

Anàlisi directa per espectrometria de masses: desorció per electroesprai (DESI-HRMS)

Direct analysis by mass spectrometry: desorption electrospray ionization (DESI-HRMS)

Raquel Seró

Universitat de Barcelona. Facultat de Química. Departament d'Enginyeria Química i Química Analítica. Secció de Química Analítica

Resum: El notable augment de la utilització de l'anàlisi directa per espectrometria de masses que s'ha experimentat en aquests últims anys està directament relacionat amb el desenvolupament de les tècniques d'anàlisi de superfícies per espectrometria de masses a pressió atmosfèrica (*ambient mass spectrometry*). En concret, la ionització per desorció per electroesprai (DESI), una de les tècniques més emprades i que permet realitzar l'anàlisi directament sobre la superfície de la mostra o després d'haver-la sotmès a una mínima manipulació, ha fet possible el desenvolupament de mètodes d'anàlisi molt ràpids i aplicables a matrius complexes, especialment si s'utilitza l'espectrometria de masses d'alta resolució (HRMS). En aquest treball, es mostren alguns exemples que pretenen demostrar l'aplicabilitat de DESI-HRMS com a eina de cribratge per a l'anàlisi de compostos orgànics en mostres complexes.

Paraules clau: Anàlisi de superfícies per espectrometria de masses a pressió atmosfèrica, ionització per desorció per electroesprai (DESI), anàlisi directa, mètodes de cribratge.

Abstract: The recent introduction of ambient ionization mass spectrometry techniques has generated an important progress in the direct analysis of organic compounds. Specifically, desorption electrospray ionization (DESI), one of the most frequently used ambient techniques, allows the analysis on the sample surface directly or with minimal sample manipulation. Thus, the analysis is performed in few seconds and is applicable to complex samples, especially when using high resolution mass spectrometry (HRMS). This paper presents some examples showing the applicability of DESI-HRMS for the screening analysis of organic compounds in complex samples.

Keywords: Ambient mass spectrometry, desorption electrospray ionization (DESI), direct analysis, screening analysis.

Introducció

Avui dia, els laboratoris de control necessiten mètodes de cribratge que permetin identificar d'una manera ràpida les mostres positives que posteriorment s'hauran de quantificar. En aquest context, l'anàlisi directa per espectrometria de masses ofereix avantatges significatius, com ara l'eliminació de tractaments de mostra tediosos que, a més d'augmentar considerablement el temps d'anàlisi, poden resultar discriminants, si hom pretén identificar compostos desconeguts.

En els últims anys, el camp de l'anàlisi directa ha sofert una notable ampliació amb l'aparició de les tècniques d'anàlisi de superfícies per espectrometria de masses a pressió atmosfèrica, definida com a *ambient mass spectrometry* (AMS), que

permeten la identificació inequívoca de compostos, tant majoritaris com minoritaris, en mesclades i/o matrius complexes, sobretot si s'utilitza l'espectrometria de masses d'alta resolució (HRMS) [1]. Aquestes tècniques operen en un sistema obert a pressió atmosfèrica i permeten l'anàlisi directa de la superfície de la mostra sense cap o tan sols amb una mínima manipulació. Això permet l'anàlisi ràpida de mostres sòlides, però també es poden analitzar líquids, solucions congelades i, fins i tot, gasos adsorbits. La figura 1 mostra les diferents fonts AMS que s'han desenvolupat classificades segons el principi d'ionització (esprai, làser, plasma, etc.). Tot i que actualment són moltes les fonts AMS que existeixen, la major part són prototips desenvolupats amb finalitats investigadores. Les fonts AMS més utilitzades que es troben disponibles comercialment són la font d'ionització per electroesprai (DESI) [2] i l'anàlisi directa en temps real (DART) [3].

En DESI, s'utilitza un dissolvent que genera un esprai de gotes carregades (electroesprai) en aplicar-hi un voltatge elevat (5 kV) i que permet la ionització i la desorció dels anàlits de la superfície de la mostra amb l'ajuda d'un gas de nebulització. La figura 2 mostra la imatge d'una font DESI comercial. Pel

