de alta eficácia – CLAE), “eluição isocrática” (para descrever o uso de uma fase móvel de composição constante ao longo do tempo) e “gradiente de eluentes” (para descrever o uso de uma fase móvel de composição variável ao longo do tempo) aplicados à cromatografia de líquidos devem-se a Csaba Horváth.

## 2.4 – Sistemas de Detecção

Em relação aos sistemas de detecção, a sua evolução pode ser resumida à adaptação e adequação de equipamentos já conhecidos (espectrofotómetros, espectrofluorímetros, refractómetros, etc.) à utilização em fluxo constante, ou seja, adequando as células de fluxo contínuo a uma geometria miniaturizada que evite as contribuições de eventual refração do feixe luminoso durante a passagem da amostra (para não comprometer a sua performance) e a formação de “volumes mortos”, bem como a evolução sofrida a nível electrónico pela miniaturização requerida.

Como referência, podemos indicar que os detectores mais utilizados em cromatografia de líquidos são o detector espectrofotométrico (UV-VIS), o detector de índice de refração diferencial, o detector espectrofluorimétrico, o detector condutimétrico e o detector electroquímico ou amperométrico, chamando-se a atenção para que a investigação levada a cabo sobre novos sistemas de detecção para HPLC originou novas categorias de detectores universais e selectivos, como sejam o detector de rede de diodos (PDA), o detector de infra-vermelhos (IR e FT-IR), o detector fototérmico (PTD), o detector polarimétrico ou de rotação óptica, o



detector de foto-ionização (PID), o detector de ionização de chama (FID) e por último, o espectrómetro de massa (MS), sobre o qual nos debruçaremos em detalhe a seguir.

## 2.5 – Sistemas de Tratamento de Dados

Também os sistemas de tratamento de dados em cromatografia sofreram avanços sensíveis em relação aos sistemas de há três décadas.

Os primeiros sistemas utilizados basearam-se em registadores potenciométricos, os quais após o registo dos picos obrigavam o operador a quantificá-los manualmente por planimetria, triangulação ou pesagem.

Em meados da década de 70 assiste-se ao surgimento da primeira geração de integradores electrónicos digitais, com os quais se permite quantificar os picos automaticamente, por integração de área e/ou cálculo da altura de pico. Estes sistemas, a princípio de operação bastante complexa e limitada, deram origem aos actuais integradores, que não apenas integram áreas como também permitem a memorização de métodos e respectivas curvas de calibração para cada pico, memorização de cromatogramas e o seu reproprocessamento, selecção de diversos métodos de quantificação (área, altura de pico, padrão interno, padrão externo, adição de padrão, etc.) e dispõem já de interfaces tipo RS-232 para conexão a computadores pessoais.

Com a expansão e quase banalização verificada na utilização de computadores pessoais, no princípio da década de 80 alguns fabricantes de cromatógrafos, entre os quais se conta KONIK INSTRUMENTS, iniciaram o desenvolvimento de sistemas de tratamento de dados baseados em pacotes integrados interface A/D (analógica/digital) + programa informático (software) dedicado. Estes sistemas, além de cumprirem excelentemente as funções de um integrador de altas prestações, permitem também elaborar um arquivo de dados permanente em discos flexíveis (floppy disks) e adicionam uma maior rapidez no processamento de dados com a flexibilidade conferida pelos actuais programas informáticos para processamento de texto, criação de base de dados e folhas de cálculo e conexão a sistemas em rede tipo LAN (Local Area Network) e/ou LIMS (Laboratory Information Management System), para gestão integrada e total automatização do laboratório. Em 1992, a KONIK iniciou a comercialização do sistema de tra-

tamento de dados computadorizado KONIKROM, que constitui uma evolução dos seus precedentes PEAKMASTER e EASYCHROM, o qual permite na sua versão básica o tratamento de dados de até 4 detectores e a expansão até um máximo de 16 detectores simultaneamente, permitindo o armazenamento de até 100 métodos e respectivas curvas de calibração para cada uma das substâncias a analisar, uma alta resolução para cromatografia capilar, um módulo opcional para GPC (Gel Permeation Chromatography) e compatibilidade com redes LAN e LIMS, tudo isto por um custo cerca de 20% superior a um integrador de 2 canais.

