

RENATO HADDAD

***HOMOCISTEÍNA: UM NOVO MÉTODO DE ANÁLISE
UTILIZANDO O SISTEMA DIMP/T&R-MIMS***

CAMPINAS

2001

RENATO HADDAD

***HOMOCISTEÍNA: UM NOVO MÉTODO DE ANÁLISE
UTILIZANDO O SISTEMA DIMP/T&R-MIMS***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas, área de Patologia Clínica.*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. NELCI FENALTI HÖEHR

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. MARCOS NOGUEIRA EBERLIN

CAMPINAS

2001

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

H116h
H117L

Haddad, Renato

Homocisteína : um novo método de análise utilizando o sistema
DIMP/T & R- MIMS / Renato Haddad. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientadores : Nelci Fenalti Höehr, Marcos Nogueira Eberlin
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Espectrometria de Massa. 2. Metabolismo. I. Nelci Fenalti
Höehr. II. Marcos Nogueira Eberlin. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP	H117L
V	
TOMBO BC	48778
PROC.	16-837102
C	☐
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	07/05/02
Nº CFD	

CM00167123-3

3 ID 239291

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientadora: Profa. Dra. Nelci Fenalti Hoehr

Membros:

1. Profa. Dra. Maria Anita Mendes

2. Prof. Dr. José Antonio R. Gontijo

3. Profa. Dra. Nelci Fenalti Hoehr

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 07.11.2001

0626 1200

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho ao meu Filho **Felipe Haddad**,
para que ele siga um futuro cheio de alegrias, vitórias
e prosperidade.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Agradeço em especial aos meus orientadores
Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr e Prof. Dr. Marcos
N. Eberlin pela amizade, confiança e
principalmente pela ajuda e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

À toda a minha família, principalmente meus pais que tornaram meus estudos viáveis e a minha esposa pela paciência e carinho.

Aos funcionários do **Laboratório de Patologia Clínica** da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, Mirian e Valéria.

Aos amigos Alessandra, Aline, Anita, Beto, Cleidiane, Daniela, Eduardo, Fabio, Lílian, Regina, Tito do **Laboratório Thomson** do Instituto de Química da UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Roberto Rittner e ao Dr. Cláudio Francisco Tormena do Instituto de Química da UNICAMP.

Ao Instituto de Química da UNICAMP.

À **FAPESP** pelo apoio financeiro.

Ao **Laboratório Fleury**.

Desistir de aprender é egoísmo."
Este é um ditado que eu gosto muito.
Quando acalentamos o desejo de aprender mais,
Nossas vidas estarão repletas
De genuína vitalidade e brilho."

"Criar pessoas capazes demora cem anos"
Isto é verdadeiro!
Jovens, uma árvore não cresce numa só noite!
Imperceptível dentro do solo,
As raízes arraigam-se cada vez mais profundamente,
Absorvendo sem cessar os nutrientes
Através do aprimoramento contínuo e da aprendizagem,
Por meses e anos,
Vocês acumularão muitos "elos de desenvolvimento"
Que se elevarão pelos céus como
Enormes e imutáveis árvores.

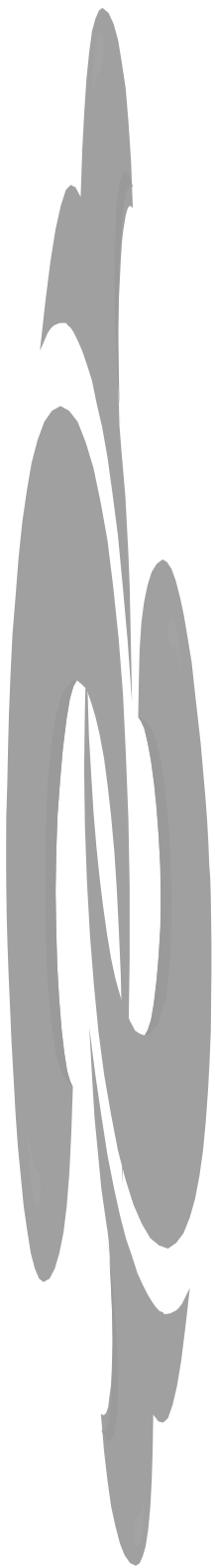
Daisaku Ikeda

Poema "Jovem Terra de Futuro Grandioso"

	PÁG.
RESUMO	<i>xi</i>
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. O metabolismo da homocisteína.....	15
1.1.1. Transmetilação.....	15
1.1.2. Remetilação.....	17
1.1.3. Transsulforação.....	17
1.1.4. Regulação do metabolismo da homocisteína.....	18
1.2. Relação causa/efeito da hiperhomocisteinemia.....	19
1.2.1. Doenças renais.....	19
1.2.2. Diabetes.....	19
1.2.3. Defeitos hereditários.....	20
1.2.4. Defeitos adquiridos.....	20
2. OBJETIVOS	27
2.1. Determinação da homocisteína.....	28
2.2. Histórico da técnica MIMS.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1. O sistema DIMP/T&R-MIMS.....	41
3.1.1. Modo de operação.....	43
3.2. Experimentos realizados para testar o sistema DIMP/T&R-MIMS.....	45
3.2.1. Perfil do sinal.....	45
3.2.2. Efeito de memória.....	45

3.2.3. Exemplos de aquisição de espectros de massas completos.....	47
3.3. Equipamentos e reagentes.....	48
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	49
4.1. Preparação das soluções.....	50
4.2. Preparação da amostra.....	50
4.3. Procedimento de derivatização.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1. Análise da homocisteína sérica.....	53
5.2. Comprovação da derivatização e escolha de sinais para quantificação da homocisteína.....	57
5.3. Linearidade do sistema.....	62
5.4. Teste de recuperação.....	63
5.5. Reprodutibilidade.....	64
5.6. Correlação entre os resultados obtidos na análise da homocisteína pelo método DIMP/T&R-MIMS proposto e HPLC.....	66
6. CONCLUSÕES.....	69
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	72
8. SUMMARY.....	74
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
10. ANEXOS.....	85

CI	ionização química
CT	aprisionamento Criogênico
DIMP	Sonda de membrana com inserção direta
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EI	ionização por elétrons
FPIA	Imunoensaio por Fluorescência Polarizada
GC	Cromatografia Gasosa
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HS	“head space”
IDDM	diabete mellitus insulino dependente
LDL	lipoproteína de baixa densidade
<i>m/z</i>	relação massa/carga
MIMS	Espectrometria de Massas por Introdução via Membrana
MS	espectrometria de Massas
MTHFR	metilenotetrahidrofolato redutase
NIDDM	diabete mellitus não insulino dependente
POAA	ácido fenoxi acético
ppb	parte por bilhão
ppt	parte-por-trilhão
SAH	s-adenosilhomocisteína
SAM	s-adenosilmetionina
SBD-F	ammonium-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazol-4-sulfonato
SIM	monitoramento de íon seletivo
T&R	aprisionamento & liberação
TCA	ácido tricloroacético
VOCs	Compostos orgânicos voláteis
μM	micro molar

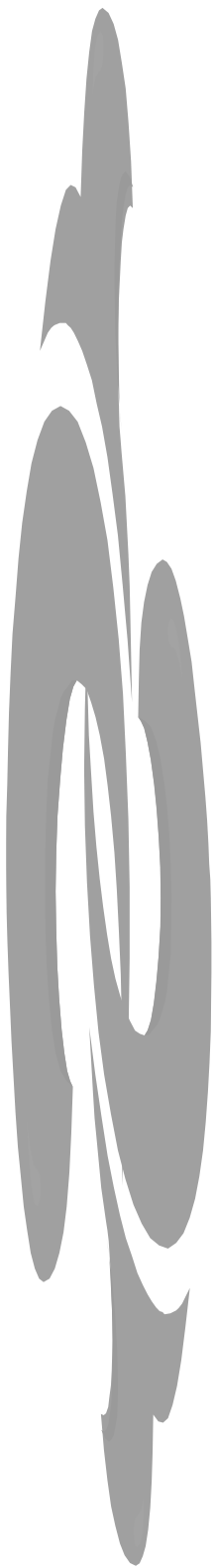


RESUMO

Neste projeto de pesquisa foi desenvolvido um novo método para determinação e quantificação da homocisteína em plasma, intermediária da síntese de cisteína, que é produzida no organismo a partir da metionina. Este novo método emprega a Espectrometria de Massa por Introdução via Membrana (MIMS).

Utilizou-se uma sonda de membrana DIMP (Sonda de membrana com inserção direta) operando no método T&R–MIMS (aprisionamento e liberação - Espectrometria de Massa por Introdução via Membrana) que amostra os compostos por um determinado período de tempo por adsorção em uma membrana de silicone, seguida de rápida dessorção através do aquecimento da membrana. A análise de homocisteína foi realizada com derivatização por esterificação, adicionando-se cloroformiato de etila, em solvente contendo piridina, etanol e água.

Os experimentos foram realizados em um espectrometro de massas monoquadrupolar, operando em modo SIM (monitoramento de íons selecionados). Foi monitorado o íon de m/z 234 que corresponde ao fragmento $[M-H]^+$ da homocisteína. Testes de linearidade mostraram um coeficiente de correlação de 0,998. O sistema se mostrou bastante reprodutível e um experimento no qual foram realizadas cinco repetições apresentou desvio de 2,5%. A recuperação foi de 97,4%, e limite de detecção de 2 M o que demonstra que o método é viável para a análise de homocisteína.



1. INTRODUÇÃO

A homocisteína foi descoberta por De Vigneaud em 1932,¹ e corresponde a um aminoácido intermediário da síntese da cisteína, produzido no organismo a partir da metionina. A concentração elevada de homocisteína no plasma é reconhecida há alguns anos como um fator independente de risco para doenças cardiovasculares, incluindo aterosclerose e trombose venosa.² A concentração total deste aminoácido no plasma compreende a faixa de 5 a 15 μM , e valores acima de 100 μM podem ser consideradas como condição de hiperhomocisteinemia. A incidência do aumento de homocisteína na população é de 1:200.000.³

No entanto, ainda não existe um consenso sobre valores que identificam um potencial citotóxico para o desenvolvimento de doença cardiovascular. Os mecanismos patológicos precisos pelos quais a homocisteína pode causar lesões vasculares não estão totalmente esclarecidos, apesar de inúmeros estudos terem documentado efeitos significantes da homocisteína, considerando esta classe de componentes e os modelos ateroscleróticos.⁴ Vários estudos “*in vitro*” vem sendo realizados, sugerindo que níveis elevados de homocisteína atuam como um fator de risco para patologias de doenças vasculares, podendo ser discutida por duas questões fundamentais tais como a falta de especificidade (outros tios produzem efeitos similares) e ao aumento extremamente elevado de suas concentrações séricas (100-1000 μM em níveis “*in vivo*”). Outros estudos “*in vivo*” recentemente foram realizados, onde foram demonstrados os efeitos sobre a expressão da quimiocina sobre as células endoteliais aórticas⁵, através de experimentos onde primeiramente haja inibição do crescimento das células vasculares do endotélio e a seguir a recuperação deste crescimento em resposta ao acúmulo deste aminoácido (injúria)⁶. Portanto, existem muitos trabalhos que vem sendo realizados para elucidar o papel deste aminoácido no organismo bem como entender a sua participação principalmente nas doenças cardiovasculares.

1.1. O METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA

1.1.1. Transmetilação

Em contraste com a limitada compreensão de sua patologia, existe uma grande quantidade de informações relativa ao metabolismo da homocisteína, pois esta participa do metabolismo do aminoácido metionina que é indispensável ao organismo. Na Figura 1, podemos observar que o primeiro passo no metabolismo da metionina envolve a ativação do composto sulfônico, S-adenosilmetionina (SAM), via enzima SAM-sintetase. A S-adenosilmetionina é um doador de grupos metila para numerosas reações de transmetilação (Figura 1), incluindo no caso a síntese da S-adenosilhomocisteína (SAH) que é hidrolisada formando a adenosina e a homocisteína pela ativação da SAH-hidrolase. SAH-hidrolase é uma enzima reversível, com a direção da SAH-sintetase com natureza favorecida termodinamicamente.⁷ Em estudos “*in vivo*” a presença da adenosina significa que existem a presença da SAH-hidrolase, ou seja o defeito genético não é devido à ausência desta enzima. Portanto esta etapa de reação forma a homocisteína.

Este é o ponto crítico na regulação da SAH que é um potente inibidor das transmetilases.⁸ Esta regulação se realiza através de 2 caminhos distintos: *remetilação*, voltando para a metionina, e a *transsulfuração*, no sentido da formação da cisteína.

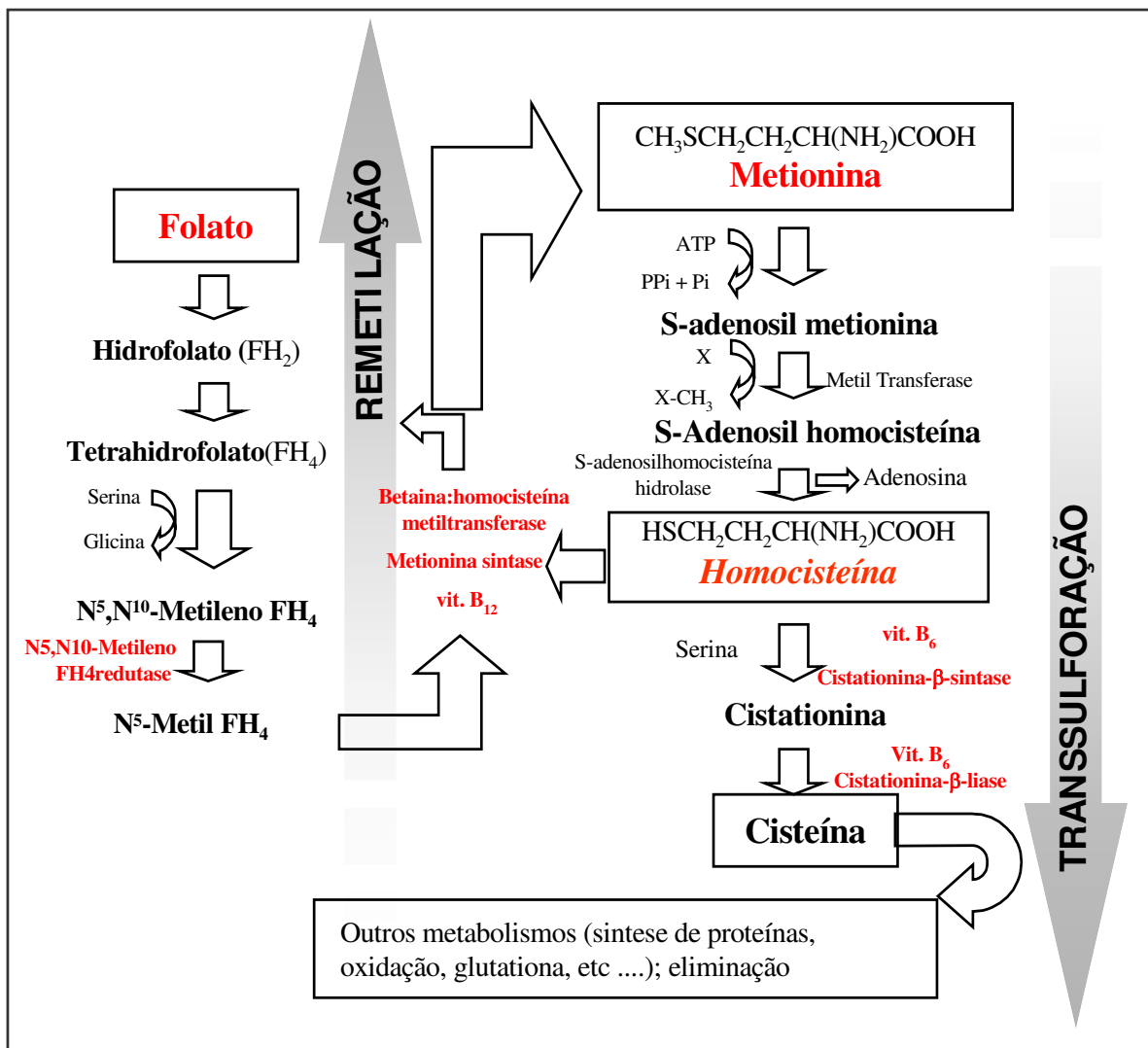


Figura 1: Biotransformação da Metionina.

1.1.2. Remetilação

A remetilação da homocisteína resultando na formação de metionina novamente ocorre pela ação de uma ou duas enzimas, sendo elas: - metionina sintetase dependente da cobalamina e/ou - betaína:homocisteína metiltransferase. A síntese da metionina é catalisada pela transferência de grupos metila da 5-metiltetrahidrofolato para a homocisteína, formando a metionina. Esta transferência de grupos metila é efetuada diretamente por uma enzima ligada à cobalamina. A betaína:homocisteína metiltransferase catalisa uma reação similar; onde ocorre independente da presença de folato. Nesta reação a betaína que é um metabolito da colina, atua como um doador de metila para a síntese da metionina. Na reação de remetilação o esqueleto carbônico e os átomos de enxofre são conservados originando assim a metionina.⁹

1.1.3. Transsulfuração

Na reação de transsulfuração ocorre a oxidação da homocisteína para cisteína. O catabolismo da cadeia carbonica e o átomo de enxofre da metionina/homocisteína ocorre devido à oxidação ocasionada pela reação de transsulfuração. A primeira etapa da transsulfuração é a condensação da homocisteína com a serina, através da ação direta da cistationa- β -sintase que é dependente da vitamina B₆, resultando a formação da cistationina. A cistationina é então metabolizada formando a cisteína, α -cetobutirato e o íon amônio, pela ação direta da cistationa- β -liase que é dependente da vitamina B₆. A cisteína formada contém o grupo SH proveniente do composto metionina/homocisteína e o esqueleto carbônico da serina, podendo ser utilizada para síntese de proteínas, glutathione, ou sofrer reações de catabolização. O esqueleto carbônico da metionina/homocisteína, na forma ácido pirúvico, é oxidado diretamente dentro da mitocôndria formando piruvato desidrogenase ou formando o complexo ácido ceto desidrogenase,¹⁰ proveniente de um mecanismo anaplerótico para o ciclo do ácido tricarboxílico, via succinil CoA.

1.1.4. Regulação do Metabolismo da Homocisteína

A regulação do metabolismo da homocisteína ocorre devido a interação de vários fatores, tais como a dieta bem como a concentração dos substratos nos diversos caminhos intermediários. Por exemplo, na síntese direta da homocisteína a remetilação e a transsulforação são regulados no sentido da formação de SAM e SAH. Pessoas adeptas ao consumo de cereais contendo metionina possuem um aumento nas funções da SAM a nível hepático ativando assim a cistationina- β -sintase (transsulforação) e inibindo a MTHFR (metilenotetrahidrofolato redutase) e consequentemente a remetilação da homocisteína.¹¹ Estes processos ajudam a assegurar durante certo tempo a adequação da metionina, onde o excesso na síntese de metionina desviada pode também levar a um aumento na síntese de cisteína. SAH é igualmente um ativador para cistationina- β -sintase¹² e atua sinergicamente com a SAM para assegurar o fluxo de homocisteína no caminho sintético da transsulforação. Esta ativação da cistationina- β -sintase pela SAH pode também atuar no controle do excesso acumulado de SAH resultando na inibição da transmetilação.

O metabolismo da homocisteína dentro dos tecidos e seus efeitos resultantes de sua concentração no plasma mostra que a homocisteína é um metabolito aterogênico. A homocisteína no plasma é governada portanto pelo balanço de todos estes fatores, que são responsáveis pela perfusão deste aminoácido para os tecidos e sua presença no interior destes compartimentos, regulando assim a presença da homocisteína da dentro dos tecidos. Quaisquer alterações nestes processos podem levar a variações nas concentrações de homocisteína plasmática. Diversos fatores influenciam na concentração de homocisteína plasmática dentre os quais podemos citar: farmacológicos, nutricionais, hormonais, algumas doenças, o estilo de vida, e os fatores genéticos. Vários estudos realizados recentemente analisam o impacto destes fatores com as concentrações de homocisteína no plasma.^{13,14} Para uma elucidação destes problemas iremos relatar algumas doenças relacionadas com o aumento de homocisteína, e as principais causas do aumento da concentração deste aminoácido.

1.2. RELAÇÃO CAUSA/EFEITO DA HIPERHOMOCISTEINEMIA

1.2.1. Doenças renais

Pacientes em estágio final de doenças renais tem aumento das concentrações de homocisteína no plasma,¹⁵ e este aumento, eleva categoricamente os eventos aterotrombótico.¹⁶ Vários fatores podem predispor indivíduos com doença renal a desenvolver uma hiperhomocisteinemia, incluindo: i) condições nutricionais pobres, somando-se a baixa concentração de vitaminas do complexo B; ii) acúmulo de toxinas urêmicas; e iii) perda do metabolismo renal. Estes fatores indicam que as células do túbulo renal possuem um complemento total de enzimas necessárias para a remetilação e transsulfuração da homocisteína.¹¹ Entretanto, o papel dos rins no metabolismo e regulação da homocisteína no plasma não está ainda provado. Discussões sobre isto levaram estudos em conjunto para examinar “*in vivo*” o metabolismo da homocisteína, e estes estudos obtiveram resultados preliminares positivos. Os estudos foram realizados “*in vivo*” em ratos demonstrando uma forte evidência de que este órgão é o primeiro sítio para a identificação e metabolismo da homocisteína.⁹

Como a homocisteína é eliminada pelo rim nos casos graves de falência renal, pode haver um aumento da homocisteína no plasma, por este motivo é administrado ao paciente uma suplementação de ácido fólico, vitaminas B₆ e B₁₂, para que haja uma diminuição de seus níveis plasmáticos.¹⁷ Estudos realizados mostram que, administrando-se N-acetilcisteína¹⁸ via oral, com a finalidade de aumentar a biotransformação da homocisteína e a sua eliminação, tem resultados positivos. No entanto, a administração destas drogas bem como a homocisteína deve ser monitorada através da medida das suas concentrações séricas.