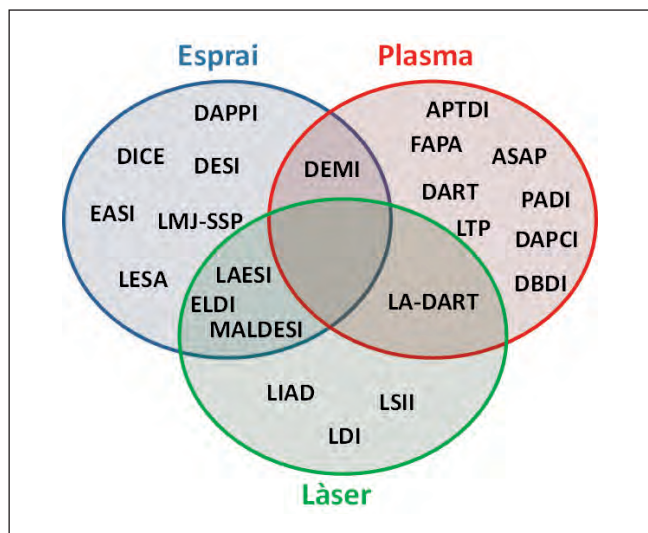


FIGURA 1. Classificació de les fonts AMS més rellevants segons el mecanisme d'ionització.

que fa al mecanisme d'ionització, un esprai de gotes carregades impacta sobre la superfície de la mostra, on es realitza *in situ* una extracció sòlid-líquid. En una segona etapa, les gotes secundàries carregades que es formen a la superfície i que contenen els anàlits extrets i desorbats són impulsades per un gas de nebulització cap a l'entrada de l'espectròmetre de masses. Es tracta d'una tècnica molt ràpida (l'anàlisi es realitza en menys de 10 segons) i, per tant, és idònia per al desenvolupament de mètodes de cribatge per als laboratoris de control. També és utilitzada en l'anàlisi forense i de restauració artística, així com per a l'anàlisi de compostos desconeguts, ja que requereix poca mostra i permet l'anàlisi *in situ* sense la necessitat de tractaments que poden resultar discriminants [4]. Ara bé, amb aquesta tècnica, per evitar problemes de reproductibilitat, sobretot si s'analiza la superfície d'una mostra no homogènia, cal optimitzar una sèrie de paràmetres geomètrics (figura 2) que són crítics i que estan directament relacionats amb l'eficàcia d'extracció i d'ionització dels anàlits [5].

D'altra banda, els espectres de masses que s'obtenen són molt complexos, la qual cosa implica que calgui recórrer a l'espectrometria de masses d'alta resolució (DESI-HRMS) per evitar al màxim les interferències que puguin afectar la detecció dels compostos d'interès. En els mètodes desenvolupats per DESI-HRMS que es comenten en aquest treball, s'ha utilitzat un espectròmetre de masses d'alta resolució amb un analitzador quadrupol-orbitrap treballant a una resolució de 70.000 per a una massa de m/z 200. Un cop adquirits els espectres en

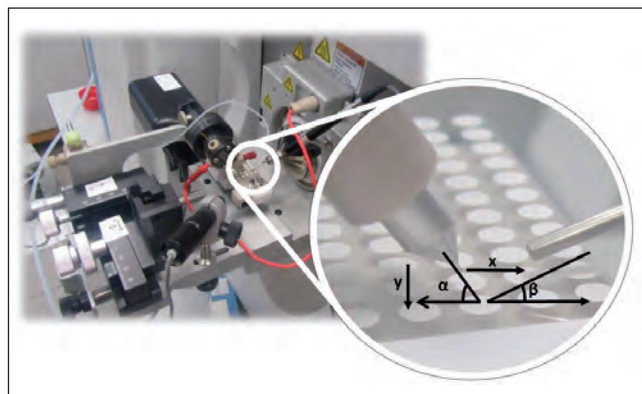


FIGURA 2. Font d'ionització per desorció per electroesprai (DESI).

alta resolució, la identificació dels compostos en les mostres positives s'ha dut a terme utilitzant bases de dades al mateix laboratori (que contenen els compostos que, segons la bibliografia consultada, són característics de la mostra o s'hi poden trobar) i aplicant els criteris següents: un error de massa inferior a 5 ppm, una relació senyal-soroll mínima de 3 a 1 i un ajust entre el clúster isotòpic experimental i el teòric superior al 80 %.

En aquest treball es presenten dos exemples que pretenen demostrar la capacitat de DESI-HRMS per a la determinació de compostos orgànics en matrius complexes. Es comenten els avantatges més significatius de la tècnica, així com les diferents estratègies de manipulació de la mostra que s'han emprat en aquelles matrius la complexitat de les quals no ha permès l'anàlisi directa de la mostra.