## 3. INTERFACES LC-MS

Como fabricantes de equipamentos para cromatografia desde 1976, KONIK INSTRUMENTS teve a oportunidade de acompanhar a evolução do nível de exigências dos utilizadores das técnicas cromatográficas, as quais cresceram muito mais rápida e fortemente do que a tecnologia empregue na fabricação das unidades instrumentais, concretamente a nível da sensibilidade e especificidade de detecção de compostos.

Por outro lado, os níveis de sensibilidade, especificidade e a possibilidade de somar as suas capacidades analíticas qualitativa e quantitativa para compostos orgânicos da espectrometria de massa (MS), sempre cativaram os cromatografistas, ansiosos por poder juntar a estas a capacidade separativa da cromatografia, pelo que ainda na década de 60 se desenvolveram as primeiras interfaces GC-MS (cromatografia de gases – espectrometria de massa).

Desde o início se revelaram críticos os problemas de introdução de um fluxo de gás na câmara de ionização do espectrómetro de massa, a qual se encontra sob vácuo, dado que os analisadores de massa necessitam de um valor de vácuo relativamente elevado – da ordem dos  $10^{-5}$  a  $10^{-6}$  mbar para trabalharem de forma optimizada e isenta de interferências de campos electrostáticos e magnéticos externos. Não havendo ainda acesso à tecnologia das colunas capilares, foram criados distintos métodos de acoplamento, entre os quais se contam as interfaces GC-MS tipo "open-split", com o intuito de reduzir a quantidade de gás a introduzir no espectrómetro de massa. Actualmente as interfaces GC-MS são efectuadas pela própria coluna capilar, inserida num "tubo" termostaticado (para prevenir uma indesejada condensação), dados os baixos fluxos de gás

portador a que se opera a separação cromatográfica em colunas capilares.

A espectrometria de massa, como técnica analítica quantitativa e qualitativa de alta sensibilidade e especificidade, dá-nos não só uma indicação precisa do peso molecular da substância em análise como também uma informação extraordinariamente detalhada da sua forma estrutural, traduzindo-se numa "impressão digital" real da substância em análise. Combinada de forma dinâmica com a cromatografia de gases, a espectrometria de massa dá origem ao método analítico mais específico e sensível de caracterização de substâncias presentes numa mistura volátil complexa, mesmo se estivermos em presença de picos cromatográficos sobrepostos.

Por outro lado, a cromatografia de líquidos permite levar a cabo a separação de substâncias que não são suficientemente estáveis e/ou voláteis para serem analisadas por GC, o que infelizmente ocorre com a vasta maioria de compostos orgânicos conhecidos; desta forma, a combinação dinâmica da espectrometria de massa com a cromatografia de líquidos estende a gama de substâncias que podem ser analisadas por espectrometria de massa, que com a sua especificidade, permite obter poder adicional a nível analítico na resolução de substâncias com eluição sobreposta, o que não se pode obter em LC com detecção convencional (espectrofotometria de UV-VIS, fluorescência, etc.).

Com a tentativa de acoplar a cromatografia de líquidos à espectrometria de massa, os problemas de optimizar uma interface agravaram-se, dada a quase impossibilidade de manter fluxos suficientemente baixos a pressões tão elevadas de trabalho no LC e à dificuldade em transferir os solutos para a fase gasosa, fundamental na câmara de ionização (sob vácuo), pelo que os fabricantes se viram na necessidade de desenvolver interfaces dedicadas para conexão LC-MS e que diferem em muito da simplicidade previamente referida das conexões GC-MS.