1.2.2. Diabetes

A diabetes, é uma doença que esta diretamente ligada ao aumento da concentração de homocisteína no plasma e que pode ser secundária à insuficiência renal. Pacientes com diabetes, seja insulino dependente (IDDM) ou não insulino dependente (NIDDM) nas quais há uma diminuição das taxas de filtração glomerular, elevando assim a

concentração de homocisteína no plasmática.¹⁹ Ocorre também em pacientes com IDDM e função renal normal um aumento significativo na concentração total de homocisteína.²⁰

Recentes resultados relacionam o papel da insulina na regulação do metabolismo da homocisteína e, conseqüentemente, alterações na concentração plasmática.⁹

1.2.3. Defeitos hereditários

A baixa concentração sérica da cistationina- β -sintase é uma deficiência genética com característica autossômica recessiva, como foi mostrado em estudos realizados em famílias^{21,22} onde esta deficiência genética foi observada previamente em pais de crianças que apresentavam alterações desta enzima.²³ Defeitos heterozigóticos da cistationina- β -sintase são muito raros e estão associados a uma hiperhomocisteinemia moderada.²⁴

Um patologia rara foi observada devido à mutações da 5,10-metilenotetraidrofolato redutase, onde há uma redução severa da atividade desta enzima, reduzindo conseqüentemente a conversão da homocisteína para metionina levando assim a uma hiperhomocisteinemia.^{25,26}

1.2.4. Defeitos adquiridos

Níveis elevados de homocisteína ocorrem em 95% dos pacientes que apresentam deficiência de folato ou vitamina B₁₂.^{27,28} A deficiência do folato leva a uma redução da N⁵-metilenotetraidrofolato-transferase, necessária para a remetilação da homocisteína em metionina, aumentando conseqüentemente, os níveis de homocisteína plasmática.²⁹

A deficiência da vitamina B₆ prejudica a função das enzimas cistationina- β -sintase e α -cistationase, promovendo uma falha no catabolismo da homocisteína via transsulforação, levando conseqüentemente a uma hiperhomocisteinemia por um mecanismo ainda não bem esclarecido.^{21,22}

Na Figura 2a podemos observar um mecanismo em potencial que pelo qual o aumento da homocisteína poderia esclarecer o aparecimento de doenças vasculares³⁰, bem como pode sugerir alterações das células do endotélio.³¹ Nesta figura observamos que a homocisteína elevada na corrente circulatória oxida o LDL (low density lypoprotein). Após oxidado o macrófago não reconhece mais a LDL e o arrasta para a parede arterial onde vai se acumulando podendo formar placas de LDL oxidada e causar a obstrução desta artéria.³⁰

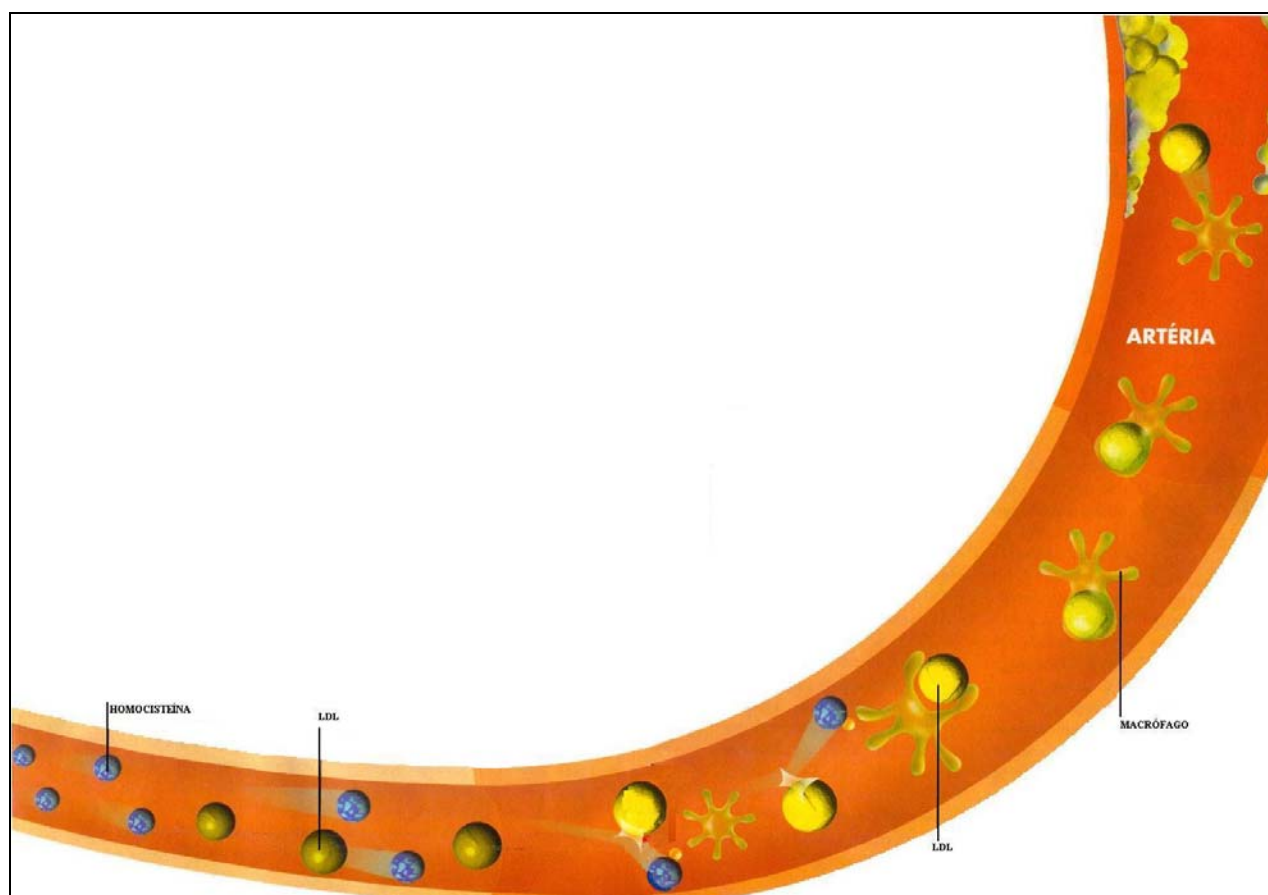


Figura 2a: Mecanismo proposto para formação do trombo arterial.

Estas alterações podem ser induzidas pelo stress oxidativo, através da formação de H_2O_2 e a formação irregular de óxido nítrico ^{32,18,33} bem como pela diminuição das propriedades anticoagulantes através da supressão da trombomodulina.^{34,35} A trombomodulina está regularmente presente nas células do endotélio vascular e, além de ser um importante anticoagulante, é também um receptor de trombina.³⁶

Foi observado também que um aumento dos níveis sanguíneos de homocisteína em pacientes dependentes de diálise e que estão em estágio final de falência renal.^{37,38}

A homocisteína total corresponde à somatória entre a homocisteína ligada a proteína, que se apresenta em maior quantidade, suas formas oxidadas e reduzidas e a homocisteína ligada a cisteína, todas encontradas na corrente circulatória (Figura 2b).³⁹

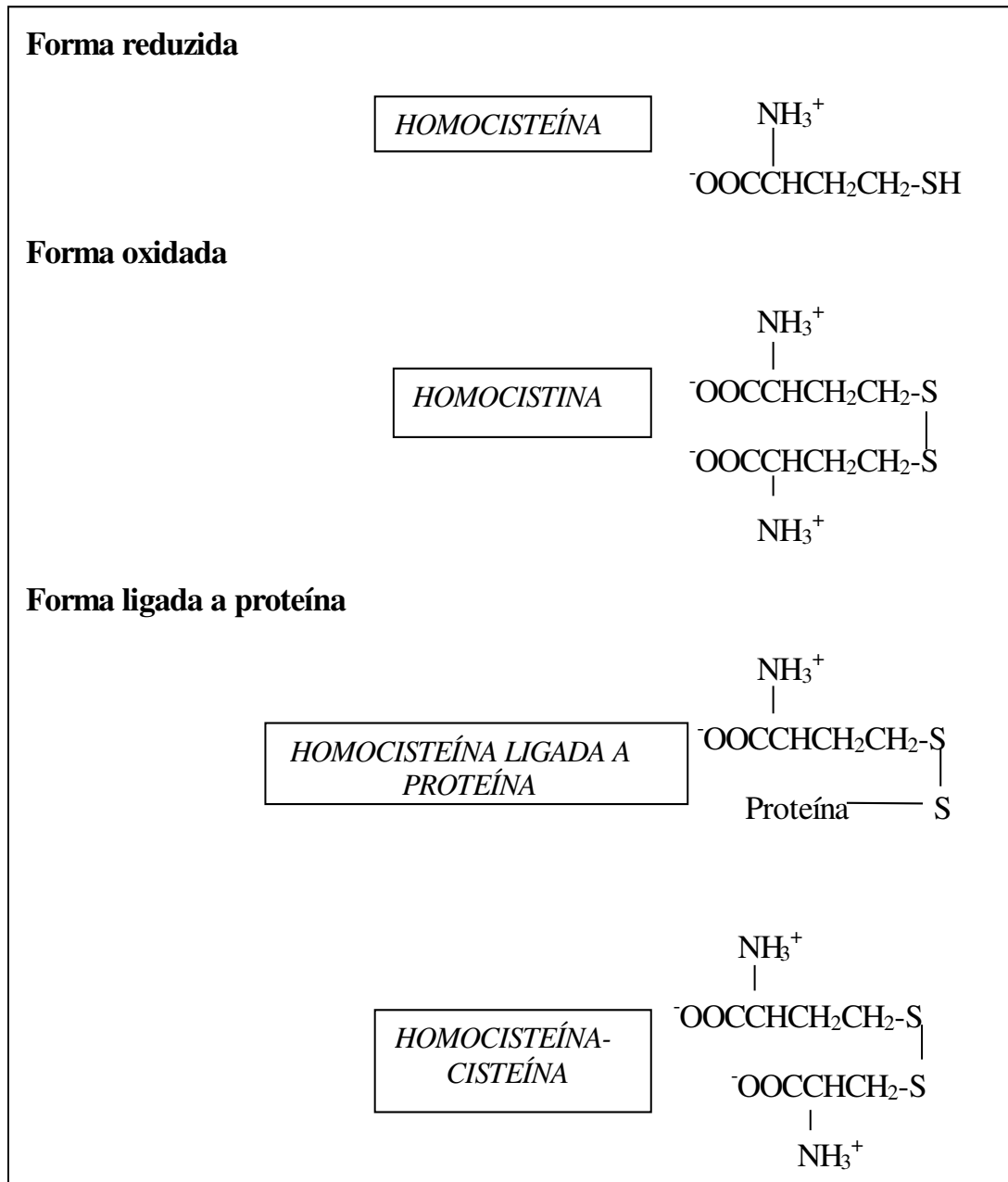
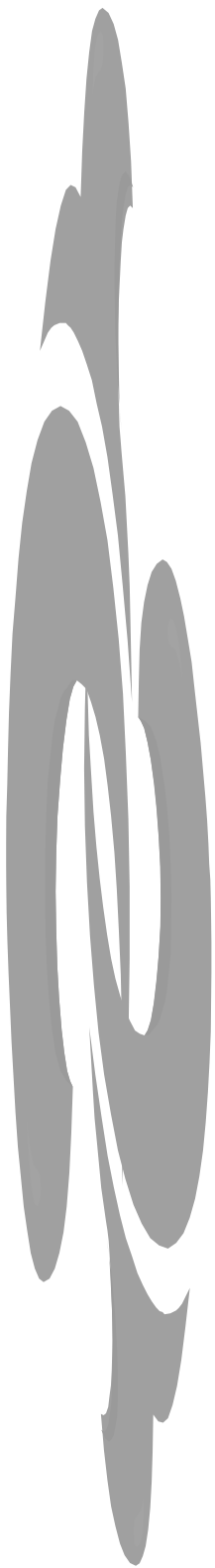


Figura 2b: Formas de homocisteína encontradas na corrente circulatória

-
- ¹ P.M. Ueland and H Refsum, Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy., *J Lab Clin Med.* **(1989)** Nov;114(5):473-501.
- ² H. Refsum, P. M. Ueland, O. Nygard and S. E. Vollset, Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med.* **(1998)**;49:31-62.
- ³ N.W.Tietz: "Textbook of Clinical Chemistry, 3 ed". Ed W.B. Saunders Company, Philadelphia, **(1986)**, pg. 552-555 e 1574.
- ⁴ J. S. Stamler and A. Slivka, Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutr Rev.* **(1996)** Jan;54 (1 Pt 1):1-30.
- ⁵ D. W. Jacobsen and R. Poddar, Vascular dysfunction at the cellular level. *Neth. J. Med.* **(1998)**, 52, S1.
- ⁶ H. Wang, M. Yoshizumi, K. Lai, J. Tsai, M. A. Perrella, E. Haber and M. Lee, J Biol Inhibition of growth and p21ras methylation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine. *J Biol Chem.* **(1997)** Oct 3;272(40):25380-5.
- ⁷ G. De La Haba and G. L. Cantoni, The enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-homocysteine from adenosine and homocysteine. *J. Biol. Chem.*, **(1959)**, 234, 603-608.
- ⁸ V. Zappia, R. Zydek-Chick and F.Schlenk, The specificity of S-adenosylmethionine derivatives in methyl transfer reactions. *J Biol Chem.* **(1969)** Aug 25;244(16):4499-509.
- ⁹ J. D. House, R. L. Jacobs, L. M. Stead, M. E. Brosnan and J. T. Brosnan, Regulation of homocysteine metabolism. *Adv Enzyme Regul.* **(1999)**;39:69-91.
- ¹⁰ R. Paxton, P. W. D. Scislawski, E. J. Davis and R. A. Harris, Role of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase in 2-oxobutyrate metabolism. *Biochem J.* **(1986)** Mar 1;234(2):295-303.
- ¹¹ J. D. Finkelstein, Methionine metabolism in mammalian. *J. Nutr. Biochem.*, **(1990)**, 1, 228-237.
- ¹² J. D. Finkelstein, W. E. Kyle, B. J. Harris, Methionine metabolism in mammals: regulatory effects of S-adenosylhomocysteine. *Arch Biochem Biophys.* **(1974)** Dec;165(2):774-9.
- ¹³ M. R. Malinow; Homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases. *J Intern Med.* **(1994)** Dec;236(6):603-17.
- ¹⁴ S. E. S. Miner, J. Evrovski and D. E. C. Cole, Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. *Clin Biochem.* **(1997)** Apr;30(3):189-201.
- ¹⁵ A. G. Bostom, and L. Lathrop, Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney Int.* **(1997)** Jul;52(1):10-20.
- ¹⁶ D. N. Churchill, Comparative morbidity among hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Kidney Int Suppl.* **(1993)** Feb;40:S16-22.

-
- ¹⁷ A. G. Bostom, D. Shemin, K. L. Lapane, P. Sutherland, M. R. Nadeau, P. W. F. Wilson, D. Yoburn, L. Bausserman, G. Tofler, P. F. Jacques, J. Selhud and I. H. Rosenberg, Hyperhomocysteinemia, hyperfibrinogenemia, and lipoprotein (a) excess in maintenance dialysis patients: a matched case-control study. *Atherosclerosis*. **(1996)** Aug 23;125(1):91-101.
 - ¹⁸ J. Loscalzo, The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest*. **(1996)** Jul 1;98(1):5-7.
 - ¹⁹ A. Araki, Y. Sako and H. Ito, Plasma homocysteine concentrations in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: effect of parenteral methylcobalamin treatment. *Atherosclerosis*. **(1993)** Nov;103(2):149-57.
 - ²⁰ J. F. Robillon, B. Canivet, J. L. Sadoul, D. Julien, P. Morand, P. Chambon and P. Freychat, Type 1 diabetes mellitus and homocyst(e)ine. *Diabete Metab*. **(1994)** Sep-Oct;20(5):494-496.
 - ²¹ V. A. McKusick, J. G. Hall and F. Char, : "The clinical and genetic characteristics of homocystinuria, in Carson NAJ, Raine DN, (eds): *Inherited Disorders of Sulfur Metabolism*", **(1971)** Churchill Livingstone, London, pg. 179,.
 - ²² V. A. McKusick: "Heritable Disorders of Connective Tissue", **(1972)** 4th ed., C.V. Mosby, St. Louis, pg. 224.
 - ²³ S. H. Mudd and H. L. Levy: "Disorders of transsulfuration", in Stanbury J.B, Wyngaarden J.B., Frederickson D.S., (ed): "The Metabolic Basis of Inherited Disease", **(1978)** 4th ed., McGraw-Hill, New York, pg. 458.
 - ²⁴ G. H. Boers, A. G. Smals, F. J. Trijbels, B. Fowler, J. A. Bakkeren, H. C. Schoonderwaldt, W. J. Kleijer, P. W. Kloppenborg. Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease. *N Engl J Med*. **(1985)** Sep 19;313(12):709-15.
 - ²⁵ R. W. Erbe : "Inborn errors of folate metabolism. In Blakey R.L., Whitehead V.M., (eds) *Folates and parents: nutritional Pharmacological and physiological aspects*", Wiley, New York, **(1986)** 413-465,.
 - ²⁶ P. Goyette, P. Frosst, D. S. Rosenblatt and R. Rozen, Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Am J Hum Genet*. **(1995)** May;56(5):1052-9.
 - ²⁷ S. S. Kang, P. W. Wong and M. Norusis, Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism*. **(1987)** May;36(5):458-62.
 - ²⁸ S. P. Stabler, P. D. Marcell, E. R. Podell, R. H. Allen, D. G. Savage and J. Lindenbaum, Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Invest*. **(1988)** Feb;81(2):466-74.
 - ²⁹ R. C. Chu, C. A. Hall, The total serum homocysteine as an indicator of vitamin B12 and folate status. *Am J Clin Pathol*. **(1988)** Oct;90(4):446-9.
 - ³⁰ J. Zaché, Homocisteína: uma outra vilã. *Revista Saúde*, **(1999)**, 187,76-83
 - ³¹ J. C. Tsai, H. Wang, M. A. Perrella, M. Yoshizumi, N. E. S. Sibinga, L. C. Tan, E. Haber, T. H. T. C. Chang, R. Schlegel and M. E. Le Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. **(1996)** Jan 1;97(1):146-53.
-

-
- ³² G. Starkebaum and J. M. Harlan, Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest.* **(1986)** Apr;77(4):1370-6.
- ³³ J. S. Stamler, J. A. Osborne, A. Jaraki, M. Mullins, D. Single and J. Loscalzo, Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest.* **(1993)** Jan;91(1):308-18.
- ³⁴ T. Hayashi, G. Honda and K. Suzuki, An atherogenic stimulus homocysteine inhibits cofactor activity of thrombomodulin and enhances thrombomodulin expression in human umbilical vein endothelial cells. *Blood.* **(1992)** Jun 1;79(11):2930-6.
- ³⁵ S. R. Lentz and J. E. Sadler, Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest.* **(1991)** Dec;88(6):1906-14.
- ³⁶ C. T. Esmon and W. G. Owen, Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **(1981)** Apr;78(4):2249-52.
- ³⁷ P. Chauveau, B. Chadeaux, M. Coude, J. Aupetit, T. Hannedouche and P. Kamoun, Hyperhomocysteinemia, a risk factor for atherosclerosis in chronic uremic patients. *Kidney Int Suppl.* **(1993)** Jun;41:S72-7.
- ³⁸ K. R. Robinson, A. Gupta, V. W. Dennis, K. Arheart, D. Chaudhary, R. Green, P. Vigo, E. L. Mayer, J. Selhub, M. Kutner and D. Jacobse, Hyperhomocysteinemia confers an independent increased risk of atherosclerosis in end-stage renal disease and is closely linked to plasma folate and pyridoxine concentrations. *Circulation.* **(1996)** Dec 1;94(11):2743-8.
- ³⁹ Ueland P. M., Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin Chem.* **(1995)** Mar;41(3):340-2.



2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método moderno e viável para a dosagem de homocisteína. Esta determinação será de grande importância para o serviço de Bioquímica Clínica do Departamento de Patologia Clínica, uma vez que permite o estudo da investigação etiológica, identificação e seguimento terapêutico de pacientes com doenças que estão relacionadas com o aumento da concentração de homocisteína na corrente circulatória.

Para atingirmos estes objetivos desenvolvemos, implementamos e validamos uma nova metodologia para dosagem de homocisteína sérica, por espectrometria de massas utilizando a técnica DIMP/T&R-MIMS.

2.1. DETERMINAÇÃO DA HOMOCISTEÍNA

Quanto aos métodos de análise de homocisteína encontrados até o presente momento, foram as dosagens da homocisteína total realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando-se neste caso pré-colunas e a detecção por imunofluorescência, no qual a homocisteína é derivatizada com 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazol-4-sulfonato de amônia (SBD-F).⁴⁰ Nesta técnica a homocisteína é separada por um gradiente de eluição através de uma coluna de fase reversa e posteriormente identificada e quantificada. Este método é sensível e específico, porém realiza uma análise demorada e trabalhosa onde o SBD-F é altamente reativo e difícil manuseio. Recentemente, foi desenvolvida uma nova técnica que realiza inicialmente uma reação enzimática e posterior imunoensaio com detecção por fluorescência polarizada (FPIA).⁴¹ Esta técnica é sensível e seletiva apesar de ter um longo tempo de incubação e alto custo tanto em equipamentos bem como nos reagentes utilizados, sendo estes últimos muito instáveis.

Uma nova técnica para análise de substâncias orgânicas e que tem apresentado grande interesse, é a Espectrometria de Massas por Introdução Via Membrana (MIMS). Esta técnica vem sendo aprimorada e possui ampla aplicação em diversas áreas de interesse biológico.^{42,43,44,45,46}

A simplicidade, sensibilidade, baixos custos e detecção muito próxima ao tempo real (monitoramento “*on line*”), e suas aplicações tem tornado a técnica MIMS,⁴⁷ um método especialmente atraente para a análise de compostos orgânicos voláteis (VOCs) em amostras ambientais. A técnica MIMS tem sido empregada com muito sucesso em análises de compostos orgânicos voláteis e também semi voláteis. Esta técnica está se desenvolvendo rapidamente, apresentando um número crescente de aplicações incluindo o monitoramento de processos químicos em bio-reatores, análise ambiental, monitoramento ambiental “*on line*” de compostos orgânicos voláteis em água e ar, análise de sangue “*in vivo*”, tratamento de resíduos biológicos, bioreatores e no monitoramento de reações.⁴⁸

MIMS é uma técnica analítica na qual uma membrana semi-permeável é utilizada como a única interface entre a amostra (líquida ou gasosa) e o alto vácuo de um espectrômetro de massas. A técnica MIMS convencional é realizada com membranas não porosas, tais como polietileno, Teflon, borracha natural e borracha de silicone. Este material mostra excelente desempenho para medidas de gases e VOCs de caráter hidrofóbico.⁴⁹ Membranas hidrofílicas como o teraftalato de polietileno tem sido utilizadas para detecção de água em solventes orgânicos hidrofóbicos.⁵⁰

A membrana pode ser posicionada, basicamente, de duas maneiras diferentes:

- (a)- no início da linha de transferência, distante da fonte de íons (dispositivo de inserção distante), ou; (Figura 3a)
- (b)- diretamente na entrada da fonte de íons (dispositivo de inserção direta) (Figura 3b)

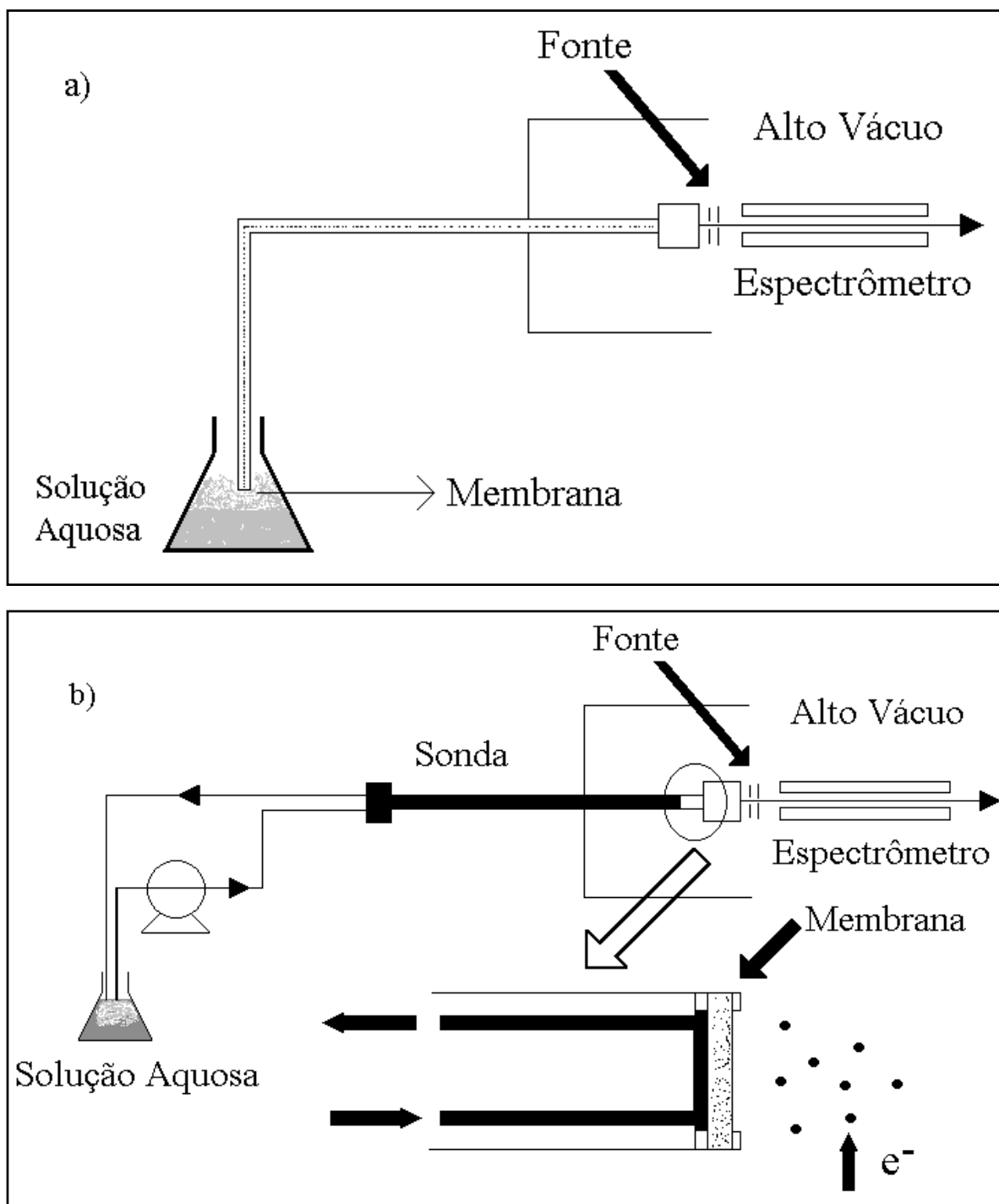


Figura 3: Posicionamento da membrana: (a)- dispositivo de inserção distante; (b)- dispositivo de inserção direta.