Identificació de polifenols en fulles de romaní

En el primer exemple, s'utilitza DESI-HRMS per estudiar diferències en la composició polifenòlica de plantes de romaní tractades amb fongs. El romaní (*Rosmarinus officinalis*), una herba silvestre típica de la conca mediterrània, és molt utilitzat com a espècie culinària i com a remei casolà, ja que presenta propietats antioxidants i antimicrobianes. Recentment, diversos experiments realitzats a llarg termini han posat de manifest que la colonització de les plantes de romaní amb fongs micoriza n'afavoreix el creixement i, a més, contribueix al desenvolupament de la comunitat vegetal general i a l'estabilització dels sòls. Per tant, aquestes plantes, que tenen un baix cost econòmic, podrien tenir un paper important per re-

meiar i recuperar els sòls [6]. Es creu que la simbiosi entre la planta i el fong micoriza pot alterar el metaboloma de la planta i, més concretament, els compostos bioactius que conté, com ara els polifenols.

En aquest estudi s'ha avaluat si existeixen diferències significatives en la composició polifenòlica de les plantes de romaní inoculades i no inoculades analitzant directament les fulles per DESI-HRMS.

Un dels problemes de l'anàlisi directa de mostres sòlides per DESI és la baixa reproductibilitat que està directament relacionada amb la poca homogeneïtat de la superfície de la matriu sòlida. Tal com es pot observar a la figura 3, les fulles de romaní no són planes, i això comporta diferències en les distàncies entre la superfície, l'agulla de l'electrosprai i l'entrada a l'espectròmetre de masses, que són els paràmetres geomètrics que condicionen la resposta. Per tal de controlar i corregir aquesta variabilitat en la resposta, es proposa afegir un patró, l'arbutina, un polifenol que no és característic de les plantes de romaní, en el solvent de l'electrosprai.

La figura 4 mostra els espectres en alta resolució obtinguts d'una mostra inoculada i d'una no inoculada, respectivament.

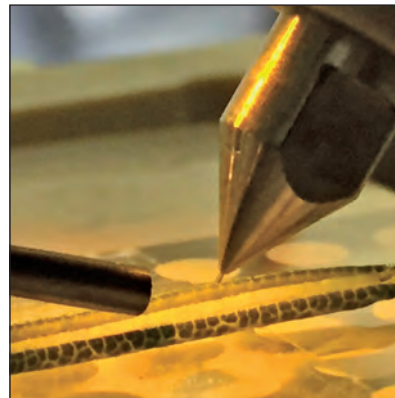


FIGURA 3. Instantània de l'anàlisi per DESI d'una fulla de romaní.

Tant en les mostres inoculades com en les no inoculades s'ha detectat la presència d'àcid carnòsic, però en una concentració més gran en les plantes de romaní micoritzades. A més, en les mostres inoculades, s'observa la presència d'altres polifenols, com l'àcid betulínic, l'anemosapogenin, l'àcid ursòlic i l'àcid asiàtic (figura 4a). Aquests resultats posen de manifest que es produeix un augment de la producció de polifenols per part de la planta quan està en contacte amb el fong micoriza, probablement a causa d'un efecte de resposta defensiva davant la colonització fúngica amb l'objectiu de combatre la invasió del fong micoriza [7].