As interfaces LC-MS que de seguida discutiremos são as seguintes:

- Moving Belt (MB)
- Continuous Flow FAB (CF-FAB)
- Thermospray / Plasmaspray (TSP/ PSP)
- Particle Beam (PB)
- Electrospray (ESI)

De salientar que a maior parte destas interfaces são compatíveis tanto com espectrómetros de massa quadrupolares como de sector magnético. A opção por um ou outro sistema será definida pela capacidade analítica

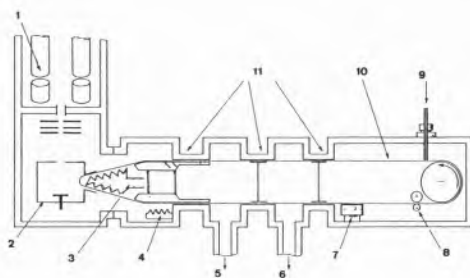


Fig. 1

- 1 - Analisador
- 2 - Fonte EI/CI
- 3 - Vaporizador de Amostra
- 4 - Escova do Vaporizador
- 5 - Ligação à Bomba de Vácuo 2
- 6 - Ligação à Bomba de Vácuo 1
- 7 - Escova
- 8 - Rolamento Director
- 9 - Amostra proveniente do HPLC
- 10 - Cinta Condutora
- 11 - Vedantes do Túnel

desejada; enquanto que a máxima especificidade e sensibilidade em MS se obtém com espectrómetros de massa de sector magnético de alta resolução (geometrias BE, EB ou EBE) ou sistemas híbridos MS-MS (geometrias QQ, EBQ, EBEQ ou ainda EBEBE), para análises de rotina será suficiente um sistema quadrupolar, que se apresenta como a solução de menor custo associada a uma excelente fiabilidade, reprodutibilidade e robustez.

### 3.1 – Moving Belt (MB)

A interface "Moving Belt" (Cinta Móvel) (fig. 1) foi a primeira interface LC-MS idealizada e colocada em funcionamento de forma bem sucedida, tendo sido também a primeira interface comercialmente disponível.

Tal sistema, hoje praticamente em desuso, consiste em depositar o eluente proveniente do LC sobre uma cinta em movimento contínuo – uma plataforma rolante – transportando a amostra até à fonte de ionização do espectrómetro de massa.

Durante o processo de transferência, a substância dissolvida no eluente é depositada sobre a superfície da cinta que à entrada do espectrómetro de massa, na fonte de ionização EI/CI, é instantaneamente vaporizado.

Por forma a evitar (ou atenuar) o "efeito de memória" inter-amostras,

são utilizados os sistema de "escovas" ou de sobreaquecimento da cinta, na tentativa de retirar da superfície da mesma quaisquer vestígios da amostra que possam ainda existir após a vaporização instantânea desta.

Como principais vantagens do "Moving Belt" temos a destacar:

- permite obter espectros "clássicos" em ionização EI e CI, possibilitando a sua posterior pesquisa em bibliotecas de espectros;

- é compatível com técnicas de ionização que actuam sobre superfícies, tais como o FAB e o Cs-SIMS;

- permite a análise tanto de compostos ligeiramente polares como altamente polares.

Entre as suas desvantagens, contam-se as seguintes:

- elevada complexidade mecânica;

- elevada dificuldade em anular os "efeitos de memória" inter-amostras, independentemente do sistema utilizado ("escovas" ou sobreaquecimento);

- baixa sensibilidade para amostras voláteis, dado o tratamento térmico a ser sofrido pelas amostras;

- baixa tolerância a fases móveis com elevado teor de água.

### 3.2 – Continuous Flow Fast Atom Bombardment (CF-FAB)

A interface/fonte de ionização CF-FAB (Ionização por Bombardeamento Atómico de Fluxo Contínuo) (Fig. 2), usualmente referida também como Dynamic-FAB (FAB Dinâmico), consiste numa modificação das fontes de ionização convencionais por FAB ou SIMS, por forma a permitir a sua adaptação a uma situação de fluxo contínuo.