As moléculas de soluto, de polaridade próxima à membrana, são adsorvidas na superfície do polímero, difundem-se através das paredes, e evaporam para o espectrômetro de massas. Este processo de três etapas é denominado de pervaporação.

O dispositivo de inserção direta, por diminuir o efeito de memória observado para o dispositivo de inserção distante, veio aprimorar a técnica MIMS.⁴³

O material de membrana mais comumente utilizado é o silicone [poli (dimetil siloxano)], em forma planar ou tubular. A membrana de silicone possui a grande vantagem de apresentar alta permeabilidade para compostos orgânicos hidrofóbicos, sendo então obtidos ótimos limites de detecção. As membranas de silicone são assim ideais para a amostragem de pequenas moléculas de compostos orgânicos em baixas concentrações em fluxos aquosos pois ocorre um enriquecimento acentuado da amostra (aumento na concentração do soluto). Na fonte de ionização do espectrômetro de massas, os VOCs são então ionizados através do uso de ionização química (CI), ou ionização por elétrons (EI).

Entretanto, a seletividade das membranas de silicone também impõem limitações à técnica. Compostos polares, por exemplo, não permeiam bem a membrana, por isso membranas alternativas têm sido testadas com o objetivo de aperfeiçoar a técnica.⁵¹

Para diminuir o limite de detecção de vários VOCs e principalmente dos semi-VOCs, uma série de estratégias de aprisionamento⁵² vem sendo aplicadas em conjunto com a técnica MIMS. Limites de detecção na ordem de ppt podem ser alcançados quando se utiliza um espectrômetro de massas do tipo “ion trap”, onde se realiza alternativamente o aprisionamento dos íons que serão analisados.⁵³ O aprisionamento dos VOCs pode ser feito com material adsorvente como por exemplo uma mistura de óxido de alumínio e óxido de silício, seguida da dessorção térmica dos VOCs, ou por aprisionamento criogênico.⁴⁶

2.2. HISTÓRICO DA TÉCNICA MIMS

A técnica MIMS foi introduzida por Hoch e Kok em 1963⁵⁴ no estudo de cinética de reações fotossintéticas em água. Neste experimento foi empregada uma membrana semi-permeável cuja função era de introduzir uma interface entre a amostra aquosa e o vácuo do espectrômetro de massas.

A técnica MIMS foi então rapidamente adotada por alguns fisiologistas,^{55,56} que miniaturaram sondas de membranas que permitiam a determinação “*in vivo*” de gases em amostras de sangue, estabelecendo a maioria das teorias básicas sobre a técnica no começo da década de 70. A introdução de ionização química e da espectrometria de massas sequencial por Cooks e Brodbelt em 1985⁵⁷ ampliaram a capacidade da técnica MIMS, de um simples monitoramento para um método analítico de amplo espectro na identificação de metabólitos voláteis diretamente em amostras aquosas.

Bier e Cooks em 1987⁵⁸ desenvolveram uma sonda de membrana para a introdução seletiva de moléculas orgânicas diretamente de soluções aquosas para o interior do espectrômetro de massas. A sonda descrita por Bier foi inovadora por permitir a transferência do analito do fluido, do interior de uma membrana capilar diretamente para o interior de uma câmara de ionização. O posicionamento da membrana próximo à região de ionização, onde a elevada temperatura da fonte melhora a permeação do analito, melhorou o tempo de resposta, decresceu o efeito de memória e promoveu assim a alta sensibilidade da técnica.

Bier e col. em 1990⁵⁹ construiu uma sonda de membrana de inserção direta, que foi utilizada para a determinação de compostos orgânicos em amostras aquosas. Esta sonda permitiu o transporte da amostra sobre uma membrana planar. Através do processo de pervaporação, os compostos passam diretamente à fonte de íons de um espectrômetro de massas. Esta configuração, junto com a possibilidade do controle de temperatura na interface membrana/solução, diminuiu o tempo de resposta e o efeito de memória e permitiu alcançar limites de detecção muito baixos (abaixo de 10 ppb).

Lauritsen e col. em 1991⁶⁰ utilizou a espectrometria de massas sequencial por introdução via membrana para identificar metabólitos voláteis em cultura microbiana. O filtrado, sem purificação prévia, foi colocado em uma célula de medidas, e introduzido via membrana para um espectrômetro triplo-quadrupolar. Somente os metabólitos voláteis permearam pela membrana, sendo transferidos para o espectrômetro de massas e analisados por ionização por elétrons e ionização química. Utilizando MIMS/MS, foram identificados dois compostos: o Indol e o dimetil disulfeto, os quais ainda não haviam sido identificados como produtos provenientes do meio de cultura de *Trichomonas*. No meio de cultura de

Breutenomyces previamente incubado na presença dos ácidos cumárico, ferrúlico, siríngico ou vanílico, foi identificada a presença de acetato de etila, que também não havia sido ainda identificado como produto destes reagentes.

Lauritsen e col. em 1993⁶¹ identificaram compostos voláteis diretamente de meios de cultura de fungos *Bjerkandera adusta* através da técnica MIMS/MS. O composto cloro-metoxi-benzaldeído foi pela primeira vez identificado como o principal produto desta fermentação. Além deste, foram também identificados p-metoxi-benzaldeído e benzaldeído. A produção de benzaldeído foi observada logo após a incubação, enquanto a formação do p-metoxi-benzaldeído e cloro-metoxi-benzaldeído ocorreu após alguns dias.

Bauer e Cooks em 1993⁶² com o objetivo de desenvolver um espectrômetro de massas de baixo custo, para o uso em análise de compostos orgânicos de interesse ambiental em água potável e efluentes, modificaram um espectrômetro de massas do tipo “íon trap” da Finningan modelo IT540, o que permitiu seu uso com inserção direta de uma sonda de membrana. O instrumento “ion-trap”, após algumas modificações relativamente simples, pode ser utilizado com a técnica MIMS. O instrumento foi também testado para a análise de amostras sólidas, e as modificações não afetaram sua utilidade original como GC/MS.

Hansen e col. em 1994⁶³ testou um sistema de amostragem para o monitoramento “on line” de compostos orgânicos de baixa volatilidade, analisando soluções padrões de ácido fenoxi acético (POAA). Durante o processo de fermentação, o POAA foi monitorado em baixas concentrações (mM), com alta precisão e tempos de resposta rápidos. Com o auxílio da espectrometria de massas sequencial (MS/MS) foi possível a identificação direta de sinais no espectro de massas, sinais estes que não pertenciam ao POAA. Estes sinais foram identificados como sendo provenientes do SO₂ e SCO.

Cisper e col. em 1995⁶⁴ descreveu um sistema de amostragem com interface de membrana de dois estágios, acoplado a um espectrômetro de massas do tipo “íon trap”, que foi utilizado para análise de compostos orgânicos voláteis em ar com limites de detecção à níveis de parte-por-trilhão (ppt). A interface pode também ser usada em análise sequencial de água e solos, sendo considerada assim uma sensível e versátil ferramenta analítica.

Lenth e Lauritsen em 1995⁶⁵ demonstraram um novo processo para o desenvolvimento da técnica MIMS, mais tarde denominada de Trap & Release MIMS (T&R-MIMS)⁷³ o qual permite que compostos orgânicos semi-voláteis sejam pré-concentrados dentro da membrana, antes de serem termicamente liberados para a fonte de íons. O método utiliza a técnica MIMS padrão com uma membrana tubular de silicone passando direto através da fonte de ionização do espectrômetro de massas. Um corte paralelo à membrana, permitiu que os elétrons do filamento continuamente bombardeassem a superfície da membrana.

A membrana era mantida fria pelo fluxo contínuo de água ou amostra passando através de seu interior. Entretanto, durante uma pequena interrupção do fluxo, a membrana foi rapidamente aquecida pela radiação térmica do filamento e os compostos orgânicos dissolvidos na membrana, termicamente liberados para a fonte de íons. Um pico de dessorção foi obtido, e a área deste pico foi utilizada na quantificação de compostos semi-voláteis e hidrofóbicos, (ponto de ebulição acima de 200 °C) em soluções aquosas abaixo de sub-part-por-bilhão. Uma boa linearidade com um desvio padrão de 5 % foram obtidos.

Maden e Hayward em 1996⁶⁶ empregando novos tipos de membrana como: Teflon, PVC e Poliuretano, tornaram a técnica MIMS cada vez mais eficiente e útil na análise de uma faixa cada vez mais ampla de compostos. A grande maioria das medidas de compostos orgânicos em solução aquosas são feitas com membranas de silicone, isto devido ao grande enriquecimento da amostra alcançado para compostos hidrofóbicos, os quais dissolvem-se e difundem-se muito bem neste tipo de membrana.

Cisper e col. em 1996⁴⁷ mostrou que compostos orgânicos semi-voláteis ou polares, podem ser determinados no ar por um método que consiste na conjugação de ionização por troca de carga e a técnica MIMS. Os experimentos foram realizados em um espectrômetro de massas do tipo “ion-trap” acoplado a uma sonda com membrana tubular. Como reagente de troca de carga foi utilizado o oxigênio, que se difunde através da membrana.

O conhecimento dos possíveis efeitos de matriz é importante quando a técnica MIMS é utilizada com o propósito de quantificação do analito em matrizes complexas. Jelinck e col. em 1996⁶⁷ mostrou a importância do efeito de matriz de compostos não

voláteis com alto peso molecular que não permeiam a membrana, mas afetam substancialmente as condições na solução e na superfície da membrana. Foi observado que o polietileno glicol adsorvido na superfície da membrana de silicone é capaz de baixar a velocidade de permeação do 1-octanol. A escolha de um processo de limpeza adequado diminui tal efeito. Foi sugerido que a adição de surfactantes à água pode ser um eficiente processo de limpeza.

Gordon e col. em 1996⁶⁸ avaliou o monitoramento de poluentes tóxicos no ar, utilizando duas interfaces MIMS de amostragem direta de ar em tempo real. Os experimentos foram realizados em um espectrômetro de massas do tipo “Ion-Trap” nos modos de espectrometria de massas clássica e sequencial. A espectrometria de massas sequencial acoplada a técnica MIMS se mostrou específica e sensível para a caracterização de compostos individualmente. Foram utilizadas interfaces de amostragem direta com membrana de silicone semi-permeável, hélio como gás de arraste, e uma fonte de ionização do tipo “glow discharge”. Compostos orgânicos polares e não polares foram medidos à níveis de traços.

Mendes e col. em 1996⁶⁹ utilizaram a técnica MIMS acoplada a um espectrômetro de massas sequencial para analisar misturas de compostos voláteis (benzeno, tolueno e xileno) em água, com grande rapidez e eficiência, apresentando excelente linearidade, reprodutibilidade e baixos limites de detecção (1 a 10 ppb). Foi mostrado também a utilidade da técnica no monitoramento “on-line” de reações e monitoramento de VOCs em amostras ambientais.

Mendes e col. em 1996⁷⁰ desenvolveram um sistema de pré-concentração de VOCs através do aprisionamento a frio, a técnica foi denominada CT-MIMS. Neste novo sistema os compostos orgânicos voláteis existentes nas matrizes aquosas, após permearem a membrana, são trapeados em um tubo com formato de U que foi construído em aço inox, que é mergulhado em um banho de nitrogênio líquido. Os compostos são trapeados por um determinado período de tempo, após o qual o tubo é aquecido e os VOCs liberados para o aparelho para serem analisados. A sensibilidade do sistema permitiu análise com limite de detecção na faixa de ppt.

Avanços na técnica MIMS resultaram no desenvolvimento da técnica “Trap & Release-MIMS”. Esta técnica foi utilizada por Lauritsen e Ketola em 1997⁷¹ para a determinação quantitativa de compostos orgânicos semi-voláteis em amostras reais. Observou-se que esta técnica é particularmente sensível para a análise de compostos relativamente polares. Por exemplo, o limite de detecção para o ácido acetil-salicílico e para o ácido fenoxi-acético é 100 vezes menor que quando comparado com a técnica MIMS convencional. Até mesmo cafeína, um composto de polaridade relativamente alta, pode ser detectada usando a técnica T&R-MIMS. Para demonstrar a eficiência da técnica, realizou-se a quantificação de cafeína em amostras de café e folhas de chá. Os resultados obtidos foram comparados àqueles obtidos utilizando-se a técnica HPLC, sendo obtida boa concordância.

Nogueira e col em 1999⁷² aplicaram a técnica MIMS para monitorar e comparar três processos de remediação foto catalítica – Reagentes de Fenton/UV, ferroxalato/H₂O₂/UV e TiO₂ - para destruir 2 poluentes comuns em água, fenol e tricloroacético.

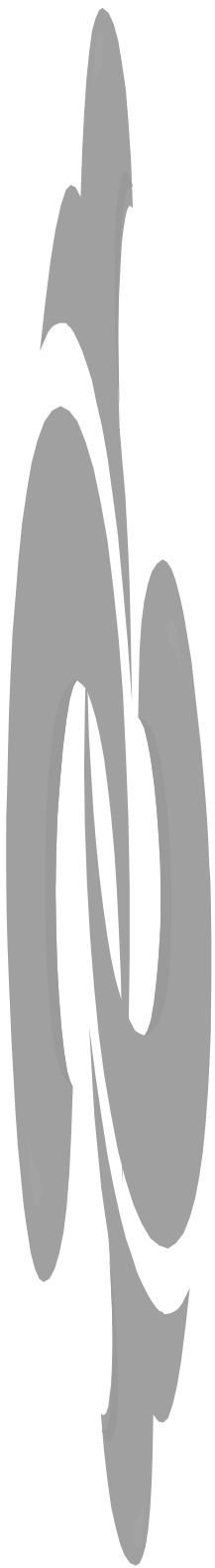
Mendes e Eberlin em 2000⁷³ desenvolveram um novo sistema T&R-MIMS usando uma sonda de membrana de inserção direta (DIMP) para a análise combinada a nível de traços de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis. O sistema difere do sistema T&R-MIMS original, pois ele utiliza uma sonda removível para inserir a membrana capilar dentro do bloco da fonte de íons, exatamente entre dois filamentos paralelos. Este sistema é mais versátil e pode ser operado, durante o passo de aprisionamento da amostra, no modo MIMS padrão.

Mendes e col. em 2000⁷⁴ desenvolveram uma nova técnica derivada da técnica MIMS denominada de HS-MIMS. Este sistema foi utilizado para análise de compostos orgânicos voláteis diretamente de matrizes sólidas sem extração prévia. Este sistema pode ser utilizado para a análise de solo, solos de lagoas de estabilização, tecidos, líquidos viscosos entre outras matrizes sólidas.

-
- ⁴⁰ A. Araki and Y. Sako, Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr.* **(1987)** Nov 27;422:43-52.
- ⁴¹ M. T. Shipchandler and E. G. Moore, Rapid, fully automated measurement of plasma homocyst(e)ine with the Abbott IMx analyzer. *Clin Chem.* **(1995)** Jul;41(7):991-4.
- ⁴² R. C. Johnson, R. G. Cooks, T. M. Allen, M. E. Cisper and P. H. Hemberger, Membrane introduction mass spectrometry: Trends and applications. *Mass Spectrometry Reviews* **(2000)** jan-feb 19: (1) 1-37.
- ⁴³ T. Kotiaho, F. R. Lauritsen, T. K. Choudhury and R. G. Cooks, Membrane Introduction Mass-Spectrometry. *Anal. Chem.*, **(1991)**, sep 15, 63 (18) A875-&.
- ⁴⁴ F. R. Lauritsen and T. Kotiaho, Advances in membrane inlet mass spectrometry (MIMS). *Rev. Anal. Chem.*, **(1996)**, 15,4, 237-264.
- ⁴⁵ N. Srinivasan, R. C. Johnson, N. Kasthurikrishnan, P. Wong and R. G. Cooks, Membrane introduction mass spectrometry. *Anal. Chem. Acta*, **(1997)**, 350, 257-271.
- ⁴⁶ C. S. Creaser, J. W. Stygall and D. J. R. Weston, Developments in membrane inlet mass spectrometry. *Anal Commun*, **(1998)**, 35: Jun (6) 9H-11H.
- ⁴⁷ M. E. Cisper, A. W. Garret, D. Comeron and P. H. Hemberg, Atmospheric analysis using a microwave plasma ionization source and ion trap mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **(1996)**, OCT 19, 178: (1-2), 121-128.
- ⁴⁸ P. S. Wong, H. Cooks, M. E. Cisper and P. H. Hembergr, Online, In-Situ Analysis with Membrane Introduction MS. *Environmental Science & Technology*, **(1995)**, may 29: (5) A215-A218.
- ⁴⁹ H. Degn, Membrane Inlet Mass-Spectrometry in Pure and Applied Microbiology. *Microbiol. Methods*, **(1992)**, may 15: (3) 185-197.
- ⁵⁰ S. Bohatka, Process monitoring in fermentors and living plants by membrane inlet mass spectrometry. *Rapid Communication Mass Spectrometry*, **(1997)**, SP 11: (6) 656-661.
- ⁵¹ C. S. Creaser and J. W. Stygall, Membrane Introduction - Ion-Trap Mass-Spectrometry for the Determination of Volatile Organics in Aqueous Effluents. *ANAL PROC* **(1995)** JUL 32: (7) 286-286.
- ⁵² M. A. Mendes, R. S. Pimpim, T. Kotiaho, J. S. Barone and M. N. Eberlin, Construção de uma nova membrana e sua aplicação na análise de compostos orgânicos voláteis em água através da técnica MIMS e MIMS/MS. *Química Nova*, **(1996)**, 19, 480-485.
- ⁵³ J. A. Shoemaker and T. A. Bellar, Determination of Polar Volatile Organic-Compounds in Water by Membrane Permeate and Trap GC-MS. *J. Chromatogr. Sci.*, **(1993)**, 31, 279- 284.
- ⁵⁴ G. Hoch and B. Kok, A Mass Spectrometer Inlet System For Sampling Gases Dissolved in Liquid Phases. *Arch Biochem Biophys* **(1963)** 101: (1) 160-&.
- ⁵⁵ S. Woldring, Biomedical Application Mass Spectrometry for Monitoring Pressures: A technical Review. *Journal of Association for the Advancement of Medical Instrumentation*, **(1970)**, 4, 43-56.
-

-
- ⁵⁶ A. Wald and K. H. Ransholf, Experience with a Mass Spectrometer System for Blood Gas Analysis in Humans. *Journal of Association for the Advancement of Medical Instrumentation*, **(1971)**, 5, 325-341.
- ⁵⁷ R. G. Cooks and J. S. Brodbelt, An Exceedingly Simple Mass Spectrometer Interface with Application to Reaction Monitoring and Environmental Analysis. *Anal. Chem.*, **(1985)**, 57, 1153.
- ⁵⁸ M. E. Bier and R. G. Cooks, Membrane Interface for Selective Introduction of Volatile Compounds Directly into the Ionization of a Mass Spectrometer. *Anal. Chem.*, **(1987)**, 59, 597-601.
- ⁵⁹ M. E. Bier, T. Kotiaho and R. G. Cooks, Direct Insertion Membrane Probe for Selective Introduction Of organic Compounds into Mass Spectrometer. *Analytica Chimica Acta*, **(1990)**, 231, 175-190.
- ⁶⁰ F. R. Lauritsen, L. T. Nielsen, H. Deng, D. Lloyd and S. Bohátka, Identification of Dissolved Volatile in Microbial Cultures by Membrane Inlet Tandem Mass Spectrometry. *Biological Mass Spectrometry*, **(1991)**, 20, 253-258.
- ⁶¹ F. R. Lauritsen, T. Kotiaho and D. Loyd, Rapid and Direct Monitoring of Volatile fermentation Products in the Fungus *Bjerkandera adusta* by Membrane Inlet Mass Spectrometry. *Biological Mass Spectrometry*, **(1993)**, 22, 585-589.
- ⁶² J. S. Bauer and R. G. Cooks, Performance of an Ion Trap Mass Spectrometer Modified to Accept Insertion membrane Probe in a Analysis of Low Level Pollutants in Water. *Talanta*, **(1993)**, 40, 1031-1039.
- ⁶³ K. F. Hansen, F. R. Lauritsen, and H. Degn, An on line System for Fermentation Using Membrane Inlet Mass Spectrometry (MIMS): Application to Phenoxyacetic Acid Monitoring in Penicillin Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, **(1994)**, 44, 347-353.
- ⁶⁴ M. E. Cisper, C. G. Gill, L. E. Townsend and P. H. Hemberger, On-Line Detection of Volatile Organic Compounds in Air at Parts-per-Trillion Levels by Membrane Introduction Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **(1995)**, 67, 1413-1417.
- ⁶⁵ M. Lenth and F. R. Lauritsen, A fully Integrated Trap-Membrane Inlet Mass Spectrometry System for the Measurement of Semi-Volatiles Organic Compounds in Aqueous solution", *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, **(1995)** 9 (7), 591.
- ⁶⁶ A. J. Manden and M. J. Hayward, Sheet Materials for Use as Membrane in Membrane Introduction Mass Spectrometry. *Anal Chem*, **(1996)**, 68, 1805-1811.
- ⁶⁷ J. Jelinck, Matrix Effects in Membrane Introduction Mass Spectrometry, I- Effect of Poly (Ethylene Glycol) on Permeation Rate of 1 Octanol through Silicone rubber Membrane. *Chem. Papers*, **(1996)**, 50 (3), 131-137.
- ⁶⁸ S. M. Gordon, P. J. Callahan, D. V. Kenny, and J. D Pleil, Direct Sampling and Analysis of Volatile Organic Compounds in Air by Membrane Introduction and Glow Discharge Ion Trap Mass Spectrometry with Filtered Noise Fields. *Rapid Communications in Mass spectrometry*, **(1996)**, 10, 1038-1046.
- ⁶⁹ M. A. Mendes, R. S. Pimpim, T. Kotiaho, J. S. Barone e M. N. Eberlim, Construção de uma Sonda de Membrana e sua Aplicação na Análise de Compostos Orgânicos Voláteis em Água Através da Técnica MIMS e MIMS/MS", *Química Nova*, **(1996)**, 19(5), 480-485.
-

-
- ⁷⁰ M. A. Mendes, R. S. Pimpim, T. Kotiaho and M. N. Eberlin, A CryoTrap Membrane Introduction Mass Spectrometry System for Analysis of Volatile Organic Compounds in Water at the Low Part-per-Trillion Level. *Anal. Chem.*, **(1996)**, 68, 3502-3506.
- ⁷¹ F. R. Lauritsen and R. A. Ketola, Quantitative Determination of Semivolatile organic Compounds in Solution Using Trap-and-Release Membrane Inlet mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **(1997)**, 69, 4917-4922.
- ⁷² R. F. P. Nogueira, R. M. Alberici, M. A. Mendes, W. F. Jardim and M. N. Eberlin, Photocatalytic Degradation of Phenol and Trichloroethylene: On-Line and Real-Time Monitoring via Membrane Introduction Mass Spectrometry. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **(1999)**, 38, 1754-1758.
- ⁷³ M. A. Mendes and M. N. Eberlin, Trace level analysis of vocs and semi-vocs in aqueous solution using a direct insertion membrane probe and trap and release membrane introduction mass spectrometry. *Analyst*, **(2000)**, 125, 21-24.
- ⁷⁴ M. A. Mendes, R. Sparrapan and M. N. Eberlin, Headspace Membrane Introduction Mass Spectrometry for Trace Level Analysis of VOCs in Soil and Other Solid Matrixes. *Anal. Chem.*, **(2000)**, 72, 2166-2170.



MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. O SISTEMA DIMP/T&R-MIMS

A Figura 4 mostra duas seções de cortes ortogonais da nova sonda de membrana designada por DIMP e das modificações realizadas na fonte de ionização, para a adaptação desta sonda. Nesta figura observa-se a sonda DIMP (**A**), com uma membrana capilar em forma de “loop” tendo aproximadamente 10 mm de comprimento (**B**), montada dentro da sonda de íons (**D**). Um adaptador de cerâmica para a sonda (**F**) assegura a vedação necessária. Através de um fino ajuste a membrana (**B**) foi posicionada exatamente entre os dois filamentos (**C**), permitindo desta forma um aquecimento rápido e eficiente da mesma. A membrana é aquecida em toda a sua superfície. O filamento localizado no topo da fonte de ionização aquece a superfície externa do topo do “loop” formado pela membrana, e a superfície interna da base do “loop”, enquanto o filamento inferior aquece a superfície externa da base do “loop”, e a superfície interna do topo do “loop”. Este aquecimento uniforme é obtido por um correto posicionamento da membrana, ou seja a membrana deve estar levemente inclinada. Este aquecimento uniforme reduz substancialmente o efeito de memória.

A grande diferença deste sistema de sonda de membrana é que ao contrário dos sistemas encontrados na literatura, a membrana não é mantida fixa dentro da fonte de íons, mas sim fixada em uma sonda removível. Isto permite que a membrana seja trocada com maior facilidade, sem a necessidade de desligar o equipamento. A sonda DIMP só é utilizada quando necessário, tornando possível o emprego de outras sondas. Pequenas modificações feitas na fonte de ionização permitem que ela seja utilizada para análises de espectrometria de massas convencional.

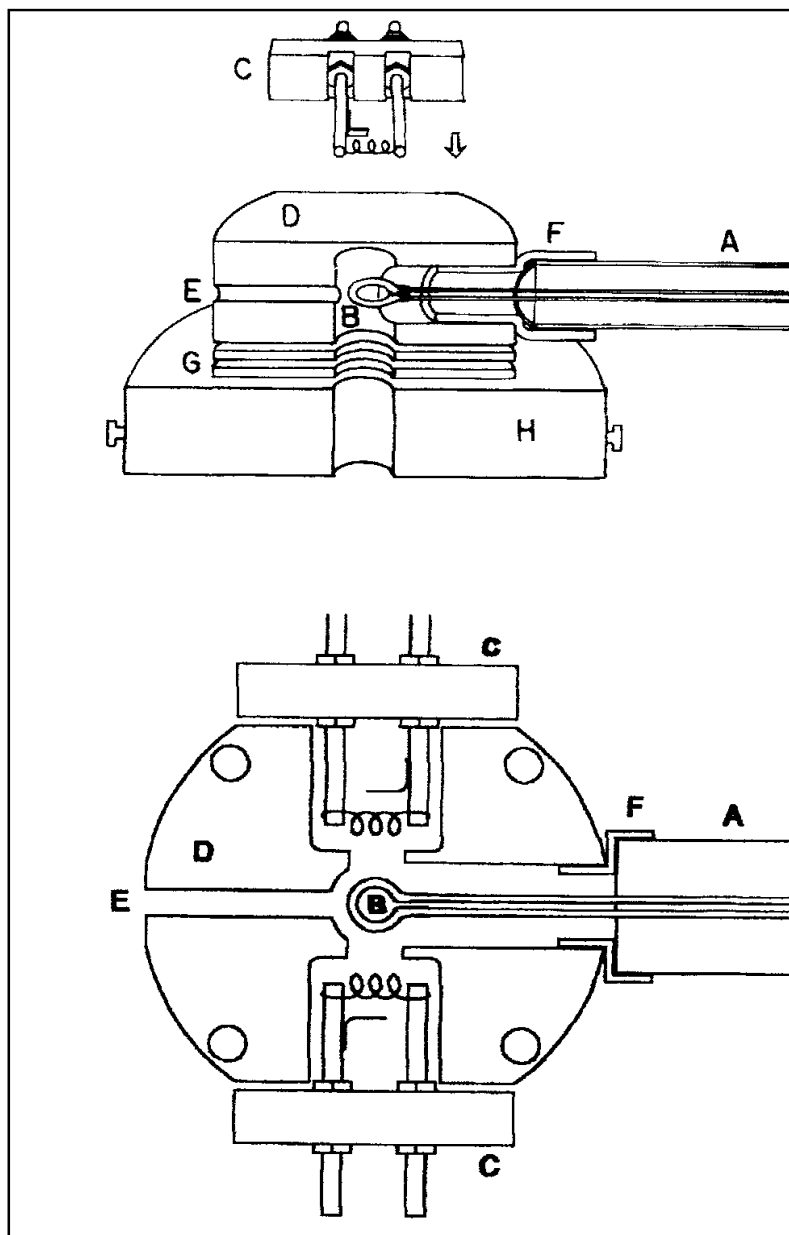


Figura 4.: Dois cortes ortogonais do sistema DIMP/T&R-MIMS: Os itens em negrito são: (A) sonda DIMP; (B) “loop da membrana capilar”; (C) filamentos; (D) bloco da fonte de íons; (E) entrada de gás para CI; (F) adaptador de cerâmica para a sonda; (G) lentes; (H) fonte de íons.

3.1.1. Modo de Operação

De maneira similar ao sistema T&R-MIMS⁷¹, o sistema DIMP/T&R-MIMS (Foto 1a e 1b)⁷³ pode ser operado de dois modos, como sistema MIMS convencional e T&R-MIMS. No modo T&R-MIMS o sistema funciona da seguinte maneira: em uma sala mantida à uma temperatura controlada de 25° C a amostra que esta dentro de uma frasco será analisada, bombeando-a através do sistema por um intervalo de tempo de 20 min. Isto permite que a amostra seja pré concentrada no interior da membrana, a qual é mantida fria através do fluxo de fluído. O fluxo de amostra é então interrompido de uma maneira simples, (através da remoção do tubo da solução aquosa de onde está sendo feita a amostragem) por um intervalo de tempo de 1 min. e o conseqüente bombeamento de um fluxo de ar pelo sistema. Esta interrupção no fluxo provoca o aquecimento da membrana e conseqüentemente a volatilização dos compostos que ficaram adsorvidos na mesma. Após a passagem do fluxo de ar, água destilada é bombeada pelo sistema para se efetuar a limpeza da membrana, ou seja, a água é então bombeada através da membrana por um certo período de tempo (de 1 a 2 min). Faz-se novamente a interrupção deste fluxo e o conseqüente bombeamento de um fluxo de ar aquecendo desta forma a membrana e volatilizando os composto que ainda estejam adsorvidos na mesma. Estes passos devem ser repetidos até a limpeza completa da membrana.

Obs: A sonda DIMP foi modificada para que o volume de amostra necessário para análise de homocisteína fosse o mínimo possível. Após as modificações na sonda DIMP, o volume de amostra necessária para análise ficou bem reduzido, sendo necessário 1,5 ml para percorrer todo o circuito; que compreende desde o frasco da amostra passando por toda a sonda, chegando a membrana e retornando novamente para o frasco de amostra.

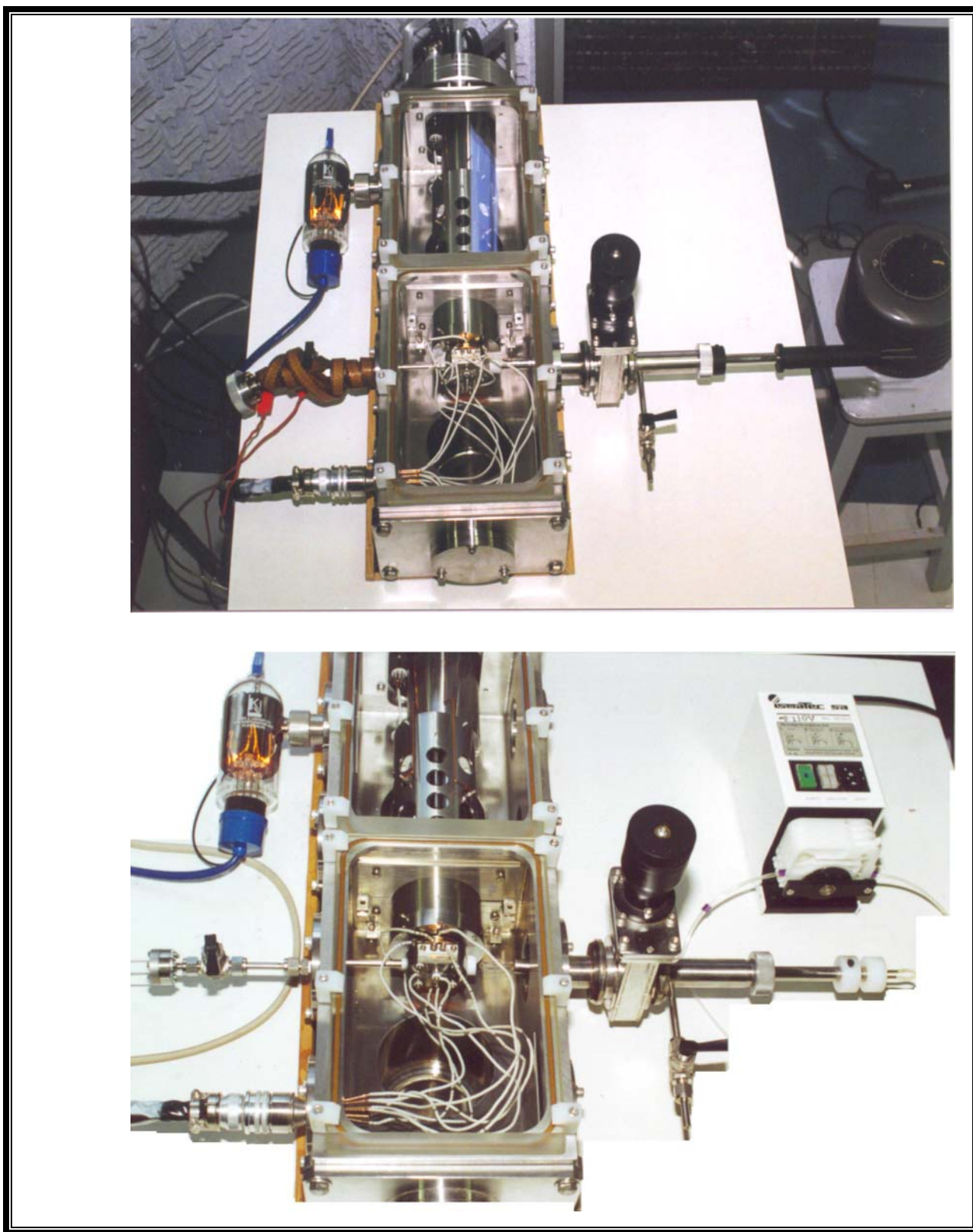


Foto 1: a) Espectrômetro de Massas Mono quadrupolar Extrel b) DIMP/T&R-MIMS.

3.2. EXPERIMENTOS REALIZADOS PARA TESTAR O SISTEMA DIMP/T&R-MIMS

3.2.1. Perfil do Sinal

Podemos observar na Figura 5 que o perfil típico de um sinal para uma análise DIMP/T&R-MIMS, utilizando-se para isto uma solução de β -naftol 25 μ M. O experimento foi realizado utilizando monitoramento de íon seletivo. O sinal escolhido para o monitoramento do β -naftol foi seu íon molecular de m/z 144. No momento em que a solução começa a fluir através do sistema (a), pode ser observado um aumento na intensidade do sinal, correspondendo à resposta do sistema em seu modo MIMS convencional, porém este aumento é pouco significativo, não permitindo uma análise a baixos limites de detecção. Então o fluxo de amostragem é interrompido (b), quando o fluxo de ar alcança a membrana (c) a temperatura aumenta rapidamente, o composto pré-concentrado é então térmica e eficientemente liberado para a fase gasosa. Desta forma, a intensidade do sinal aumenta e após alguns segundos decresce novamente, produzindo assim um sinal bem definido e consideravelmente estreito. β Para o -naftol foi obtido um sinal aproximadamente 50 vezes mais intenso. Quando o fluxo de ar termina (d) e a água é novamente bombeada através do sistema, onde a membrana é rapidamente resfriada, fazendo com que o sinal retorne à sua intensidade inicial.

3.2.2. Efeito de Memória

A limpeza da membrana para a eliminação dos SVOC residuais é realizada da seguinte maneira: bombeia-se água pelo sistema durante 1 min, após este tempo interrompe-se o fluxo de água deixando o fluxo de ar passar pela membrana, sendo esta aquecida posteriormente. Esta etapa é repetida até que a membrana esteja completamente limpa. Os SVOC são quase que completamente eliminados na primeira lavagem como pode ser observado na Figura 5, e a limpeza torna-se completa na segunda lavagem, resultando somente o pico de desorção (f). A abundância deste pico é praticamente igual ao aumento da linha base ocasionado pelo aquecimento da própria membrana, ou seja, do ruído químico da membrana⁷¹.

No sistema T&R-MIMS original⁷¹, pode se utilizar apenas um filamento, mas a face da membrana que não fica voltada para o filamento não é aquecida de maneira suficiente durante o passo de desorção, tornando desta forma o sistema mais suscetível a efeitos de memória. O aquecimento uniforme da membrana promovido pelo sistema DIMP/T&R-MIMS resulta em uma desorção térmica uniforme melhorando a sensibilidade do sistema e reduzindo possíveis efeitos de memória, consequentemente diminuindo o tempo de análise.

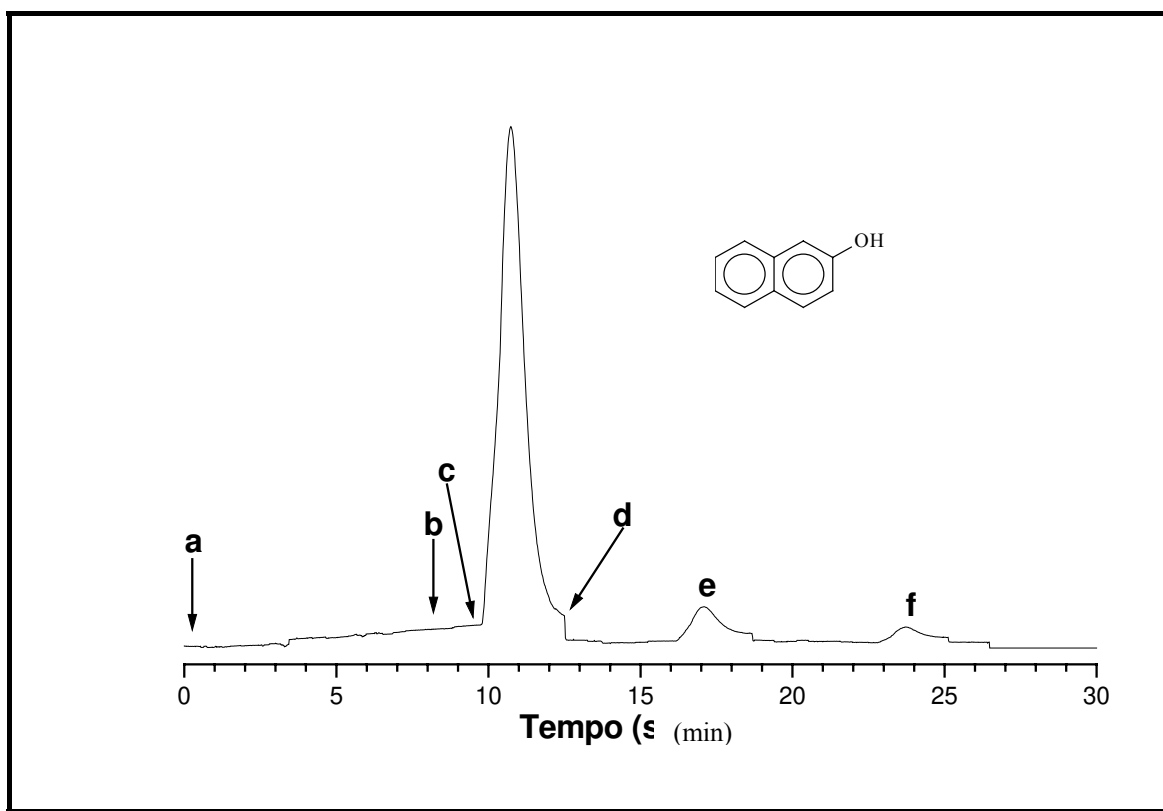


Figura 5: Perfil do sinal do sistema DIMP/T&R-MIMS utilizando o modo de varredura SIM para uma solução de b-naftol 25 mM. (a) início do bombeamento da solução; (b) introdução de fluxo de ar no sistema; (c) chegada do fluxo de ar à membrana; (d) chegada de água à membrana; (e) primeira limpeza; (f) segunda limpeza.

3.2.3. Exemplos de Aquisição de Espectros de Massas Completos

O pico DIMP/T&R-MIMS tem tempo de duração consideravelmente curto, mas mesmo assim é suficientemente longo para permitir a aquisição de vários espectros de massa completos dos composto que estão sendo analisados. Isto permite que se faça a identificação do analito com grande margem de segurança. A Figura 6 mostra exemplos de espectros de massas obtidos através do sistema DIMP/T&R-MIMS. Os espectros foram adquiridos no tempo de desorção máximo utilizando-se para isto solução diluída (25 μ M) de alguns SVOC de relativa importância. Os testes preliminares mostraram a eficiência do sistema para análise de alguns compostos orgânicos tais como: benzo(a)pireno, β -naftol, nicotina, fenantreno, ácido láctico, dimetilsiloxano (DMSO) e cafeína.

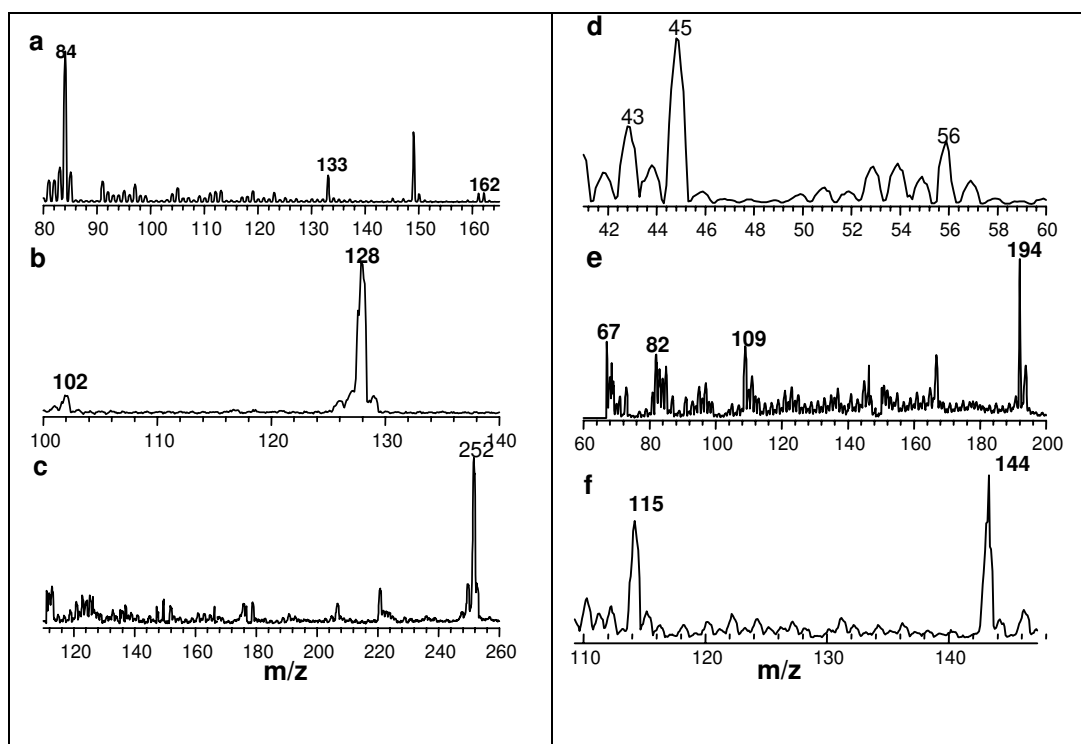
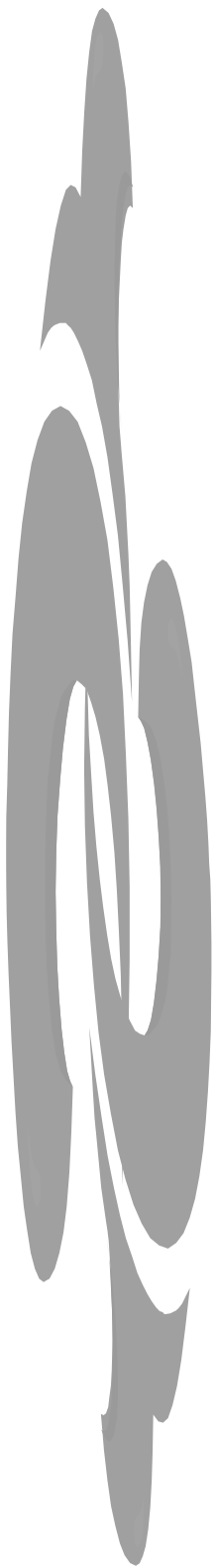


Figura 6: Espectros de massas (EI a 70eV) obtidos com o sistema DIMP/T&R-MIMS. Soluções aquosas (25 mM); (a) nicotina; (b) naftaleno; (c) benzo(a)pireno; (d) ácido láctico; (e) cafeína; (f) β -naftol.

3.3. EQUIPAMENTOS E REAGENTES

Os experimentos foram realizados em um espectrômetro de massas monoquadrupolar Extrel (Pittsburg, PA) adaptado com um quadrupolo de $\frac{3}{4}$ " de alta transmissão, utilizando EI com energia de ionização de 70 eV. Os experimentos foram realizados em sala com temperatura controlada (23 ± 1 °C). A solução contendo o analito foi bombeada através do sistema por uma bomba peristáltica de oito rolos à uma vazão de, aproximadamente, 2,0 mL/min. A membrana capilar utilizada foi fornecida pela a Dow Corning Co (Silastic Medical-Grade tubing) com espessura da parede de 0,011", diâmetro interno de 0,025" e diâmetro externo de 0,047". Para uma perfeita adaptação da membrana capilar nos tubos de aço inox (diâmetro de 1/24") a mesma foi mergulhada em hexano, permitindo assim que ela se expandisse, e que após a evaporação do hexano obtem-se uma forte vedação. Todos os reagentes para o desenvolvimento da técnica proposta foram adquiridos com alto grau de pureza (P.A.). Cloroformiato de etila (Aldrich), Etanol (Synth), Piridina (Synth). DL-dithiothreitol (DTT) (Sigma), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) adquirido na forma de sal de sódio (Nuclear), ácido tricloroacético (TCA) (Merck), DL-homocisteína (ácido 2-amino-4-mercaptobutirico) e cloridrato de L-cisteína (Sigma). Utilizou-se também vortex modelo AP56 (Phoenix), e centrífuga modelo Q-222-T18 (Quimis).



4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

Solução de EDTA (Nuclear) saturada: em um balão de volumétrico contendo água destilada adicionou-se EDTA na forma de sal de sódio até se obter uma solução saturada.

Solução de DL- dithiothreitol a 1,0 mM: pesou-se 0,080 g de DTT (Sigma), após completou-se o volume com água destilada em um balão volumétrico de 5,0 mL,

Cloroformiato de etila: utilizou-se o cloroformiato de etila (Aldrich) em sua forma original.

Solução de ácido tricloroacético a 5%: pesou-se 5,0 g de TCA (Merck), após dissolveu-se com água destilada para um volume em um de 100 mL utilizando-se balão volumétrico.

DL-homocisteína 500 μ M: pesou-se 0,0032 g de DL-homocisteína (Sigma) e seu volume foi levado à 50 mL em balão volumétrico

Solução de Água-etanol-Piridina: em um balão volumétrico de 100mL colocou-se 60 mL de água destilada, 32 mL de etanol (Synth) e 8,0 mL de piridina (Synth).