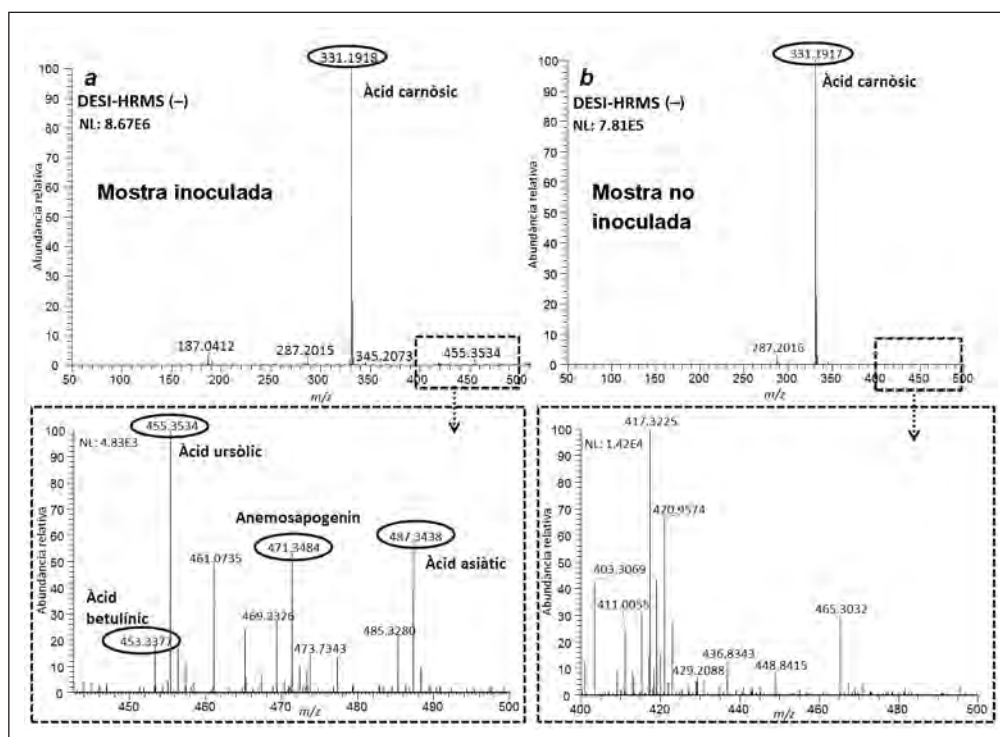


FIGURA 4. Espectres de masses obtinguts en l'anàlisi per DESI-HRMS d'una fulla de romaní inoculada (a) i no inoculada (b).

Anàlisi de contaminacions creuades de drogues veterinàries en pinsos

El segon exemple incideix en el problema de contaminacions creuades en la fabricació de pinsos. Els pinsos medicats amb fàrmacs veterinaris estan estrictament legislat per la Unió Europea, sota el Reglament (CE) 183/2005 [8]. Ara bé, en general, la fabricació de pinsos medicats i no medicats es realitza en la mateixa línia de producció, la qual cosa provoca el que es coneix com a *contaminació creuada*, atès que traces de medicaments romanen inevitablement en el circuit de producció [9]. Tot i que es troben a baixes concentracions, aquests residus de fàrmacs poden representar un risc per a la salut humana si arriben al consumidor. En aquest context, l'objectiu de l'estudi ha estat desenvolupar un mètode ràpid de cribratge mitjançant DESI-HRMS per a la detecció de contaminacions creuades de fàrmacs veterinaris en pinsos.

El desenvolupament del mètode [10] ha posat de manifest un dels problemes que presenta la DESI, que és l'estratègia de manipulació de la mostra que cal utilitzar en cada cas concret. El pinso té una textura polsosa difícil d'analitzar directament i, en conseqüència, si es vol analitzar d'aquesta manera, cal aplicar algun sistema per fixar la mostra al suport. La preparació de pastilles utilitzant una premsa hidràulica no va permetre dur a terme l'anàlisi directa, ja que les pastilles es desmuntaven i contaminaven la font d'ionització, la qual cosa impossibilitava l'anàlisi. En aquest cas, l'estratègia que es proposa passa per realitzar una extracció sòlid-líquid utilitzant acetonitril com a agent extractant i dipositant 2 µL de l'extracte sobre una superfície de tefló que, assecada a temperatura ambient, s'analitza per DESI-HRMS. Tot i la manipulació de la mostra, el temps total d'anàlisi no supera els 10 minuts.

La figura 5 mostra, a tall d'exemple, l'espectre de masses obtingut en analitzar una mostra de pinso no medicat. Es pot observar clarament la presència de salinomicina a la mostra. La validació del mètode duta a terme per UHPLC-MS/MS [11] ha posat de manifest l'aplicabilitat de la tècnica com a eina de cribratge. En aquest cas concret, la concentració de salinomicina a la mostra de pinso no medicat ($20 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) es troba molt per sobre de la concentració màxima permesa per la legislació vigent ($0,7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$).

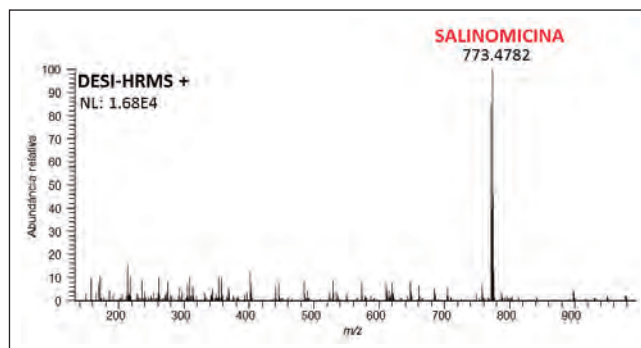


FIGURA 5. DESI-HRMS *full-scan* d'una mostra no medicada contaminada amb salinomicina.