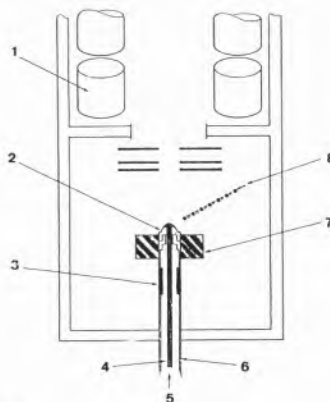


Fig. 2

- 1 - Analisador
- 2 - Extremidade da Sonda
- 3 - Isolador Térmico
- 4 - Capilar de Silica Fundida
- 5 - Amostra proveniente do HPLC
- 6 - Eixo da Sonda
- 7 - Bloco de Cobre Aquecido
- 8 - Feixe Primário

Tal modificação consiste em substituir a sonda convencional (que é resumidamente um tubo metálico dispondo de uma extremidade plana, onde se deposita uma gota de amostra) por uma sonda "oca", a qual permite que um fluxo contínuo de eluente + amostra seja bombeado até ao "alvo" do canhão de iões, situado na sua extremidade superior, o qual dispõe de um difusor adequado que regula a sua dispersão na câmara de ionização.

Ao distinguir o difusor ("alvo"), as moléculas da amostra diluídas no solvente são bombardeadas por átomos neutros (FAB) ou iões Cs<sup>+</sup> (SIMS). A ionização tem então lugar por meio do impacto atómico gerado e os iões da amostra assim formados são "extraídos" da matriz líquida e "pulverizados" na fase gasosa, permitindo a posterior análise de massas.

A ionização por FAB é considerada uma técnica de ionização "fraca", que optimiza prioritariamente a análise a nível de pesos moleculares. Por forma a optimizar o processo de ionização, o eluente usualmente contém entre 3 a 10% de glicerol.

Outro dado importante é que, por forma a manter o alto vácuo requerido na fonte de ionização, o fluxo máximo permitido por uma interface LC-MS tipo CF-FAB está limitado a 10 µl/min.

Como principais vantagens do "CF-FAB" temos a destacar:

- simplicidade mecânica;

- sendo fundamentalmente uma técnica de ionização "fraca", permite obter uma vasta informação a nível de pesos moleculares;

- permite a análise tanto de compostos polares como iónicos.

Entre as suas desvantagens, contam-se as seguintes:

- necessidade de adicionar uma elevada percentagem de glicerol à fase móvel, o que restringe o desenvolvimento de métodos em HPLC ou a necessidade de uma bomba suplementar para adição pós-coluna da quantidade de glicerol necessária, implicando maior complexidade mecânica;

- limitações críticas a nível de fluxos de solvente, os quais devem ser inferiores a 10 µl/min;

- necessidade de recorrer a colunas capilares para HPLC caso se deseje proceder a análises LC-MS "on-line", dadas as sérias restrições de fluxo;

### 3.3 – Thermospray/Plasma-spray (TSP/PSP)

A interface/fonte de ionização TSP/PSP é a técnica de conexão LC-MS

de mais vasta utilização, dada a sua simplicidade.

Tal técnica consiste em sobre-aquecer e vaporizar o eluente à entrada da fonte, o qual passa de seguida através de um pequeno orifício dando origem a um jacto tipo "aerosol", ocorrendo então a vaporização e ionização da amostra em simultâneo.

A interface/fonte de ionização TSP convencional requer um tampão volátil (electrólito) diluído na fase móvel, por forma a obter iões reactivos que permitem ionizar as moléculas da amostra em solução. Tal facto dá origem a que a ionização seja tanto mais efectiva quanto mais polar seja a amostra.

As fontes de ionização TSP modernas, denominadas Plasmaspray (PSP) (fig. 3), incorporam eléctrodos de descarga ou filamentos aquecidos que possibilitem que as amostras apolares possam ser ionizadas eficazmente. Outra inovação adicional nas actuais fontes de ionização PSP é a existência de um eléctrodo de repulsão iónica (*ion repeller electrode*) o qual dá origem a reacções de fragmentação no interior da própria fonte, o que optimiza significativamente a análise estrutural da amostra.