Obs: *Todos os reagentes e solventes foram adquiridos com alto grau de pureza.*

4.2. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

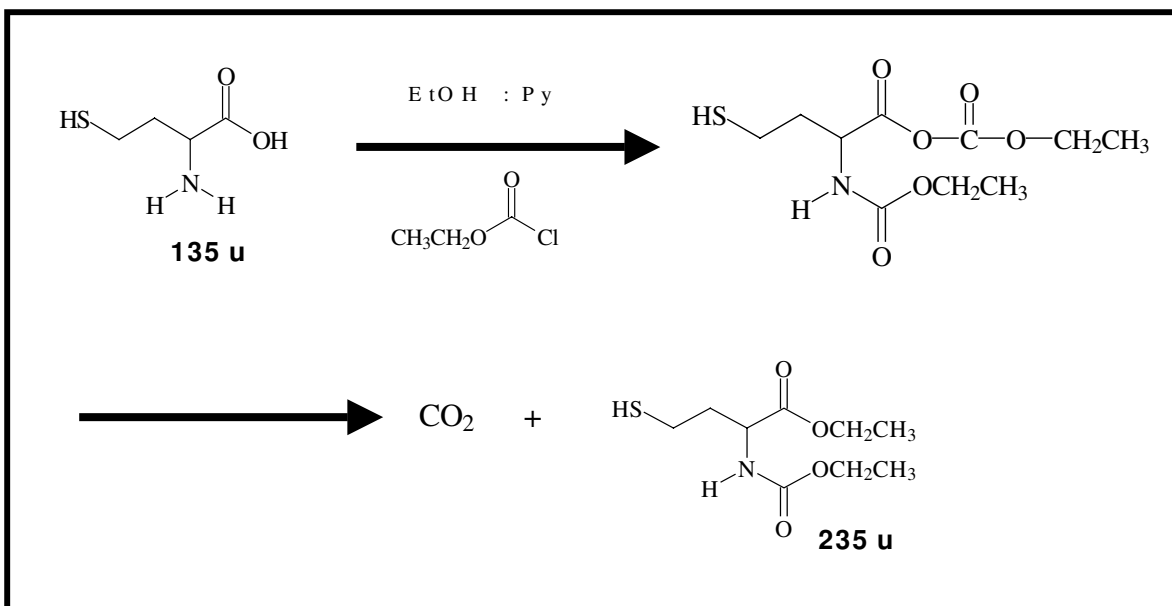
Na preparação da amostra para análise, 3,0 mL de sangue total são coletados em tubos Vacutainer[®] contendo EDTA a 7%. O tubo é imediatamente centrifugado à 1000 x g durante 5 minutos a 4°C. Para a determinação total de homocisteína, uma parte do plasma (1,0 mL) é tratado com 100 μ L de solução de EDTA (saturada) e 250 μ L de solução de DTT 1,0 mM durante 30 minutos à 36°C, para reduzir os tióis e desacoplar a homocisteína da proteína presentes no plasma. A solução então é misturada com uma solução à 5% de ácido tricloroacético (1,0 mL) e agitado vigorosamente em vortex para que ocorra a desproteinização da amostra. Após todas estas etapas esta amostra é centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos.

4.3. PROCEDIMENTO DE DERIVATIZAÇÃO

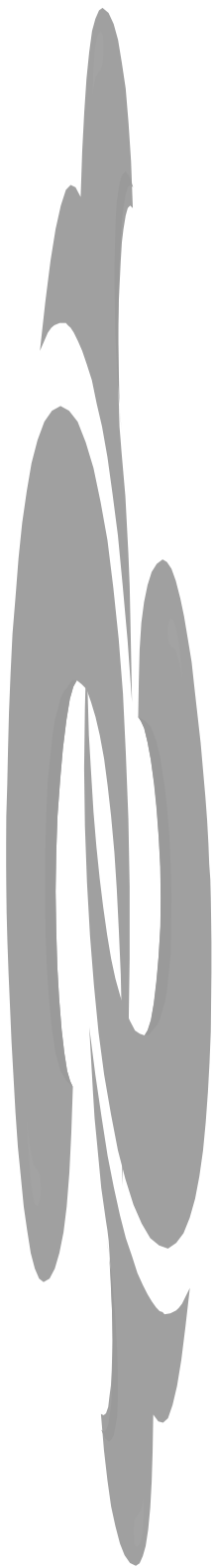
Após o tratamento da amostra, 1,5 mL de sobrenadante foi separado, e então adicionados 100 µL de uma solução de água-etanol-piridina (60:32:8), previamente preparada, e 25µL de cloroformiato de etila (derivatizante) e homogeneizado em frasco de 3,0 mL com tampa. Nesta etapa ocorre liberação de dióxido de carbono (Equação 1).

Para realização da curva de analítica, foi preparada uma solução estoque padrão de homocisteína em água na concentração de 500 M. Esta solução foi tratada e derivatizada da mesma forma que a amostra.

Após as etapas de tratamento e derivatização, a curva foi construída através de sucessivas diluições da solução estoque em água destilada. Esta solução foi preparada diariamente devido à falta de informações sobre a estabilidade do produto de derivatização. O processo de aquisição dos espectros de massas utilizando a técnica DIMP/T&R-MIMS foi realizado como descrito anteriormente no tópico Modo de Operação na página 39.



Equação 1: Mecanismo de derivatização da homocisteína.



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ANÁLISE DA HOMOCISTEÍNA SÉRICA

Os resultados obtidos nos primeiros ensaios realizados com a homocisteína utilizando-se o sistema DIMP/T&R-MIMS, mostraram que não foi possível analisar a homocisteína sem tratamento prévio da amostra. Estes testes foram realizados em matrizes aquosas sem tratamento prévio da amostra e, devido a alta polaridade e conseqüente baixa permeabilidade da molécula homocisteína pela membrana de silicone não foram obtidos os resultados desejados. Um método alternativo para esta análise foi realizado através da derivatização da amostra que corresponde à transformação deste aminoácido em um produto menos polar e mais estável a altas temperaturas. O método de derivatização utilizado foi o proposto por Husek em 1991⁷⁵, que realiza a esterificação do aminoácido tornando-o menos polar. A derivatização da homocisteína ocorre tanto no grupo amino, bem como no grupo ácido pela adição de uma mistura de solventes contendo água, etanol e piridina na proporção 60:32:8. O meio alcalino é responsável pela abstração do hidrogênio ácido da molécula de homocisteína, tanto do grupo ácido, como do grupo amino. A seguir foi adicionado o cloroformiato de etila e o produto desta reação (Equação 1) foi analisado, obtendo-se os resultados desejados. Nesta reação ocorre a liberação de uma grande quantidade de dióxido de carbono, como observado na Equação 1.

A Figura 7 mostra dois espectros de massas da homocisteína que não foi submetida ao processo de derivatização. A Figura 7a mostra um espectro de massas obtido utilizando-se o sistema DIMP/T&R-MIMS de uma solução de homocisteína em água destilada utilizando varredura completa de íons, comparando-se este espectro com um espectro de massas obtido da literatura (Figura 7b) observa-se que a homocisteína não permeia a membrana mesmo após aquecimento, pois não são observados os picos de massas referentes a este composto.

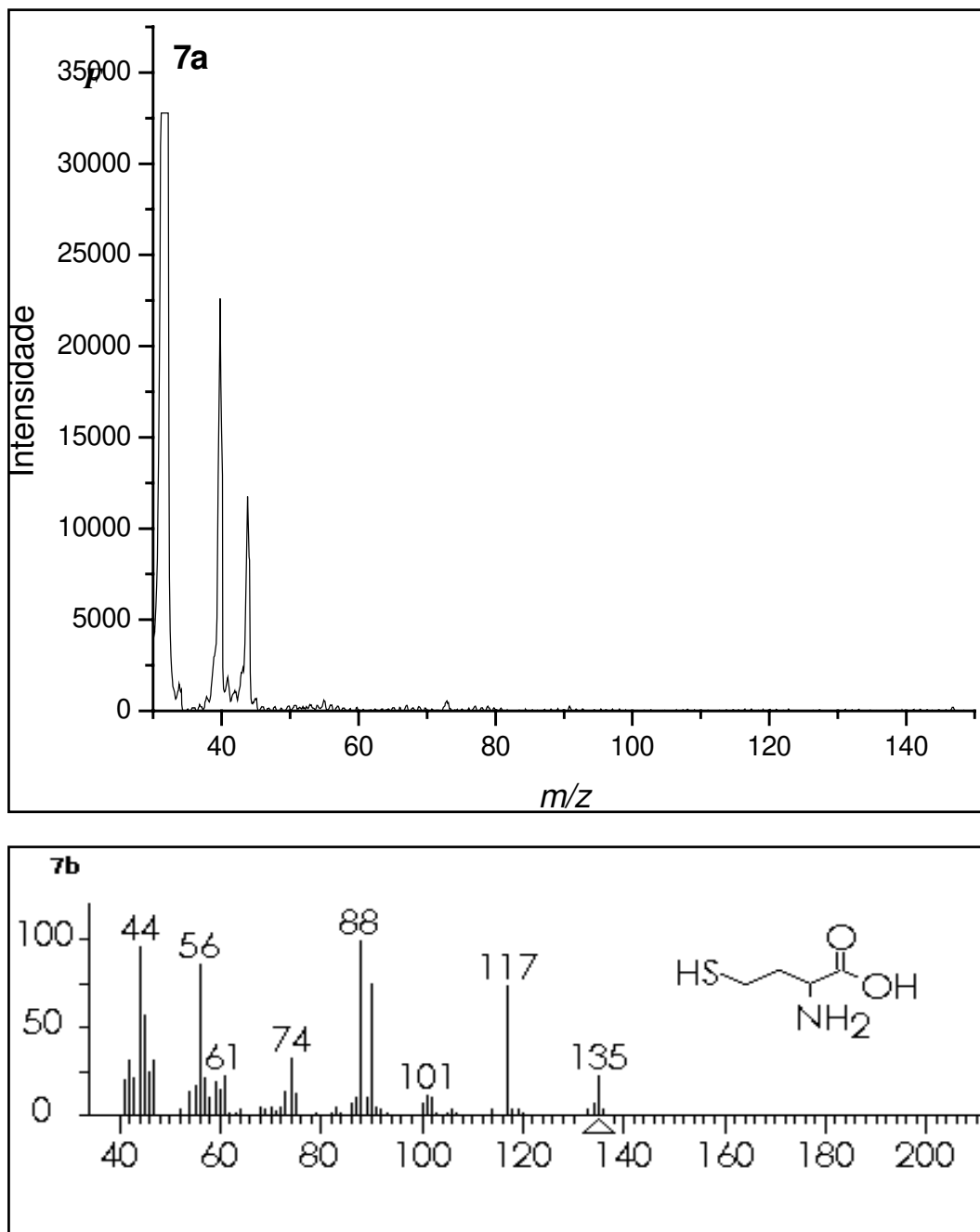


Figura 7: (7a) Espectro de massas EI a 70ev obtido de uma solução de homocisteína em água destilada utilizando a técnica DIMP/T&R-MIMS em varredura completa de íons; (7b) Espectro de massas EI a 70ev da homocisteína obtido de literatura (NIST).

Após o processo de derivatização novos espectros de massas foram obtidos realizando-se a varredura completa de íons, e desta vez são observados alguns íons de boa intensidade, indicando desta maneira a provável formação de algum derivado que permeia com eficiência a membrana (Figura 8b). Para se ter certeza que o derivado provém da homocisteína, um branco contendo somente os reagentes de derivatização também foi analisado (Figura 8a). Analizando-se os dois espectros de massas podemos observar que se formaram os picos de m/z 118, 126 e 145 correspondentes aos compostos utilizados na derivatização, bem como de produtos de algumas reações que possam ter ocorrido entre eles. Os outros íons do espectro da Figura 8b, íons de m/z 175, 188, 189 e 234, são portanto referentes à homocisteína derivatizada. Um outro íon de m/z 207 presente no espectro de massas da Figura 8b não decorre da homocisteína derivatizada, e sim da liberação de ftalatos da membrana devido ao aquecimento da mesma. Esteres de ácido ftálico, os ftalatos, são aditivos comuns de polímeros sintéticos

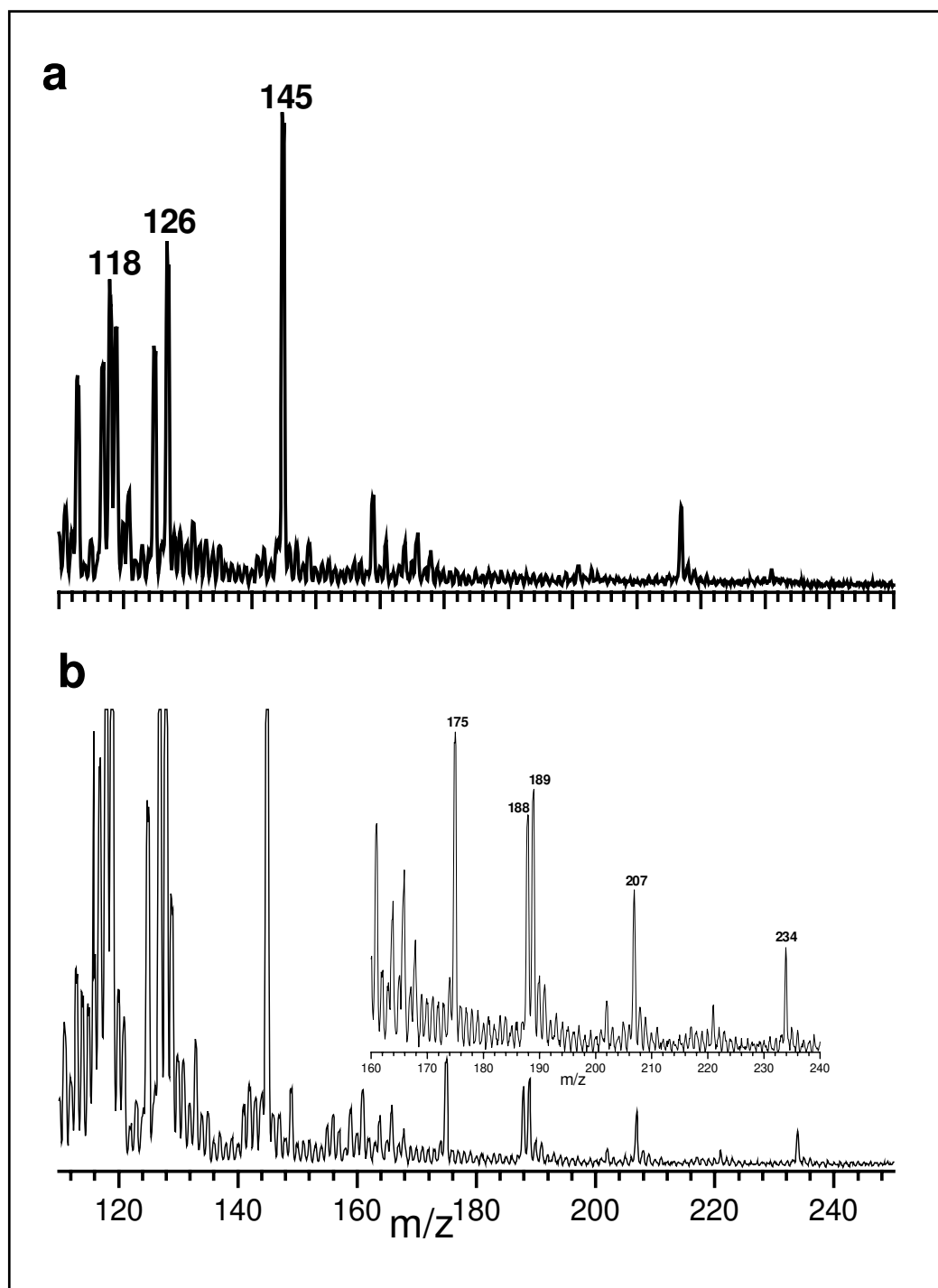


Figura 8: Espectro de massas EI a 70ev obtido com a técnica DIMP/T&R-MIMS: (a) branco, (b) após a derivatização de uma solução de homocisteína.

5.2. COMPROVAÇÃO DA DERIVATIZAÇÃO E ESCOLHA DE SINAIS PARA QUANTIFICAÇÃO DA HOMOCISTEÍNA

Para se provar que havia realmente ocorrido a derivatização da homocisteína, e identificar os sinais dos espectros de massas para posterior monitoramento, foi realizada uma análise de GC/MS dos compostos derivatizados.

Para o estudo de GC/MS a homocisteína foi derivatizada juntamente com a cisteína, pois a cisteína possui estrutura e peso molecular próximo ao da homocisteína, diferindo desta apenas pela presença adicional de um grupo metileno. A escolha do sinal de monitoramento é muito importante, pois o sangue é constituído de uma matriz bastante complexa, onde a presença de interferentes pode ser muito comum. Como a cisteína é um componente presente na corrente circulatória ele pode ser um interfereinte importante.

A Figura 9 mostra o cromatograma obtido da mistura de homocisteína e cisteína derivatizadas. Os compostos mostraram tempos de retenção distintos sendo 18,2 min. para a cisteína e 19,4 min. para a homocisteína. Para a realização deste estudo em GC/MS tanto a cisteína bem como a homocisteína foram simultaneamente derivatizadas em meio aquoso. Após a derivatização os compostos formados foram extraídos com clorofórmio. O clorofórmio foi então evaporado e os produtos da derivatização foram dissolvidos em acetato de etila e posteriormente analisados.

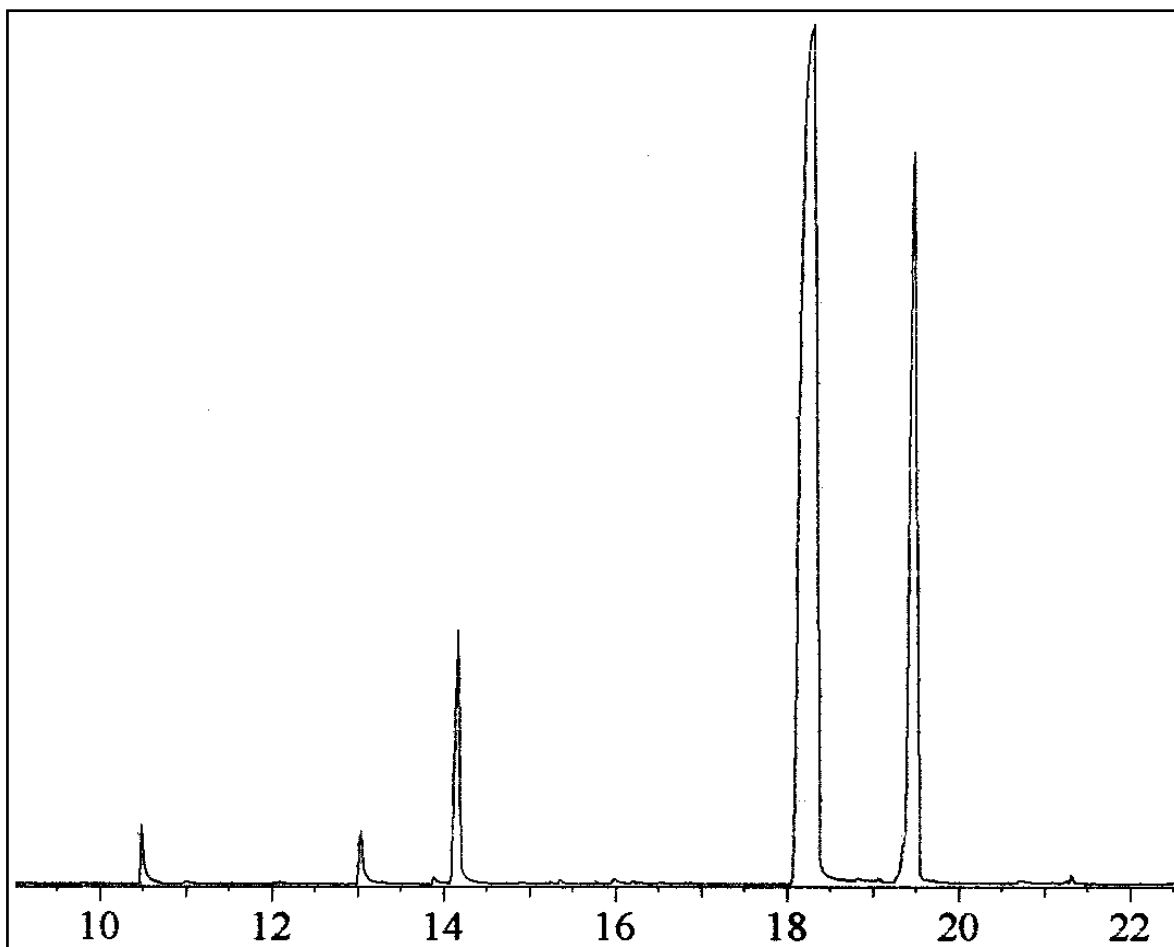


Figura 9: Cromatograma total de GC-MS da mistura de homocisteína e cisteína derivatizadas: os picos em 18.2 e 19.4 minutos são correspondentes à cisteína e homocisteína, respectivamente.

Na Figura 10 podemos observar o espectro de massas obtido para os dois compostos derivatizados (Figura 10a referente a cisteína e a Figura 10b à homocisteína). A análise destes espectros demonstrou que os dois compostos formam o íon $[M-H]^+$ de m/z 220 e 234 para a cisteína e homocisteína respectivamente, entre outros referente a perda de hidrogênio radicalar bem como de outros fragmentos ionizados provenientes dos compostos derivatizados.