Conclusions

Els dos exemples presentats posen de manifest la potencialitat de la DESI per al desenvolupament de mètodes ràpids i de cribratge per a l'anàlisi de mostres sòlides i líquides. Ara bé, en l'anàlisi de matrius complexes, cal l'ús de DESI-HRMS per aconseguir la necessària selectivitat del mètode. Tal com s'ha demostrat, la tècnica permet l'anàlisi de mostres en el seu estat natiu, per exemple, directament les fulles de romaní, encara que en certes ocasions és necessari manipular la mostra aplicant l'estratègia òptima en cada cas, que depèn de la naturalesa i la complexitat de la matriu que hom pretén analitzar.

Agraïments

L'autora vol expressar el seu agraïment al Ministeri d'Economia i Competitivitat (MINECO) pel finançament rebut (projecte CTQ2012-30836), i a l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca de la Generalitat de Catalunya (AGAUR) (projecte 2014SGR-539) i a la Universitat de Barcelona per la concessió d'una beca APIF per a la realització de la tesi doctoral. Finalment, vol agrair a la Societat Catalana de Química el premi atorgat en la novena Trobada de Joves Investigadors dels Països Catalans.

Referències i altres fonts

- [1] DOMIN, M.; CODY, R. B. *Ambient ionization mass spectrometry*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2015.
- [2] TAKÁTS, Z.; WISEMAN, J. M.; GOLOGAN, B.; COOKS, R. G. «Mass spectrometry sampling under ambient conditions with de-

sorption electrospray ionization». *Science*, núm. 306 (2004), p. 471–473.

[3] CODY, R. B.; LARAMÉE, J. A.; DURST, H. D. «Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions». *Anal. Chem.*, núm. 77 (2005), p. 2297–2302.

[4] SERÓ, R.; NÚÑEZ, O.; MOYANO, E. «Ambient ionization–high resolution mass spectrometry: environmental, food, doping and forensic analysis». A: PÉREZ, S.; EICHORN, P.; BARCELÓ, D. (ed.). *Applications of TOF and orbitrap MS in environmental, food, doping and forensic analysis*. Amsterdam: Elsevier, 2015.

[5] BODZON–KULAKOWSKA, A.; DRABIK, A.; NER, J.; KOTLINSKA, J. H.; SUDER, P. «Desorption electrospray ionisation (DESI) for beginners: how to adjust settings for tissue imaging». *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, núm. 28 (2014), p. 1–9.

[6] CAMPRUBI, A.; ZÁRATE, I. A.; ADHOLEYA, A.; LOVATO, P. E.; CALVET, C. «Field performance and essential oil production of mycorrhizal rosemary in restoration low–nutrient soils». *L. Degrad. Dev.*, núm. 26 (2015), p. 793–799.

[7] COPETTA, A.; LINGUA, G.; BERTA, G. «Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. *Genovese*». *Mycorrhiza*, núm. 16 (2006), p. 485–494.

[8] Reglament (CE) 183/2005, del Parlament Europeu i del Consell, de 12 de gener de 2005, pel qual es fixen requisits d'higiene en matèria de pinsos, L35, 1–22.

[9] STRAUCH, W. «Causes and control of carry-over and cross-contamination. Part 1: in production of premixes and compound feed». *Kraftfutter*, núm. 4 (2002), p. 151–159.

[10] SERÓ, R.; NÚÑEZ, O.; BOSCH, J.; GRASES, J.; RODRÍGUEZ, P.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. «Desorption electrospray ionization–high resolution mass spectrometry for the screening of veterinary drugs in cross-contaminated feedstuffs». *Anal. Bioanal. Chem.*, núm. 407 (2015), p. 1–10.

[11] BORRÁS, S.; COMPANYÓ, R.; GUIERAS, J.; BOSCH, J.; MEDINA, M.; TERMES, S. «Multiclass method for antimicrobial analysis in animal feeds by liquid chromatography–tandem mass spectrometry». *Anal. Bioanal. Chem.*, núm. 405 (2013), p. 8475–8486.



R. Seró

Raquel Seró va néixer a Lleida l'any 1990. Va estudiar el grau de química i el màster en química analítica a la Universitat de Barcelona i actualment realitza la tesi doctoral al Departament d'Enginyeria Química i Química Analítica de la mateixa universitat, sota la direcció de la doctora Encarnación Moyano. La seva tesi doctoral està centrada en l'estudi de les noves tècniques AMS i, en concret, en el desenvolupament de mètodes que permetin demostrar l'aplicabilitat de la tècnica DESI com a tècnica analítica ràpida.