Como principais vantagens das fontes de ionização TSP/PSP temos a destacar:

- tal como as fontes CF-FAB, as fontes TSP/PSP são fontes de ionização "fracas", optimizando a análise a nível de pesos moleculares;
- a incorporação de um eléctrodo de repulsão iónica permite induzir uma fragmentação molecular perfeitamente controlada;
- a ionização por TSP/PSP é a técnica mais amplamente utilizada em LC-MS, dispondo portanto de uma vasta bibliografia;
- as contribuições relativas à composição e ao fluxo do eluente são mínimas, sendo portanto as suas eventuais restrições perfeitamente negligenciáveis;
- permite a análise tanto de compostos polares como iónicos.

Entre as desvantagens desta técnica, contam-se as seguintes:

- é necessária a utilização de um tampão volátil, para optimizar a vaporização e ionização da amostra;
- as amostras devem apresentar-se isentas de matéria sólida, pois de outra forma poder-se-á obstruir o vaporizador;
- apresenta uma elevada sensibilidade à composição química da solução (solvente + amostra), a qual exerce uma elevada influência na optimização dos métodos.

### 3.4 – Particle Beam (PB)

A interface LC-MS "Particle Beam" (Feixe de Partículas) (fig. 4) consiste em um elaborado sistema que suplantou totalmente as interfaces tipo "Moving Belt" como método de eleição para ionização EI e CI em LC-MS. Tal interface distingue-se pela sua extrema facilidade de operação a qual se deve essencialmente à sua simplicidade mecânica.

O princípio de funcionamento da interface PB consiste em fazer passar o eluente através de um nebulizador pneumático (o qual consiste basicamente num tê em cujas extremidades se conecta respectivamente o HPLC, uma garrafa pressurizada de hélio e a câmara de dissolução), de forma a produzir uma nuvem de vapor formada por gotículas pulverizadas da mistura amostra + solvente. Estas gotículas são transportadas através de uma câmara de dissolução aquecida, onde se inicia a formação de pequenos agregados de partículas da amostra, sendo os solventes volatilizados e retirados por meio de um separador de vácuo diferencial de dois estágios, cujo conceito é muito similar ao "jet separator" utilizado em GC-MS. As partículas remanescentes, que constituem a amostra a analisar, são seguidamente introduzidas na fonte de ionização EI/CI onde são vaporizadas e ionizadas.

Os espectros obtidos ao utilizar uma interface PB seguida de ionização EI/CI dispõem de uma informação a nível estrutural consideravelmente mais completa que a obtida por ionização TSP/PSP, pelo que estas técnicas são consideradas complementares.

Como principais vantagens da interface PB LC-MS temos então a destacar:

- simplicidade mecânica, ha-

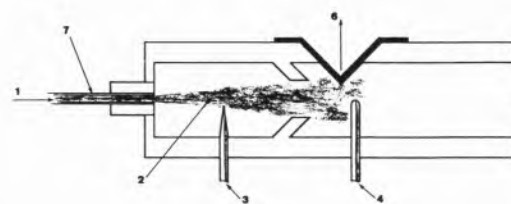


Fig. 3

- 1 - Amostra proveniente do HPLC
- 2 - Spray de Aerosol
- 3 - Eléctrodo de Plasmaspray
- 4 - Eléctrodo Repulsor
- 5 - Ligação à Bomba de Vácuo
- 6 - Entrada para o Analisador
- 7 - Vaporizador Capilar Aquecido

vendo por isso substituído quase totalmente a interface "Moving Belt";

– permite obter espectros "clássicos" em ionização EI e CI, possibilitando a sua pesquisa em bibliotecas de espectros;

– as contribuições relativas à composição e ao fluxo do eluente são mínimas sendo portanto as suas eventuais restrições perfeitamente negligenciáveis;

– permite a análise tanto de compostos ligeiramente polares como fortemente polares.