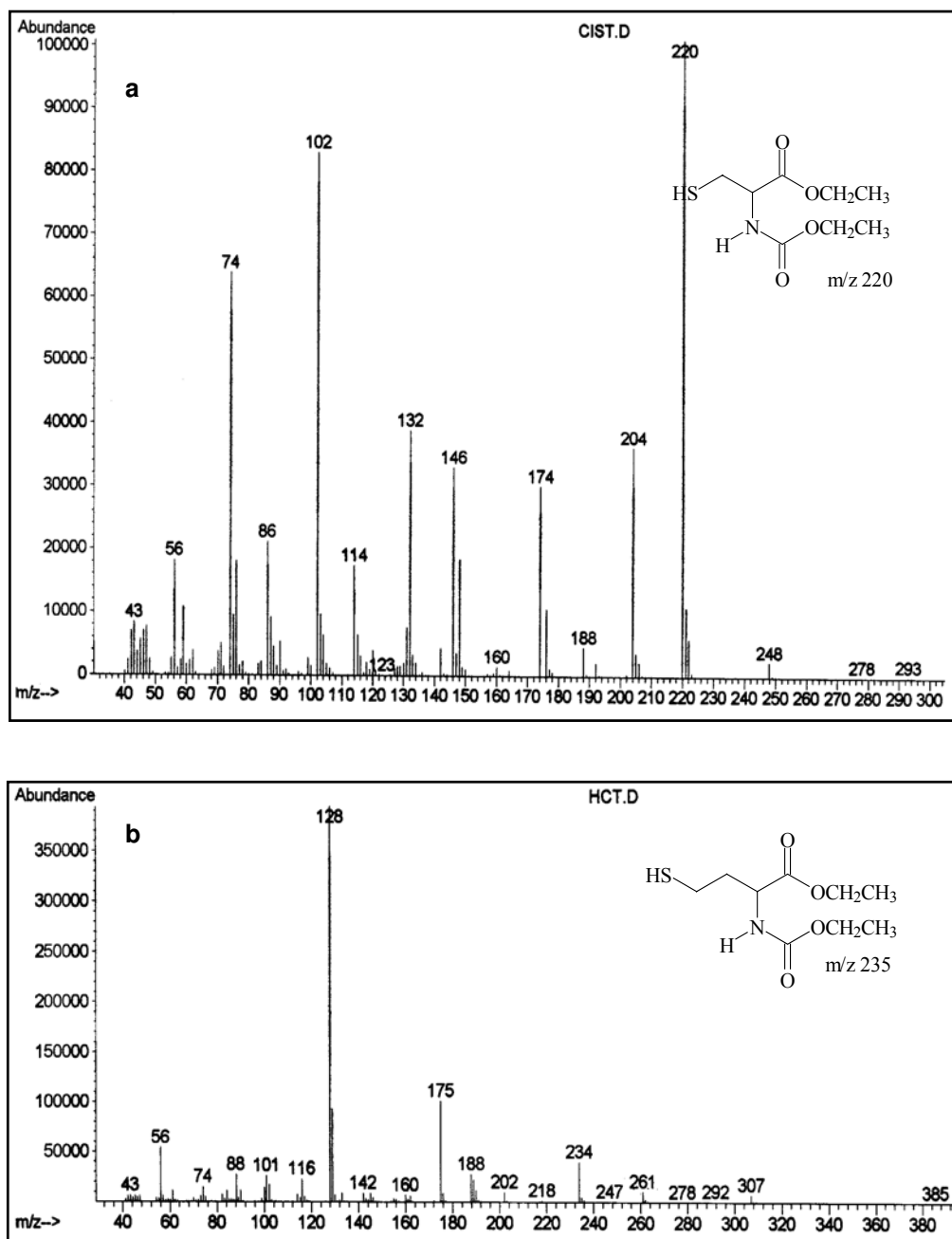
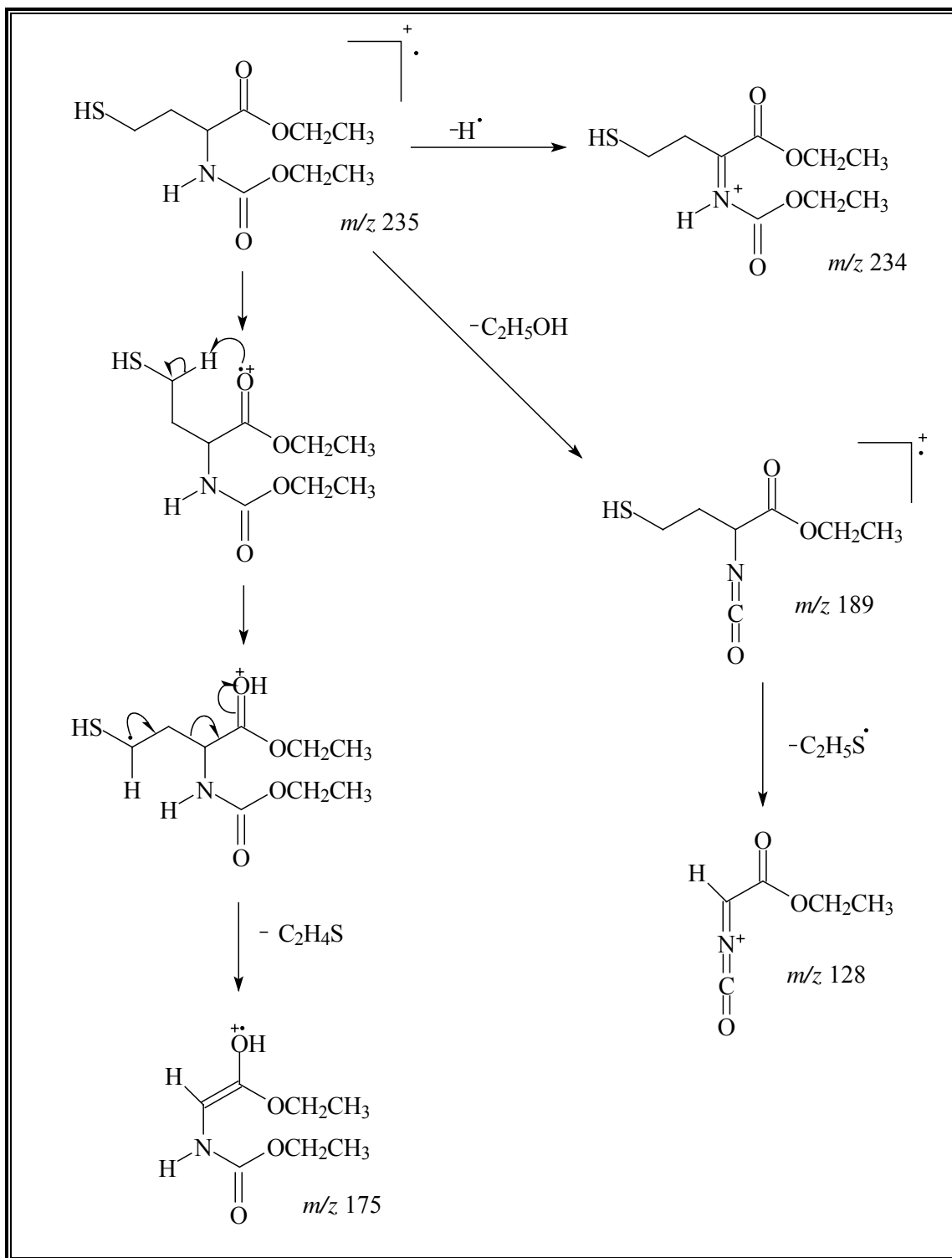


Figura 10: Espectro de massas obtidos em GC-MS para; **a** - cisteína derivatizada, **b** - homocisteína derivatizada

Após vários testes a escolha do íon para a realização do monitoramento da análise quantitativa da homocisteína foi o de m/z 234, pois apesar do pico de m/z 175 ser mais intenso, o mesmo está presente em uma região onde os fragmentos apresentam menor seletividade podendo também haver interferência de cisteína que apresenta também este fragmento. A escolha do íon de m/z 175 poderia levar a um resultado não confiável pela sobreposição dos sinais destes dois compostos. Outro íon de m/z 188 também é comum nos dois espectros. Portanto, o íon de m/z 234 se mostrou o mais apropriado para quantificação da homocisteína, ou seja massa relativamente alta, que minimiza a probabilidade de interferentes, com intensidade razoável.

O Esquema 1 mostra o mecanismo de fragmentação dos principais íons propostos para a homocisteína derivatizada.



Esquema 1: Mecanismo proposto para a fragmentação da homocisteína derivatizada.

5.3. LINEARIDADE DO SISTEMA

Após a escolha do método de derivatização e da escolha do íon característico para a análise da homocisteína, foi iniciada a etapa de otimização das condições de análise. O primeiro teste realizado foi para se verificar a linearidade do método proposto. Para a realização deste teste uma curva analítica foi construída preparando-se homocisteína padrão em água destilada. Esta solução continha todos os reagentes utilizados na derivatização, bem como os reagentes utilizados no preparo das amostras de sangue que posteriormente seriam analisadas.

Após a calibração do equipamento operando em uma faixa de maior sensibilidade, que corresponde a uma massa alta, realizamos a análise através do modo SIM (monitoramento de íons selecionado), selecionando-se um íon específico para a análise, o íon de m/z 234, e um íon de controle o de m/z 227. Este íon de m/z 227, que não se observa no espectro de massas da homocisteína derivatizada é utilizado para verificar alguma alteração do ruído que possa ocorrer no sistema durante o decorrer da análise. O modo de monitoramento SIM foi escolhido por apresentar maior sensibilidade pois a análise é realizada com apenas em um único sinal analítico.

A Figura 11 mostra a aquisição dos sinais e a curva analítica obtida para o método. A Figura 11a representa a aquisição dos sinais no modo de monitoramento SIM para o íon de m/z 234 em diferentes concentrações (10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 μM) da homocisteína derivatizada. O íon de controle m/z 227 também foi monitorado, mas não está representado no espectro. A Figura 11b representa a curva analítica obtida, traçando-se os dados obtidos no monitoramento das várias diluições preparadas. Pelo coeficiente de correlação obtido ($R=0,998$) observado para esta faixa de concentração, podemos observar que o sistema de escolha para a análise mostrou um resultado bastante linear levando-se em consideração a complexidade da matriz.

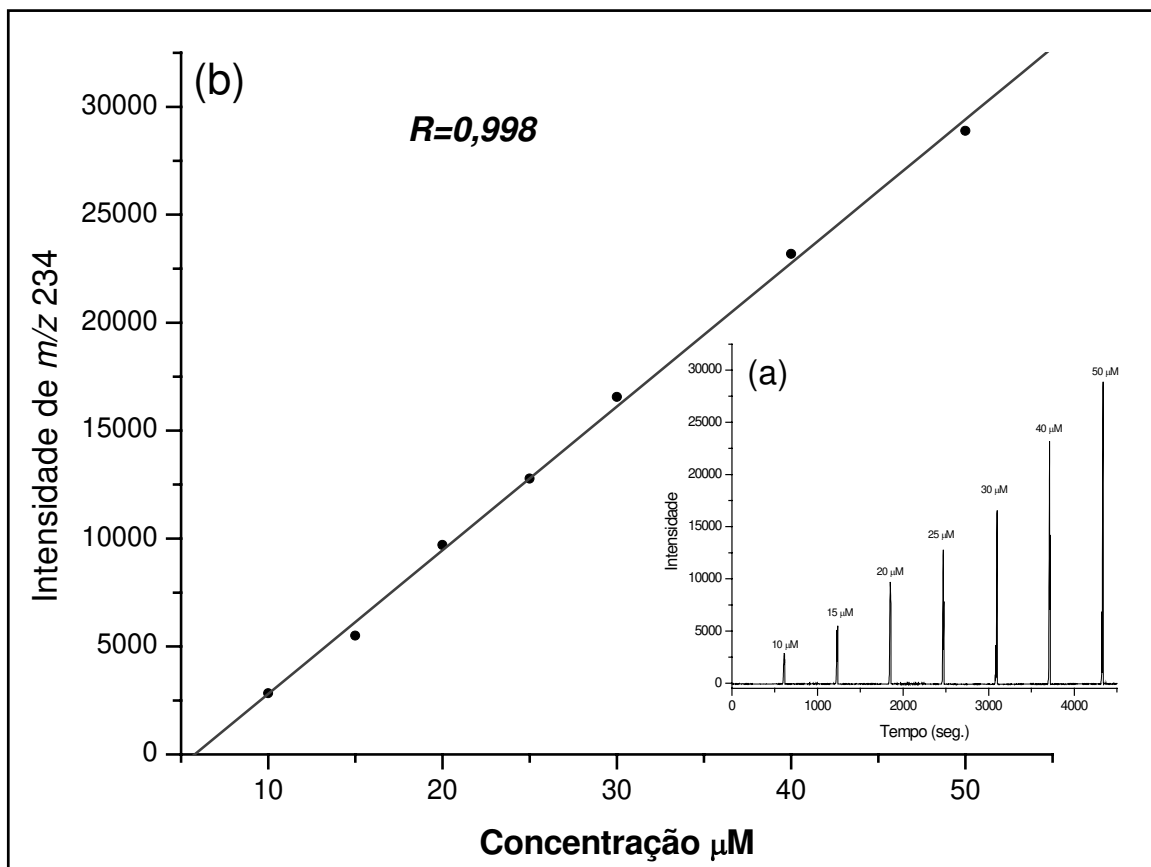


Figura 11: (a) intensidades absolutas dos sinais em modo SIM (m/z 234) obtidas com concentrações de 10, 15, 20, 25, 30, 40 e 50 μM de homocisteína derivatizada; (b) curva analítica obtida através dos valores das intensidades absolutas pela concentração de homocisteína.

5.4. TESTE DE RECUPERAÇÃO

Para confirmar a eficiência do método desenvolvido e proposto para a análise de homocisteína foi realizado o teste de recuperação. Neste teste foram dosadas uma concentração de homocisteína dentro de uma faixa normal presente em amostra de sangue (aproximadamente 10.5 $\mu\text{mol/L}$). Em seguida, foi adicionado uma solução padrão de homocisteína em todas as amostras para verificar-se a recuperação do ensaio em termos de concentração molar de homocisteína. Através dos resultados obtidos (Tabela 1) pode-se

observar que a determinação de homocisteína em plasma humano mostrou a viabilidade deste método (DIMP/T&R-MIMS) em análises de amostras presentes em matrizes complexas. Os resultados obtidos nestas diversas concentrações mostraram uma recuperação de aproximadamente 97,4%, como pode ser observado na Tabela 1 descrita abaixo.

Tabela 1: Porcentagens de recuperação obtidas para as soluções de homocisteína.

<i>Nº Amostra</i>	<i>Concentração</i> <i>µmol/L</i>	<i>Encontrado</i>	<i>% recuperação</i>
1	20.5	22.5	109.7
2	30.5	30.6	100.3
3	40.5	37.9	93.6
4	20.7	19.0	91.8
5	28.7	26.3	91.6
Média = 97,4%			

Como podemos observar as porcentagens obtidas no teste de recuperação estão dentro dos valores aceitos para uma análise bioquímica.

5.5. REPRODUTIBILIDADE

Para a realização de testes de reprodutibilidade, foram utilizadas amostras reais de plasma humano, onde foram adicionadas uma solução padrão de homocisteína de concentração conhecida (20 µM). As intensidades absolutas dos sinais foram obtidas para este teste, com o equipamento operando em modo SIM de acordo com a técnica desenvolvida. Os testes foram realizados através de uma série de cinco repetições. Na aquisição dos sinais as diferenças entre as intensidades relativas foram muito pequenas, como pode ser observado na Figura 13, obtendo-se um erro relativo de aproximadamente 2,5%, não alterando portando as concentrações de homocisteína das amostras de maneira significativa.

Na Figura 13 podemos observar os sinais obtidos no teste de reprodutibilidade, realizado com amostra de plasma humano adicionada com solução padrão de homocisteína.

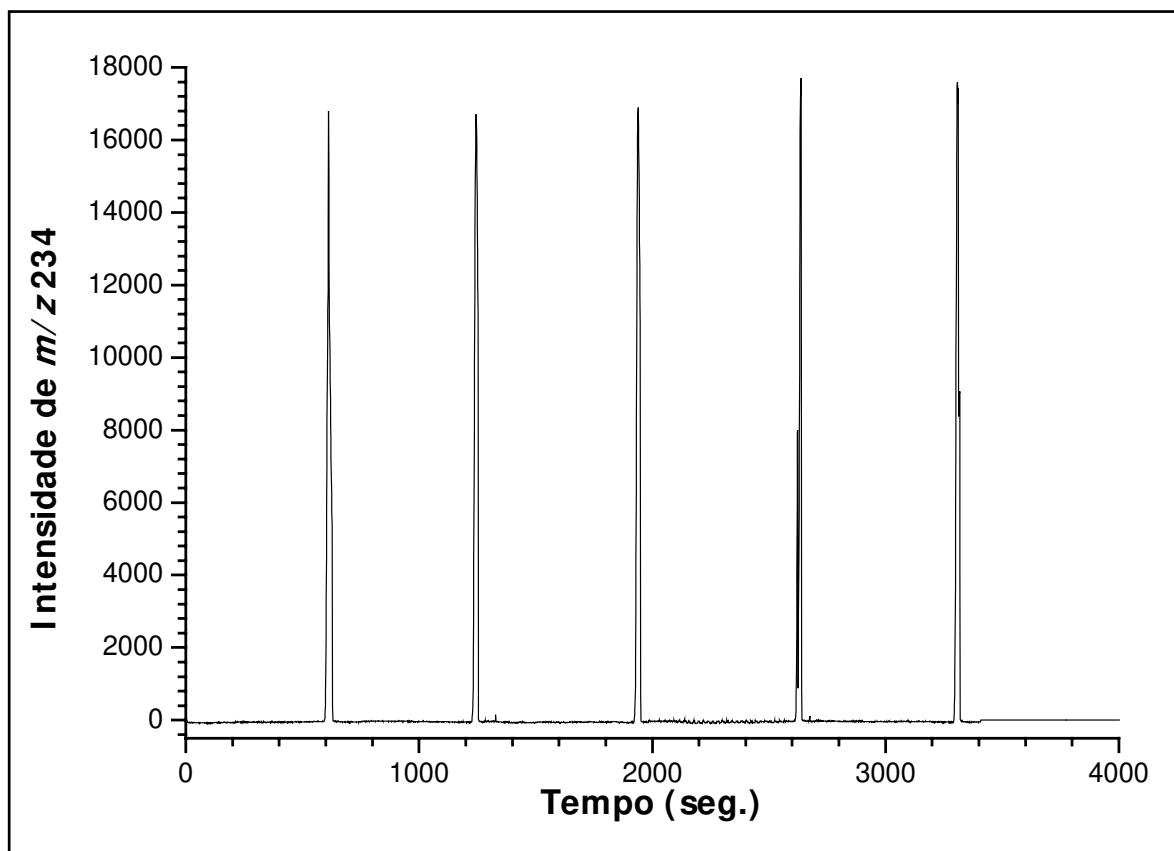


Figura 13: Sinais obtidos em modo SIM por EI a 70ev do teste de reprodutibilidade monitorando o íon de m/z 234, realizado com amostras de plasma humano adicionadas com homocisteína derivatizada na concentração de 20 μ M.

5.6. CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DA ANÁLISE DA HOMOCISTEÍNA PELO MÉTODO DIMP/T&R-MIMS PROPOSTO E HPLC.

No intuito de se comparar os resultados obtidos com o método DIMP/T&R-MIMS para a quantificação de homocisteína, empregou-se como método de referência, a análise por HPLC com fase reversa e detector de fluorescência, obtendo-se a concentração de homocisteína em amostras de plasma humano. Analisando um conjunto de 18 amostras de plasma humano pelos 2 métodos (DIMP/T&R-MIMS - HPLC) podemos comparar melhor o valor de concentração molar de homocisteína obtidas pelas duas técnicas. Os resultados obtidos pelas duas técnicas, estão mostrados na Tabela 2, onde podemos observar os valores das concentrações entre o método padrão (HPLC) e o método proposto (DIMP/T&R-MIMS).

Tabela 2: Concentrações de homocisteína plasmática medidas por **HPLC** com fase reversa e detector de fluorescência e **DIMP/T&R-MIMS** utilizando EI a 70ev, com suas respectivas concentrações em $\mu\text{mol/L}$, nas duas diferentes técnicas.

Amostra	HPLC $\mu\text{mol/L}$	DIMP/T&R-MIMS $\mu\text{mol/L}$
01	9,5	10,5
02	11,2	11,0
03	12,5	11,6
04	13,6	12,5
05	10,9	12,7
06	11,3	12,5
07	13,2	11,8
08	15,0	13,4
09	11,6	10,8
10	9,7	11,4
11	12,7	11,7
12	13,0	14,4
13	11,6	10,7
14	10,5	11,3
15	10,2	9,5
16	11,6	9,5
17	10,8	9,1
18	12,6	13,7

Para análise estatística dos dados obtidos através das duas técnicas foi construído um Box Plot para cada técnica (Figura 14), que demonstra que as duas técnicas possuem a mesma variabilidade, e com isso a capacidade desta nova técnica (DIMP/T&R-MIMS) analisar amostras reais de plasma humano.

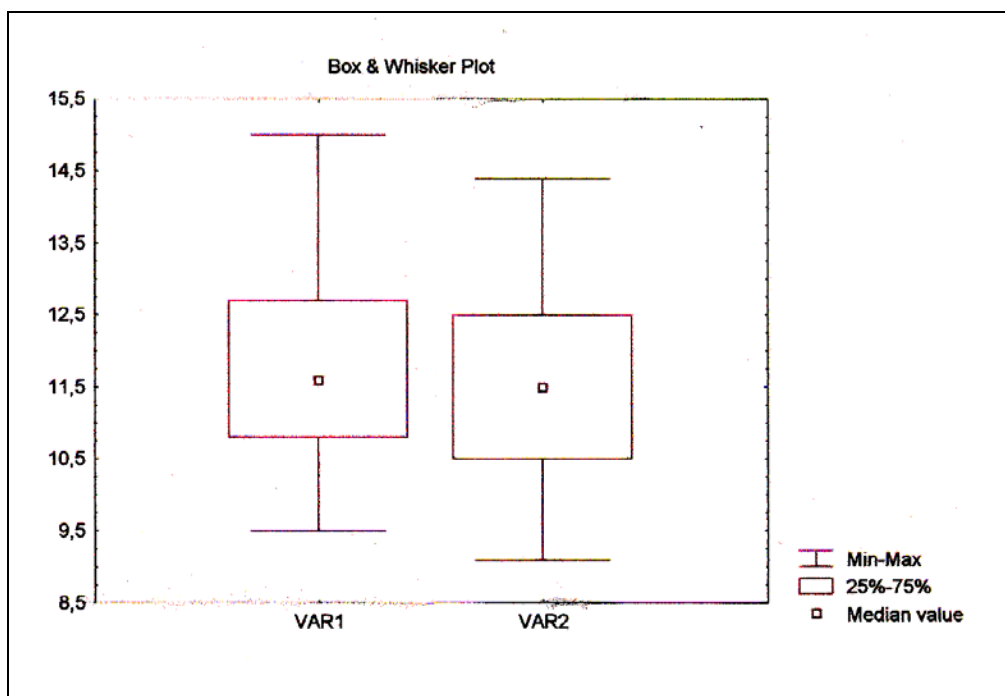


Figura 14: Box Plot das duas técnicas onde VAR 1 é a variabilidade obtida da técnica de HPLC E VAR 2 é a variabilidade da técnica DIMP/T&R-MIMS.

Após a construção do Box Plot para análise da variabilidade das duas técnicas, foi realizado outro teste estatístico, denominado “*Correlação de Pearson*” que foi dada de acordo com a equação $VAR2 = 4,3209 + 0,61477 * VAR1$, onde $VAR2$ corresponde ao valor da técnica DIMP/T&R-MIMS e $VAR1$ corresponde ao valor obtido da técnica de HPLC. Este teste possui uma faixa de variação entre +1 e -1 (Figura 15).

O teste estatístico utilizando a “*Correlação de Pearson*” obteve um $r = 0.59886$ ou 59,88%, demonstrando que a concordância acompanha positivamente os dados obtidos entre as duas técnicas.

Após estes testes pode se concluir que os resultados obtidos com a técnica DIMP/T&R-MIMS mostraram uma boa concordância e variabilidade em relação os obtidos pela técnica de HPLC, o que vem corroborar para que esta nova técnica possa ser aplicada para a análise de homocisteína em plasma humano.

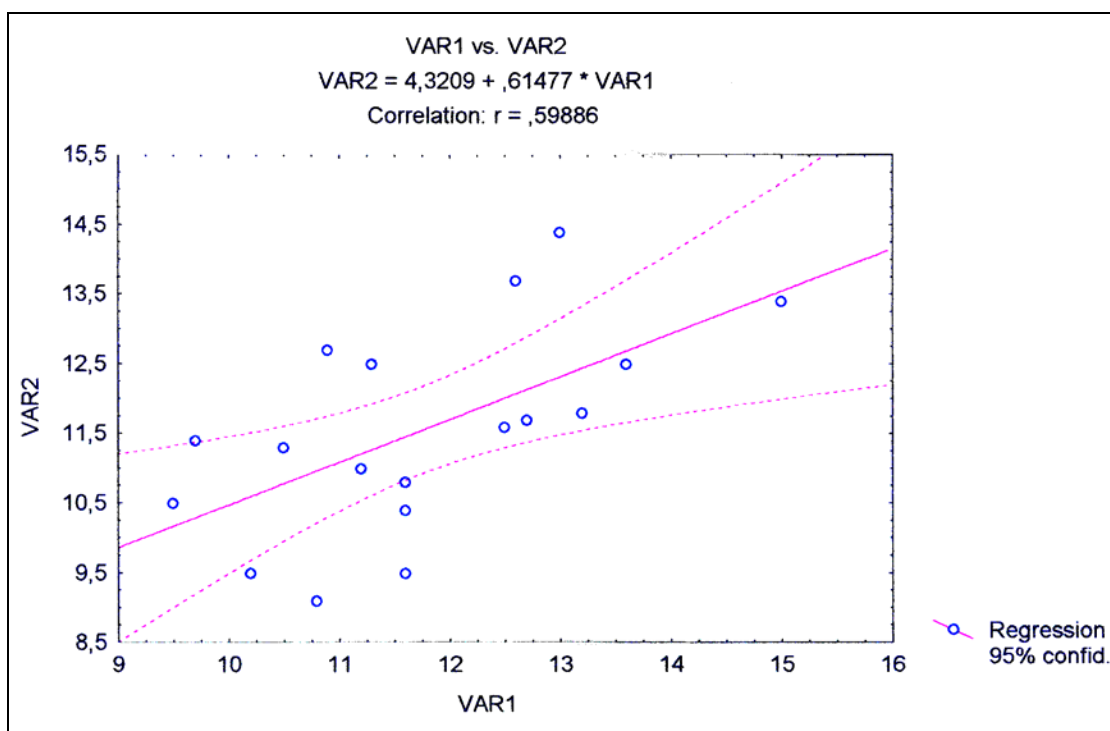
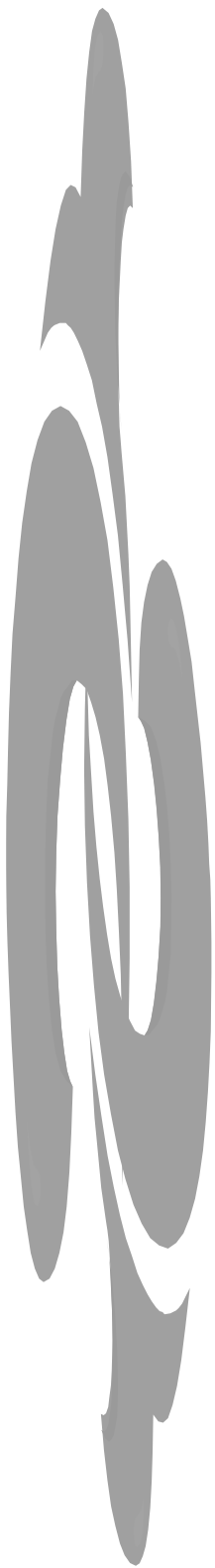


Figura 15: Gráfico da correlação entre as duas técnicas, onde se obteve um $r = 0.598897$.