Entre as suas desvantagens, contam-se as seguintes:

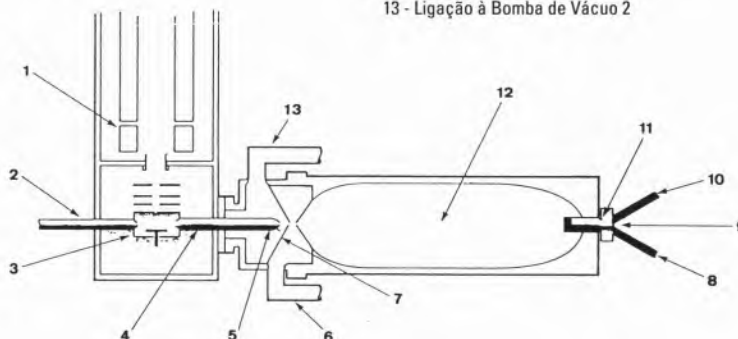
- é necessário que as amostras seja apenas parcialmente voláteis, pois de outra forma grande parte será arrastada juntamente com o solvente;
- é bastante restrita a utilização de tampões insolúveis, os quais são vulgarmente utilizados em HPLC.

### 3.5 – Electrospray (ESI)

A interface/fonte de ionização Electrospray (fig. 5) é a técnica mais

Fig. 4

- 1 - Analisador
- 2 - Linha de Transferência de Gases
- 3 - Fonte EI/CI
- 4 - Linha de Transferência
- 5 - Skimmer 2



- 6 - Ligação à Bomba de Vácuo 1
- 7 - Skimmer 1
- 8 - Entrada de Hélio
- 9 - Nebulizador
- 10 - Amostra proveniente do HPLC
- 11 - O-Ring
- 12 - Câmara de Dissolução
- 13 - Ligação à Bomba de Vácuo 2



recente de combinação LC-MS, sendo a interface que tem demonstrado constituir o passo mais importante até ao momento actual no sentido de obter uma interface LC-MS "universal".

Esta fonte de ionização conta-se como a mais "fraca" entre qualquer outra até hoje desenvolvida, permitindo analisar pela primeira vez moléculas de elevada instabilidade térmica por LC-MS, sendo possível encontrar na bibliografia já existente aplicações bem sucedidas de análise de proteínas de pesos moleculares na ordem de 150.000 Dalton.

Na fonte de ionização ESI, as moléculas da amostra são simultaneamente nebulizadas e ionizadas à pressão atmosférica da seguinte forma: a solução que contém a amostra é introduzida através de um tubo capilar em aço inoxidado a poucos milímetros de um eléctrodo de forma côncava e dispozo de um orifício central, entre os quais é mantida uma diferença de potencial de 4 a 6 kV, de forma a que o solvente que emerge do capilar dá origem a um "spray" electrostático em direcção ao referido eléctrodo (fig. 6). Os iões em fase gasosa formados à pressão atmosférica pela evaporação iónica descrita são então sugados através do orifício existente no eléctrodo para o alto vácuo do espectrómetro de massa.

Um espectro "em estado bruto" de um único componente obtido por ESI frequentemente apresenta séries de picos representando iões com cargas distintas. Este tipo de dados "em bruto" são posteriormente processados pelo sistema de tratamento de dados por forma a permitir a identificação de um único pico identificativo do verdadeiro peso molecular. Por outro lado, as mais sofisticadas fontes de ionização ESI frequentemente incluem a possibilidade

de induzir fragmentações moleculares por colisão, onde a análise estrutural da amostra é o objectivo a atingir.

As fontes ESI clássicas, tal como as fontes CF-FAB, estão restrin- gidas a fluxos da ordem dos 10 µl/min. As fontes mais modernas e sofisticadas, que incluem acessórios de nebulização pneumática (sistemas similares aos utilizadores nas fontes PB) do "spray" electrostático, permitem utilizar fluxos superiores a 0.1 ml/min, constituindo assim a fonte ESI a fonte de eleição para colunas *microbore*.

As principais vantagens da interface/fonte de ionização Electrospray são as seguintes:

- o facto de ser a mais "fraca" fonte de ionização (no actual estágio de desenvolvimento tecnológico), permitindo a obtenção de uma precisão no cálculo de pesos moleculares melhor que 0.01%;

- permite a análise de moléculas com peso molecular de 100 a mais de 100.000 Dalton;

- permite induzir de forma perfeitamente controlada a fragmentação molecular;

- constitui o método de eleição para a análise de digestões enzimáticas de proteínas;

- permite a sua aplicação na análise de moléculas polares, iónicas e de elevada termo-sensibilidade.

As desvantagens desta fonte são as seguintes:

- restrição do fluxo do eluente a valores da ordem de 0.1 a 0.2 ml/min;

- requer amostras compostas por moléculas polares.

#### 4. CONCLUSÕES

Apesar do objectivo da maior parte dos investigadores e principais fabricantes seja conceber e utilizar uma interface LC-MS "universal", como pudemos verificar nenhuma delas o é.

Tal facto leva a que a maior parte dos laboratórios utilize paralelamente mais de uma das técnicas de combinação LC-MS descritas por forma a garantir a maior e mais flexível gama de potencialidades analíticas, o que implica elevados custos tanto a nível instrumental como a nível de manutenção.

Há a referir que, como fabricantes de equipamentos de cromatografia de líquidos e espectrometria de massa, o Departamento de Investigação e Desenvolvimento de KONIK INSTRUMENTS encontra-se neste momento a desenvolver intensa actividade na exploração das potencia-

lidades futuras das fontes de ionização/interface tipo electrospray na conexão HPLC-MS, pelas razões anteriormente apontadas.

#### Glossário

B - Sector Magnético  
CF - Fluxo Contínuo  
CI - Ionização Química  
E - Sector Electrostático  
EI - Ionização por Impacto Electrónico  
ESI - Ionização por Electrospray  
FAB - Ionização por Bombardeamento Atómico  
GC - Cromatografia de Gases  
HPLC - Cromatografia de Líquidos de Alta Eficiência  
LC - Cromatografia de Líquidos  
LSIMS - Espectrometria de Massa de Iões Secundários em Fase Líquida  
MB - Cinta Móvel  
MS - Espectrometria de Massa  
PSP - Ionização por Plasmaspray  
Q - Quadrupolo  
TSP - Ionização por Thermospray

#### Referências

- R. B. Chust, *Bol. Soc. Port. Quím.* **39** (1990) 43-53
- L. S. Ettre, *Int. Lab.* **21** (8) (1991) 18-24
- L. S. Ettre, *Int. Lab.* **21** (9) (1991) 18-27

#### Agradecimentos

Desejamos apresentar os nossos sinceros agradecimentos ao Eng.º Josep Mestre (Director de Investigação e Desenvolvimento de KONIK INSTRUMENTS), ao Doutor José M. Gilbert (Presidente e Director Geral do Grupo KONIK), ao Doutor Martins Montes (Director do Laboratório de Investigação Aplicada de KONIK INSTRUMENTS) e muito especialmente aos nossos numerosos clientes e utilizadores em Portugal pelo suporte prestado na elaboração deste trabalho.

\* O conteúdo deste artigo foi objecto de uma conferência sob o mesmo título no decorrer do 13.º Encontro Anual da Sociedade Portuguesa de Química (Instituto Superior Técnico, Lisboa, Janeiro 1992).

\*\* Consultor Técnico-Comercial, KONIK INSTRUMENTS (Porto)

\*\*\* Director do Laboratório de Aplicações, KONIK INSTRUMENTS (Lisboa)

\*\*\*\* Director Geral, KONIK INSTRUMENTS (PORTUGAL)

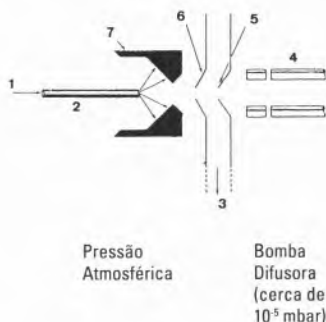


Fig. 5

- 1 - Amostra proveniente do HPLC
- 2 - Capilar
- 3 - Ligação à Bomba Rotativa (cerca de 1 mbar)
- 4 - Analisador
- 5 - Skimmer
- 6 - Orifício de Amostragem
- 7 - Eléctrodo de Vórtex