⁷⁵ P. Husek, Rapid derivatization and gas chromatography determination of amino acids. J. Chromat, (1991), 552, 289-299.



6. CONCLUSÕES

O desenvolvimento deste projeto, realizado dentro do cronograma proposto, nos permite obter várias conclusões ligadas ao método DIMP/T&R-MIMS e a análise de homocisteína nas amostras plasmáticas, além do estudo da reprodutibilidade e estabilidade destas amostras. Os resultados obtidos após a realização dos procedimentos de preparação e derivatização realizados com a homocisteína foram bastante satisfatórios. A técnica além de ser utilizada na análise deste aminoácido em sangue, pode ser também expandida para a análise em urina, uma vez que a matriz (urina) é menos complexa, bem como a análise de outros tipos de compostos nesta mesma matriz.

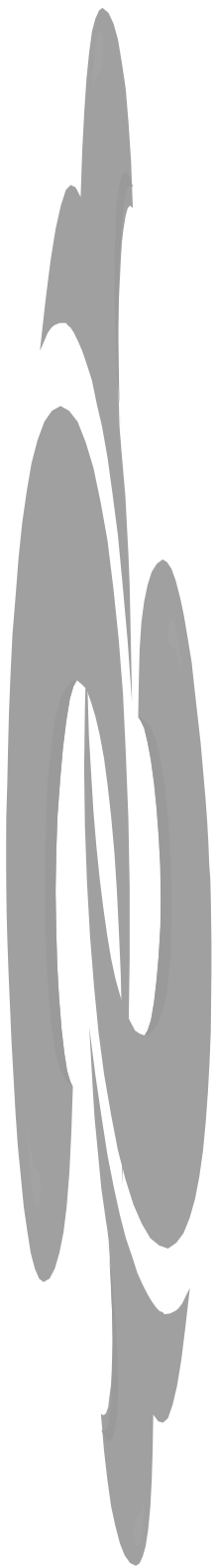
Para a execução do projeto houve algumas dificuldades encontradas, que foram contornadas e solucionadas. Uma das dificuldades encontradas foi a tentativa de análise de homocisteína com amostras sem prévia derivatização onde o espectro de massas obtido não demonstrou o composto desejado. Após a derivatização das amostras com cloroformiato de etila o método proposto ficou bastante viável demonstrando simplicidade e rapidez nas análises (não mais que 50 minutos).

Existe ainda a possibilidade de automação do sistema o que torna a técnica ainda mais rápida eficiente. O limite de detecção obtido para esta técnica corresponde a uma faixa bastante baixa ($2\mu\text{M}$) comparada com as técnicas já existentes.

Os procedimentos envolvidos são simples, podendo ser utilizados com vantagens principalmente em situações em que há necessidade de se quantificar uma número maior de amostras, em um curto período de tempo. Outra vantagem é a utilização de pequenos volumes de amostra. Existe a vantagem de outros métodos utilizados, poderem sofrer interferência de outros compostos que possam ser detectados, tal como a elevada taxa de proteínas que pode causar turbidez na solução limitando seu emprego.

A relação custo benefício é importante na implantação de qualquer metodologia analítica. A simplicidade de operação demonstra uma vantagem econômica considerável, uma vez que após obtido o equipamento e a membrana podemos realizar esta análise com elevada pureza e baixo custo, requisitos quase sempre desejáveis em uma análise. No nosso caso, após a padronização da metodologia empregada podemos realizar esta análise rotineiramente uma vez que a técnica demonstrou bastante simplicidade e rapidez na sua

realização. Podemos realizar todo o processo que compreende desde a preparação da amostra bem como sua quantificação em um período de até 50 minutos, atingindo plenamente nosso objetivo inicial que seria, implementarmos e validarmos uma nova metodologia para dosagem de homocisteína sérica.



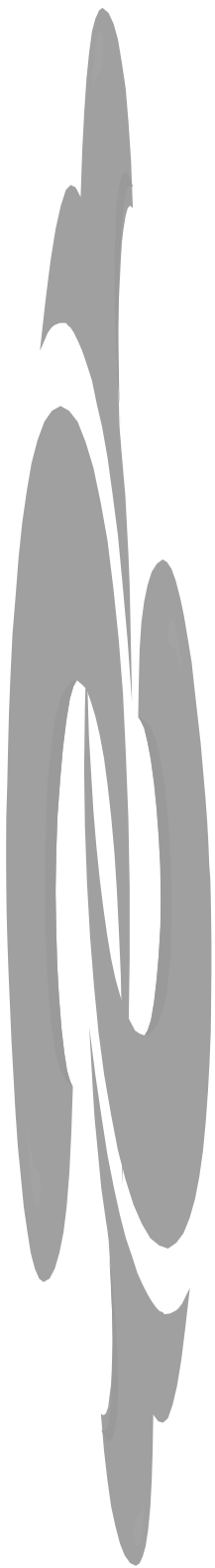
7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como proposição de trabalhos futuros sugerimos a dosagem de cisteína bem como da glutathiona sendo esta ultima um indicador biológico de estresse oxidativo.

Testes preliminares para a dosagem de cisteína já foram realizados e são perfeitamente factíveis de serem realizados em amostras de pacientes que apresentam doenças cardiovasculares. Em novos estudos estão sendo correlacionadas as concentrações de homocisteína e cisteína em pacientes com doenças cardiovasculares, devido as duas estruturas serem muito parecidas, e seus mecanismos de ação não serem bem conhecidos.

This research work describes a new method for the identification and quantitative determination of homocysteine in plasma, an intermediate of the cysteine synthesis, which is generated from methionine in the organism. This new method uses the Mass Spectrometry by Introduction via Membrane (MIMS). A membrane probe DIMP (Direct Introduction Membrane Probe) and the T&R-MIMS method (Trap and Release-Membrane Introduction Mass Spectrometry) were employed, which operates by sampling the target compounds through a given period of time by adsorption in a silicone membrane, followed by a fast desorption produced on heating the membrane. Homocysteine analysis was performed by its derivatization through an esterification reaction with ethyl chloroformate in a mixture of pyridine, ethanol and water as the solvent.

The experiments were performed in a Monoquadrupolar Mass Spectrometer, under a SIM (Selected Ions Monitoring) mode of operation. The m/z 234 ion, which corresponds to the homocysteine $[M-H]^+$ fragment, was monitored. Linearity tests led to a correlation coefficient of 0.998. Five runs of a single experiment showed a deviation of 2.5%, indicating the employed method leads to very reproducible results. It was observed a 97.4% of recovering for the homocysteine, which demonstrates that the proposed method can be applied for its quantitative analysis.



9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ P.M. Ueland and H Refsum, Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy., J Lab Clin Med. **(1989)** Nov;114(5):473-501.
- ² H. Refsum, P. M. Ueland, O. Nygard and S. E. Vollset, Homocysteine and cardiovascular disease. Annu Rev Med. **(1998)**;49:31-62.
- ³ N.W.Tietz: "Textbook of Clinical Chemistry, 3 ed". Ed W.B. Saunders Company, Philadelphia, **(1986)**, pg. 552-555 e 1574.
- ⁴ J. S. Stamler and A. Slivka, Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. Nutr Rev. **(1996)** Jan;54 (1 Pt 1):1-30.
- ⁵ D. W. Jacobsen and R. Poddar, Vascular dysfunction at the cellular level. Neth. J. Med, **(1998)**, 52, S1.
- ⁶ H. Wang, M. Yoshizumi, K. Lai, J. Tsai, M. A. Perrella, E. Haber and M. Lee, J Biol Inhibition of growth and p21ras methylation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine. J Biol Chem. **(1997)** Oct 3;272(40):25380-5.
- ⁷ G. De La Haba and G. L. Cantoni, The enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-homocysteine from adenosine and homocysteine. J. Biol. Chem., **(1959)**, 234, 603-608.
- ⁸ V. Zappia, R. Zydek-Chick and F.Schlenk, The specificity of S-adenosylmethionine derivatives in methyl transfer reactions. J Biol Chem. **(1969)** Aug 25;244(16):4499-509.
- ⁹ J. D. House, R. L. Jacobs, L. M. Stead, M. E. Brosnan and J. T. Brosnan, Regulation of homocysteine metabolism. Adv Enzyme Regul. **(1999)**;39:69-91.
- ¹⁰ R. Paxton, P. W. D. Scislowski, E. J. Davis and R. A. Harris, Role of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase in 2-oxobutyrate metabolism. Biochem J. **(1986)** Mar 1;234(2):295-303.
- ¹¹ J. D. Finkelstein, Methionine metabolism in mammalian. J. Nutr. Biochem., **(1990)**, 1, 228-237.

- ¹² J. D. Finkelstein, W. E. Kyle, B. J. Harris, Methionine metabolism in mammals: regulatory effects of S-adenosylhomocysteine. *Arch Biochem Biophys.* **(1974)** Dec;165(2):774-9.
- ¹³ M. R. Malinow; Homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases. *J Intern Med.* **(1994)** Dec;236(6):603-17.
- ¹⁴ S. E. S. Miner, J. Evrovski and D. E. C. Cole, Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. *Clin Biochem.* **(1997)** Apr;30(3):189-201.
- ¹⁵ A. G. Bostom, and L. Lathrop, Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney Int.* **(1997)** Jul;52(1):10-20.
- ¹⁶ D. N. Churchill, Comparative morbidity among hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Kidney Int Suppl.* **(1993)** Feb;40:S16-22.
- ¹⁷ A. G. Bostom, D. Shemin, K. L. Lapane, P. Sutherland, M. R. Nadeau, P. W. F. Wilson, D. Yoburn, L. Bausserman, G. Tofler, P. F. Jacques, J. Selhud and I. H. Rosenberg, Hyperhomocysteinemia, hyperfibrinogenemia, and lipoprotein (a) excess in maintenance dialysis patients: a matched case-control study. *Atherosclerosis.* **(1996)** Aug 23;125(1):91-101.
- ¹⁸ J. Loscalzo, The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest.* **(1996)** Jul 1;98(1):5-7.
- ¹⁹ A. Araki, Y. Sako and H. Ito, Plasma homocysteine concentrations in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: effect of parenteral methylcobalamin treatment. *Atherosclerosis.* **(1993)** Nov;103(2):149-57.
- ²⁰ J. F. Robillon, B. Canivet, J. L. Sadoul, D. Julien, P. Morand, P. Chambon and P. Freychat, Type 1 diabetes mellitus and homocyst(e)ine. *Diabete Metab.* **(1994)** Sep-Oct;20(5):494-496.
- ²¹ V. A. Mckusick, J. G. Hall and F. Char ,: "The clinical and genetic characteristics of homocysteinuria, in Carson NAJ, Raine DN, (eds): *Inherited Disorders of Sulfhur Metabolism*", **(1971)** Churchill Livingstone, London, pg. 179,.

- ²² V. A. McKusick: "Heritable Disorders of Connective Tissue", (1972) 4th ed., C.V. Mosby, St. Louis, pg. 224.
- ²³ S. H. Mudd and H. L. Levy: "Disorders of transsulfuration", in Stanbury J.B, Wyngaarden J.B., Frederickson D.S., (ed): "The Metabolic Basis of Inherited Disease", (1978) 4th ed., McGraw-Hill, New York, pg. 458.
- ²⁴ G. H. Boers, A. G. Smals, F. J. Trijbels, B. Fowler, J. A. Bakkeren, H. C. Schoonderwaldt, W. J. Kleijer, P. W. Kloppenborg. Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease. *N Engl J Med.* (1985) Sep 19;313(12):709-15.
- ²⁵ R. W. Erbe : "Inborn errors of folate metabolism. In Blakey R.L., Whitehead V.M., (eds) *Folates and parents: nutritional Pharmacological and physiological aspects*", Wiley, New York, (1986) 413-465,.
- ²⁶ P. Goyette, P. Frosst, D. S. Rosenblatt and R. Rozen, Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Am J Hum Genet.* (1995) May;56(5):1052-9.
- ²⁷ S. S. Kang, P. W. Wong and M. Norusis, Homocysteinemia due to folate deficiency. *Metabolism.* (1987) May;36(5):458-62.
- ²⁸ S. P. Stabler, P. D. Marcell, E. R Podell, R. H. Allen, D. G. Savage and J. Lindenbaum, Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Invest.* (1988) Feb;81(2):466-74.
- ²⁹ R. C. Chu, C. A. Hall, The total serum homocysteine as an indicator of vitamin B12 and folate status. *Am J Clin Pathol.* (1988) Oct;90(4):446-9.
- ³⁰ J. Zaché, Homocisteína: uma outra vilã. *Revista Saúde,* (1999), 187,76-83
- ³¹ J. C. Tsai, H. Wang, M. A. Perrella, M. Yoshizumi, N. E. S. Sibinga, L. C. Tan, E. Haber, T. H. T. C. Chang, R. Schlegel and M. E. Le Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* (1996) Jan 1;97(1):146-53.

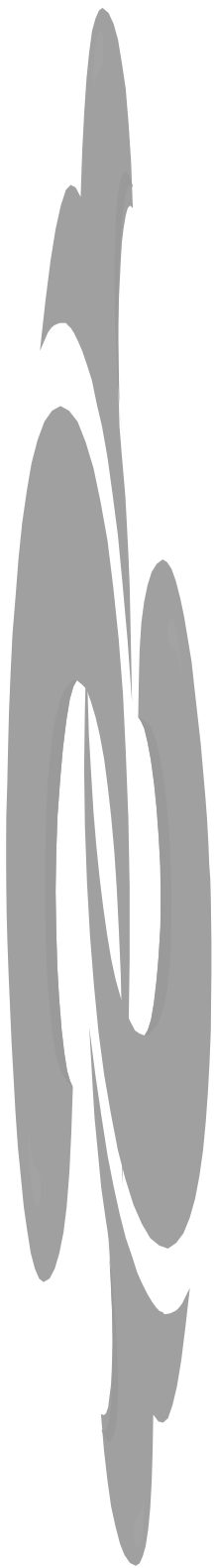
- ³² G. Starkebaum and J. M. Harlan, Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest.* **(1986)** Apr;77(4):1370-6.
- ³³ J. S. Stamler, J. A. Osborne, A. Jaraki, M. Mullins, D. Single and J. Loscalzo, Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest.* **(1993)** Jan;91(1):308-18.
- ³⁴ T. Hayashi, G. Honda and K. Suzuki, An atherogenic stimulus homocysteine inhibits cofactor activity of thrombomodulin and enhances thrombomodulin expression in human umbilical vein endothelial cells. *Blood.* **(1992)** Jun 1;79(11):2930-6.
- ³⁵ S. R. Lentz and J. E. Sadler, Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest.* **(1991)** Dec;88(6):1906-14.
- ³⁶ C. T. Esmon and W. G. Owen, Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **(1981)** Apr;78(4):2249-52.
- ³⁷ P. Chauveau, B. Chadeaux, M. Coude, J. Aupetit, T. Hannedouche and P. Kamoun, Hyperhomocysteinemia, a risk factor for atherosclerosis in chronic uremic patients. *Kidney Int Suppl.* **(1993)** Jun;41:S72-7.
- ³⁸ K. R. Robinson, A. Gupta, V. W. Dennis, K. Arheart, D. Chaudhary, R. Green, P. Vigo, E. L. Mayer, J. Selhub, M. Kutner and D. Jacobse, Hyperhomocysteinemia confers an independent increased risk of atherosclerosis in end-stage renal disease and is closely linked to plasma folate and pyridoxine concentrations. *Circulation.* **(1996)** Dec 1;94(11):2743-8.
- ³⁹ Ueland P. M., Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin Chem.* **(1995)** Mar;41(3):340-2.
- ⁴⁰ A. Araki and Y. Sako, Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr.* **(1987)** Nov 27;422:43-52.

- ⁴¹ M. T. Shipchandler and E. G. Moore, Rapid, fully automated measurement of plasma homocyst(e)ine with the Abbott IMx analyzer. Clin Chem. **(1995)** Jul;41(7):991-4.
- ⁴² R. C. Johnson, R. G. Cooks, T. M. Allen, M. E. Cisper and P. H. Hemberger, Membrane introduction mass spectrometry: Trends and applications. Mass Spectrometry Reviews **(2000)** jan-feb 19: (1) 1-37.
- ⁴³ T. Kotiaho, F. R. Lauritsen, T. K. Choudhury and R. G. Cooks, Membrane Introduction Mass-Spectrometry. Anal. Chem., **(1991)**, sep 15, 63 (18) A875-&.
- ⁴⁴ F. R. Lauritsen and T. Kotiaho, Advances in membrane inlett mass spectrometry (MIMS). Rev. Anal Chem., **(1996)**,15,4, 237-264.
- ⁴⁵ N. Srinivasan, R. C. Johnson, N. Kasthurikrishnan, P. Wong and R. G. Cooks, Membrane inroduction mass spectrometry. Anal. Chem. Acta, **(1997)**, 350, 257-271.
- ⁴⁶ C. S. Creaser, J. W. Stygall and D. J. R. Weston, Developments in membrane inlet mass spectrometry. Anal Commun, **(1998)**, 35: Jun (6) 9H-11H.
- ⁴⁷ M. E. Cisper, A. W. Garret, D. Comeron and P. H. Hemberg, Atmospheric analysis using a microwave plasma ionization source and ion trap mass spectrometry. Anal. Chem., **(1996)**, OCT 19, 178: (1-2), 121-128.
- ⁴⁸ P. S. Wong, H. Cooks, M. E. Cisper and P. H. Hembergr, Online, In-Situ Analysis with Membrane Introduction MS. Environmental Science & Technology, **(1995)**, may 29: (5) A215-A218.
- ⁴⁹ H. Degn, Membrane Inlet Mass-Spectrometry in Pure and Applied Microbiology. Microbiol. Methods, **(1992)**, may 15: (3) 185-197.
- ⁵⁰ S. Bohatka, Process monitoring in fermentors and living plants by membrane inlet mass spectrometry. Rapid Communication Mass Spectrometry, **(1997)**, SP 11: (6) 656-661.
- ⁵¹ C. S. Creaser and J. W. Stygall, Membrane Introduction - Ion-Trap Mass-Spectrometry for the Determination of Volatile Organics in Aqueous Effluents. ANAL PROC **(1995)** JUL 32: (7) 286-286.

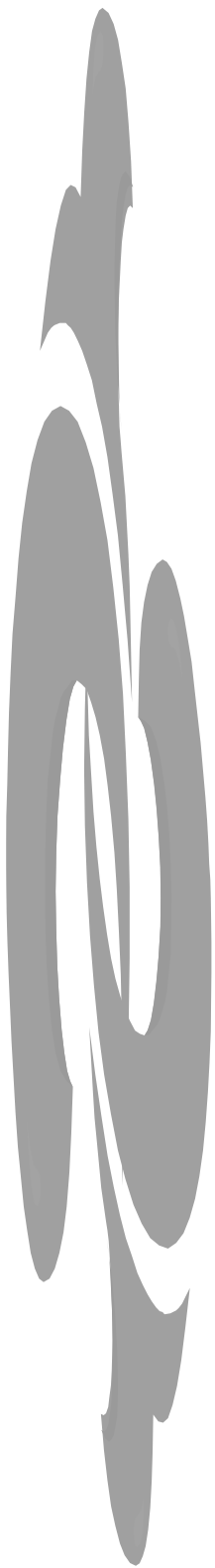
- ⁵² M. A. Mendes, R. S. Pimpim, T. Kotiaho, J. S. Barone and M. N. Eberlin, Construção de uma nova membrana e sua aplicação na análise de compostos orgânicos voláteis em água através da técnica MIMS e MIMS/MS. *Química Nova*, **(1996)**, 19, 480-485.
- ⁵³ J. A. Shoemaker and T. A. Bellar, Determination of Polar Volatile Organic-Compounds in Water by Membrane Permeate and Trap GC-MS. *J. Chromatogr. Sci.*, **(1993)**, 31, 279- 284.
- ⁵⁴ G. Hoch and B. Kok, A Mass Spectrometer Inlet System For Sampling Gases Dissolved in Liquid Phases. *Arch Biochem Biophys* **(1963)**101: (1) 160-&.
- ⁵⁵ S. Woldring, Biomedical Application Mass Spectrometry for Monitoring Pressures: A technical Review. *Journal of Association for the Advancement of Medical Instrumentation*, **(1970)**, 4, 43-56.
- ⁵⁶ A. Wald and K. H. Ransholf, Experience with a Mass Spectrometer System for Blood Gas Analysis in Humans. *Journal of Association for the Advancement of Medical Instrumentation*, **(1971)**, 5, 325-341.
- ⁵⁷ R. G. Cooks and J. S. Brodbelt, An Exceedingly Simple Mass Spectrometer Interface with Application to Reaction Monitoring and Environmental Analysis. *Anal. Chem.*, **(1985)**, 57, 1153.
- ⁵⁸ M. E. Bier and R. G. Cooks, Membrane Interface for Selective Introduction of Volatile Compounds Directly into the Ionization of a Mass Spectrometer. *Anal. Chem.*, **(1987)**, 59, 597-601.
- ⁵⁹ M. E. Bier, T. Kotiaho and R. G. Cooks, Direct Insertion Membrane Probe for Selective Introduction Of organic Compounds into Mass Spectrometer. *Analytica Chimica Acta*, **(1990)**, 231, 175-190.
- ⁶⁰ F. R. Lauritsen, L. T. Nielsen, H. Deng, D. Lloyd and S. Bohátka, Identification of Dissolved Volatile in Microbial Cultures by Membrane Inlet Tandem Mass Spectrometry. *Biological Mass Spectrometry*, **(1991)**, 20, 253-258.
- ⁶¹ F. R. Lauritsen, T. Kotiaho and D. Loyd, Rapid and Direct Monitoring of Volatile fermentation Products in the Fungus *Bjerkandera adusta* by Membrane Inlet Mass Spectrometry. *Biological Mass Spectrometry*, **(1993)**, 22, 585-589.

- ⁶² J. S. Bauer and R. G. Cooks, Performance of an Ion Trap Mass Spectrometer Modified to Accept Insertion membrane Probe in a Analysis of Low Level Pollutants in Water. *Talanta*, **(1993)**, 40, 1031-1039.
- ⁶³ K. F. Hansen, F. R. Lauritsen, and H. Degn, An on line System for Fermentation Using Membrane Inlet Mass Spectrometry (MIMS): Application to Phenoxyacetic Acid Monitoring in Penicillin Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, **(1994)**, 44, 347-353.
- ⁶⁴ M. E. Cisper, C. G. Gill, L. E. Townsend and P. H. Hemberger, On-Line Detection of Volatile Organic Compounds in Air at Parts-per-Trillion Levels by Membrane Introduction Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **(1995)**, 67, 1413-1417.
- ⁶⁵ M. Lenth and F. R. Lauritsen, A fully Integrated Trap-Membrane Inlet Mass Spectrometry System for the Measurement of Semi-Volatiles Organic Compounds in Aqueous solution”, *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, **(1995)** 9 (7), 591.
- ⁶⁶ A. J. Manden and M. J. Hayward, Sheet Materials for Use as Membrane in Membrane Introduction Mass Spectrometry. *Anal Chem*, **(1996)**, 68, 1805-1811.
- ⁶⁷ J. Jelinck, Matrix Effects in Membrane Introduction Mass Spectrometry, I- Effect of Poly (Ethylene Glycol) on Permeation Rate of 1 Octanol through Silicone rubber Membrane. *Chem. Papers*, **(1996)**, 50 (3), 131-137.
- ⁶⁸ S. M. Gordon, P. J. Callahan, D. V. Kenny, and J. D Pleil, Direct Sampling and Analysis of Volatile Organic Compounds in Air by Membrane Introduction and Glow Discharge Ion Trap Mass Spectrometry with Filtered Noise Fields. *Rapid Communications in Mass spectrometry*, **(1996)**, 10, 1038-1046.
- ⁶⁹ M. A. Mendes, R. S. Pimpim, T. Kotiaho, J. S. Barone e M. N. Eberlim, Construção de uma Sonda de Membrana e sua Aplicação na Análise de Compostos Orgânicos Voláteis em Água Através da Técnica MIMS e MIMS/MS”, *Química Nova*, **(1996)**, 19(5), 480-485.

- ⁷⁰ M. A. Mendes, R. S. Pimpim, T. Kotiaho and M. N. Eberlin, A CryoTrap Membrane Introduction Mass Spectrometry System for Analysis of Volatile Organic Compounds in Water at the Low Part-per-Trillion Level. *Anal. Chem.*, **(1996)**, 68, 3502-3506.
- ⁷¹ F. R. Lauritsen and R. A. Ketola, Quantitative Determination of Semivolatile organic Compounds in Solution Using Trap-and-Release Membrane Inlet mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **(1997)**, 69, 4917-4922.
- ⁷² R. F. P. Nogueira, R. M. Alberici, M. A. Mendes, W. F. Jardim and M. N. Eberlin, Photocatalytic Degradation of Phenol and Trichloroethylene: On-Line and Real-Time Monitoring via Membrane Introduction Mass Spectrometry. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **(1999)**, 38, 1754-1758.
- ⁷³ M. A. Mendes and M. N. Eberlin, Trace level analysis of vocs and semi-vocs in aqueous solution usin a diretcinsertion membrane probe and trap and release membrane introduction mass spectrometry. *Analyst*, **(2000)**, 125, 21-24.
- ⁷⁴ M. A. Mendes, R. Sparrapan and M. N. Eberlin, Headspace Membrane Introduction Mass Spectrometry for Trace Level Analysis of VOCs in Soil and Other Solid Matrixes. *Anal. Chem.*, **(2000)**, 72, 2166-2170.
- ⁷⁵ P. Husek, Rapid derivatization and gas chromatography determination of amino acids. *J. Chromat*, **(1991)**, 552, 289-299.



10. ANEXOS



10. ANEXOS



Anexo 1: Vista Total do equipamento utilizado no projeto (Espectrômetro de Massas Monoquadrupolar Extrel (Pittsburg, PA) adaptado com um quadrupolo de $\frac{3}{4}$ " de alta transmissão, utilizando EI com energia de ionização de 70 eV e o módulo computacional).

Amino acid quantitation in aqueous matrices *via* trap and release membrane introduction mass spectrometry: homocysteine in human plasma

Renato Haddad,^a Maria Anita Mendes,^b Nelci F. Höehr^{a*} and Marcos N. Eberlin^{a,b}

^a Medical Science Faculty, State University of Campinas - UNICAMP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

^b Institute of Chemistry, State University of Campinas - UNICAMP 13083-970, Campinas, SP, Brazil. E-mail: eberlin@iqm.unicamp.br

Received 8th May 2001, Accepted 18th June 2001

First published as an Advance Article on the web 16th July 2001

Trap and release membrane introduction mass spectrometry (T&R-MIMS) using a removable direct insertion membrane probe (DIMP) is employed to determine the total homocysteine concentration (tHcy) directly from human plasma after derivatization with ethyl chloroformate. The method uses no chromatographic separation, is linear, reproducible, and displays limit of quantitation (2 μ M) sufficiently below the threshold concentration of tHcy in plasma. It also combines chemical, membrane, and mass spectrometric discrimination, and can be used to determine selected amino acids in human plasma simultaneously. After derivatization with ethyl chloroformate, many amino acids in aqueous solution are observed to be efficiently detected; hence T&R-MIMS is promising as a simple and sensitive technique for simultaneous quantitation of selected amino acids in plasma and urine, and in other aqueous matrices.

An efficient and generally applicable approach for trace SVOC analysis by MIMS is offered by the trap and release MIMS (T&R-MIMS) technique.¹³ In T&R-MIMS, SVOCs are properly preconcentrated inside a capillary silicone membrane, and then thermally desorbed to the gas phase using the heat radiation from the ionization filament. T&R-MIMS has greatly expanded the applicability of MIMS by including detection of larger and more polar molecules so that now even compounds such as steroid hormones can be conveniently quantitated.¹⁴

We recently developed a simpler T&R-MIMS system using a removable, more versatile and interchangeable direct introduction membrane probe (DIMP).¹⁵ Because of faster and more uniform membrane heating provided by our T&R-MIMS system, SVOC sensitivity improves and memory effects are minimized. We now report that T&R-MIMS can be used for simple and sensitive quantitation of selected amino acids in aqueous solutions, and tHcy quantitation in human plasma is described.

Introduction

Hyperhomocysteinemia—increased total homocysteine concentration (tHcy) in plasma or serum—is a valuable marker of common diseases.¹ Numerous clinical studies and advances in Hcy quantitation have established hyperhomocysteinemia as a strong and independent risk factor for cardiovascular, cerebrovascular, and peripheral vascular diseases. It is also a sensitive marker for deficiencies of folate and vitamins B₁₂ and B₆, and is used to diagnose the inborn error in metabolism termed homocystinuria.

Several methods are applied to quantitate tHcy in plasma and other biological fluids.² Hcy is present in plasma mainly coupled *via* disulfide-bonds to another Hcy, to cysteine, or to proteins.³ Hence to determine tHcy, chemical reduction of the disulfide bonds is commonly performed. Free Hcy is then most commonly determined *via* reverse-phase high performance liquid-chromatography (HPLC) with either fluorescence or UV detection after appropriate derivatization.⁴ Capillary electrophoresis⁵ and gas chromatography-mass spectrometry⁶ (GC-MS) methods have also been proposed. A rapid enzyme conversion immunoassay for selective tHcy quantitation is also available.⁷

Membrane introduction mass spectrometry (MIMS)⁸ first appeared for the direct quantitation of VOCs in air and aqueous matrices, showing outstanding speed and trace level detection limits. However, for semi-volatile (SVOCs) and more polar organic compounds, MIMS was shown to be unsatisfactory since detection limits were often too high to be useful. Trapping strategies,⁹ ultrathin composite membranes,¹⁰ indirect monitoring of a related VOC analyte,¹¹ and hyphenated MIMS techniques¹² have therefore been implemented to improve MIMS detection limits of SVOCs and to lower concurrently the detection limits of VOCs.

Experimental

Mass spectrometry was performed using 70 eV electron ionization (EI) and an Extrel (Pittsburgh, PA) mass spectrometer fitted with a high transmission quadrupole. The standard EI ion source was used with just a minor modification: the id of one of the two gas entrance lines was enlarged to 1.27 cm (Fig. 1). The analyte solutions at room temperature (23 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C) were pumped through the system by an eight-roll peristaltic pump at a rate of 2 mL min⁻¹. The capillary membrane was provided by Dow Corning Co. (Silastic Medical-grade tubing) with a wall thickness of 0.056 cm, id of 0.063 cm, and od of 0.12 cm.

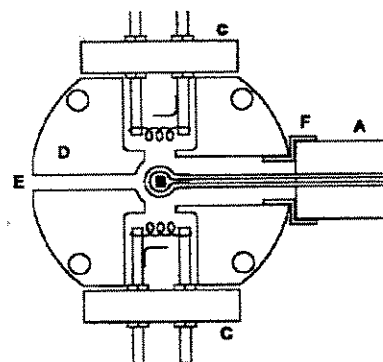


Fig. 1 Schematic of the T&R-MIMS system: (A) DIMP probe; (B) capillary membrane loop; (C) filaments; (D) ion source block; (E) CI gas entrance; and (F) ceramic probe adapter. Adapted from ref. 15.

T&R-MIMS

Fig. 1 displays a schematic of the system: the removable DIMP probe (A) with a 10 mm long capillary membrane loop (B) is shown *in situ* in the ion source (D). The capillary membrane (B) is fixed into the DIMP probe (A) and a ceramic probe adapter (F) ensures proper sealing. By fine adjusting of the position of the DIMP probe, the membrane loop (B) can be placed exactly between the two filaments (C) so as to ensure more efficient analyte ionization but particularly faster and more uniform heating of the capillary membrane surface.

Sample preparation

Standard aqueous solutions of Hcy (D,L-homocysteine from Sigma Corp.) were prepared in de-ionized water by serial dilution of a 500 μM aqueous solution. For the plasma samples, 3 mL of human blood were collected in a Vacutainer EDTA-containing tube, and immediately centrifuged at 1000g for 5 min at 4 °C. To reduce disulfides and decouple them from plasma proteins so as to measure tHcy, 1 mL of the resulting plasma (or 1.5 mL of Hcy aqueous solutions) was treated with 250 μL of dithiothreitol (DTT) and incubated for 30 min at 36 °C. The proteins were then precipitated by adding 1 mL of 5% aqueous solution of trichloroacetic acid (TCA) and 100 μL of saturated EDTA solution under vigorous vortexing followed by centrifugation at 3000g for 15 min.

Derivatization

Alkyl chloroformate amino-acid derivatization¹⁶ (Scheme 1) was employed: 40 μL of a 4:1 ethanol:pyridine solution and 25 μL of ethyl chloroformate (ECF) were added to the supernatant (1.5 mL) from the blood/plasma or standard sample treatment, the resulting mixture was Vortex-mixed for 1 min, its volume adjusted to 2.5 mL with deionized water, and then pumped continuously through the lines of the T&R-MIMS system for quantitation.

Results and discussion

Signal profile

Fig. 2 shows a typical signal profile for the T&R-MIMS analysis of ECF-derivatized Hcy (ECF-Hcy) in plasma using selected ion monitoring (SIM) of the $[\text{M} - \text{H}]^+$ ion of m/z 234.

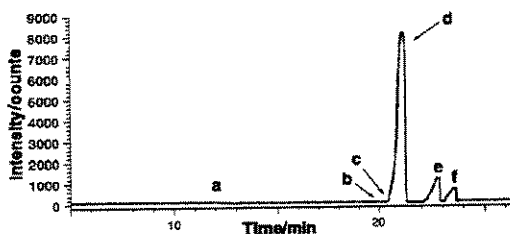
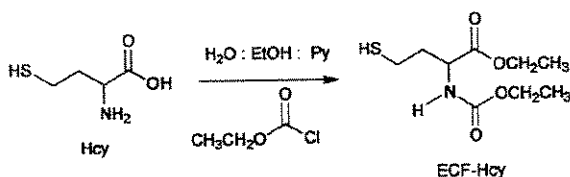


Fig. 2 Signal profile using SIM of m/z 234 for the T&R-MIMS analysis of a 20 μM aqueous Hcy solution after ECF derivatization.

The analyte solution (2.5 mL) is continuously pumped through the system, and during the 20 min of trapping, no signal is detected (a); although ECF-Hcy is efficiently absorbed by the membrane, its desorption to the gas phase is minor. But when the 60 s air plug (b) is introduced (simply by removing the pumping tube from the aqueous sample solution), and when it reaches the membrane (c), temperature is raised rapidly, and the preconcentrated ECF-Hcy is thermally and efficiently released. The signal rises and drops sharply producing a well-defined, relatively narrow, and intense desorption peak. When the air plug ends (d), and because room-temperature water is now flowing through the system, the membrane cools rapidly and signal drops sharply back to the baseline. Then, to clean the membrane from residual analyte, two additional 60 s air plugs at 1 min intervals (e and f) are intercalated into the water flow. The desorption peak in (f) is nearly as abundant as that continuously produced by heating the membrane after water pumping.¹⁵

Acquisition of full mass spectra

The time interval of the T&R-MIMS peak is considerably narrow, but long enough so as to allow the acquisition of several full mass spectra, which is particularly useful for secure analyte identification and mixture analysis. Fig. 3 shows the relevant portion of the mass spectrum collected close to the top of the elution peak during the T&R-MIMS analysis, whereas Fig. 4 displays the 70 eV EI mass spectrum of ECF-Hcy obtained by GC/MS analysis. Whereas the ion of m/z 207 is background from the membrane,¹⁵ the EI-ions of ECF-Hcy ($[\text{M} - \text{H}]^+$ of m/z 234, 189, 188, and 175) are clearly detected in the spectrum. For SIM quantitation of ECF-Hcy, the highest mass fragment ion of m/z 234, $[\text{M} - \text{H}]^+$, was selected to minimize interferences in plasma analysis.

Linearity and reproducibility

Several T&R-MIMS calibration curves were plotted using SIM of m/z 234 to monitor aqueous solutions of ECF-Hcy at concentrations varying from 10 to 70 μM (normal tHcy in

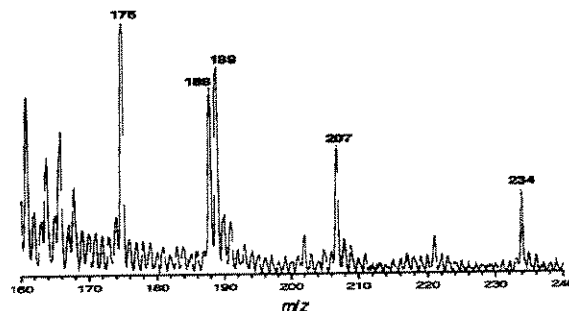


Fig. 3 70 eV EI mass spectrum collected close to the top of the elution peak during the T&R-MIMS analysis of Hcy in water after ECF derivatization.

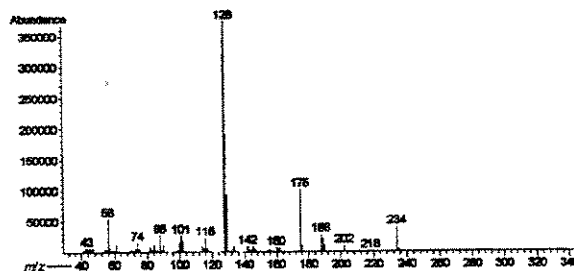


Fig. 4 70 eV EI mass spectrum of Hcy after ECF derivatization.

Table 1 Total homocysteine (tHcy) quantitation in human plasma using both HPLC with fluorescence detection and T&R-MIMS after ECF derivatization

Sample	HPLC/ μ M	T&R-MIMS/ μ M	Deviation (%)
01	9.5	10.5	+11
02	11.2	11.0	-2
03	12.5	11.6	-7
04	13.6	12.5	-8
05	10.9	12.7	+17
06	11.3	12.5	+11
07	13.2	11.8	-11
08	15.0	13.4	-11
09	11.6	10.8	-7
10	9.7	11.4	+18
11	12.7	11.7	-8
12	13.0	14.4	+11
13	11.6	10.7	-8
14	10.5	11.3	+8
15	10.2	9.5	-7
16	11.6	9.5	-18
17	10.8	9.1	-16
18	12.6	13.7	+9

plasma varies from 5 to 15 μ M).¹ The curves demonstrate the good linearity of the technique (even up to 500 μ M), and correlation coefficients typically of 0.998 were obtained. Within this concentration range, the variance of the SIM signal, for four consecutive analyses using the height of the SIM peak, was always below 5%.

Quantitation limit

For standard aqueous solutions of Hcy, SIM of the most intense m/z 128 ion of ECF-Hcy can be performed, and a quantitation limit of 0.2 μ M was easily attained. For tHcy quantitation in human plasma, however, SIM monitoring of the m/z 234 ion was performed so as to minimize interferences, and then the quantitation limit was 2 μ M. This limit is sufficiently below the 5 μ M threshold of tHcy in human plasma.

Recovery

Plasma samples were spiked with known amounts of Hcy, treated as described, and tHcy determined by the T&R-MIMS technique using SIM of m/z 234. High recoveries, typically of 97–98%, were obtained for concentrations ranging from 10 to 100 μ M.

Comparison with HPLC quantitation

A total of 18 plasma samples were analyzed concurrently by T&R-MIMS and HPLC with fluorescence detection.³ Table 1 compares the results, and shows that the agreement is satisfactory, within 2–18%.

Simultaneous quantitation of Hcy and Cys

When plasma is treated with dithiothreitol (DTT), disulfide bonds are reduced and both the sulfur amino acids Hcy and cysteine (Cys) are released. After ECF derivatization, we attempted simultaneous quantitation of these two sulfur amino acids using T&R-MIMS. $[M - H]^+$ ions of Hcy (m/z 234) and Cys (m/z 220) were both clearly detected (nearly 10 times more

abundant for Cys) in the mass spectra, and SIM monitoring was shown to allow for their simultaneous quantitation. The linearity, recovery, reproducibility, and detection limit for tCys quantitation in plasma by T&R-MIMS is currently being evaluated, with similar to better results when compared to tHcy quantitation.

Other amino acids

ECF derivatization of amino acids in aqueous matrices is generally applicable, fast, and gives high yields, and most amino and other organic acids can be efficiently ECF-derivatized for GC analysis.^{16,17} We tested many amino acids,¹⁸ and as for the two sulfur amino acids Hcy and Cys, their ECF-derivatized forms were efficiently detected in water by T&R-MIMS using the DIMP probe.¹⁵

Conclusion

The total concentration of Hcy in plasma can be determined directly by T&R-MIMS after ECF derivatization. The method uses no chromatographic separation, is linear, reproducible, and has a quantitation limit sufficiently below the threshold concentration of Hcy in plasma. Since the method combines chemical, membrane, and mass spectrometric discrimination, and since most amino acids are efficiently detected after ECF derivatization, T&R-MIMS can be used to simultaneously determine selected amino acids in plasma. To gain accuracy, selectivity and to minimize interferences specially during the direct SIM monitoring in human plasma samples, improved procedures are currently being tested such as the use of internal standards, refined clean-up procedures, and desorption chemical ionization.¹⁴ The T&R-MIMS technique is therefore promising as a simple, sensitive and selective method for simultaneous amino-acid quantitation in plasma and urine, and in most aqueous matrices.

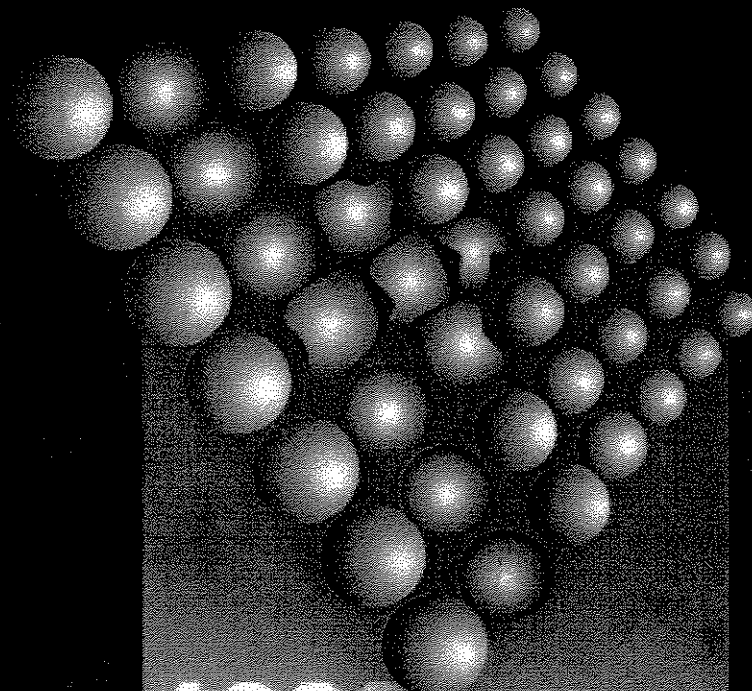
Acknowledgments

This work has been supported by the Research Support Foundation of the State of São Paulo (FAPESP) and the Brazilian National Research Council (CNPq). We thank the Fleury Centro de Medicina Diagnóstica (São Paulo, Brazil) for the tHcy determinations by HPLC.

References

- (a) H. Refsum, P. M. Ueland, O. Nygard and S. E. Vollset, *Annu. Rev. Med.*, 1998, **49**, 31; (b) L. J. Langman and D. E. C. Cole, *Clin. Chem. Acta*, 1999, **286**, 63; (c) D. W. Jacobsen, *Clin. Chem.*, 1998, **44**, 1833; (d) R. van der Griend, D. H. Biesma and J.-D. Banga, *Neth. J. Med.*, 2000, **56**, 119; and references cited therein.
- P. M. Ueland, H. Refsum, S. P. Stabler, M. R. Malinow, A. Andersson and R. H. Allen, *Clin. Chem.*, 1993, **39**, 1764.
- J. Selhub, *Annu. Rev. Nutr.*, 1999, **19**, 217.
- (a) A. Araki and Y. Sako, *J. Chromatogr.*, 1987, **422**, 43; (b) B. Vester and K. Rasmussen, *Eur. J. Clin. Biochem.*, 1991, **29**, 549; (c) L. Campanella, G. Crescentini and P. Avino, *J. Chromatogr. A*, 1999, **833**, 137; (d) E. Bald, E. Kaniowska, G. Chwatko and R. Glowacki, *Talanta*, 2000, **50**, 1233.
- E. Caussé, R. Tierrier, S. Champagne, M. Nertz, P. Valdiguié and R. Salvayre, *J. Chromatogr. A*, 1998, **817**, 181.
- J. O. Sass and W. Endres, *J. Chromatogr. A*, 1997, **776**, 342.
- F. Frantzen, A. L. Faaren, I. Alfheim and A. K. Nordhei, *Clin. Chem.*, 1998, **44**, 311.

- 8 (a) T. Kotiaho, F. R. Lauritsen, T. K. Choudhury and R. G. Cooks, *Anal. Chem.*, 1991, **63**, 875A; (b) F. R. Lauritsen and T. Kotiaho, *Rev. Anal. Chem.*, 1996, **15**, 237; (c) R. C. Johnson, R. G. Cooks, T. M. Allen, M. E. Cisper and P. H. Hemberger, *Mass Spectrom. Rev.*, 2000, **19**, 1.
- 9 G. L. Kok, M. E. Cisper and P. H. Hemberger, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1996, **7**, 1172.
- 10 R. Alberici, R. Sparrapan, M. N. Eberlin, D. Windmüller and R. Augusti, *Anal. Commun.*, 1999, **36**, 221.
- 11 L. A. B. Moraes, M. N. Eberlin, J. R. Cagnon and L. H. Urbano, *Analyst*, 2000, **125**, 1529.
- 12 (a) M. A. Mendes, R. S. Pimpim, T. Kotiaho and M. N. Eberlin, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 3502; (b) R. Kostianen, T. Kotiaho, I. Mattila, T. Mansikka, M. Ojala and R. A. Ketola, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 3028; (c) M. A. Mendes, R. Sparrapan and M. N. Eberlin, *Anal. Chem.*, 2000, **9**, 2166; (d) R. M. Alberici, R. Sparrapan, W. F. Jardim and M. N. Eberlin, *Environ. Sci. Technol.*, 2001, **35**, 2084.
- 13 (a) F. R. Lauritsen and R. A. Ketola, *Anal. Chem.*, 1997, **69**, 4917; (b) A comparable thermal desorption MIMS technique has also been reported, see: G. Matz and F. Lennemann, *J. Chromatogr. A*, 1996, **750**, 141.
- 14 (a) F. R. Lauritsen, M. A. Mendes and T. Aggerholm, *Analyst*, 2000, **125**, 211; (b) F. R. Lauritsen and J. Rose, *Analyst*, 2000, **125**, 1577.
- 15 M. A. Mendes and M. N. Eberlin, *Analyst*, 2000, **125**, 21.
- 16 (a) P. Husek, *J. Chromatogr.*, 1991, **552**, 289; (b) P. Husek, *J. Chromatogr. B*, 1998, **717**, 57.
- 17 P. Husek, *J. Chromatogr. B*, 1995, **669**, 352.
- 18 R. Haddad, A. P. Velasco, M. A. Mendes, N. F. Höehr and M. N. Eberlin, to be submitted.



1999

CONGRESSOS DE PATOLOGIA
E MEDICINA LABORATORIAL
XXXIII BRASILEIRO IV MERCOSUL
XX MUNDIAL III DE GESTÃO LABORATORIAL
&
EXPOSIÇÃO TÉCNICA - CIENTÍFICA
Anhembi - São Paulo, Brasil, 17-21 Setembro

Temas Livres Posters

321

322

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO CINÉTICO PARA ANÁLISE DE HOMOCISTEÍNA

Renato Haddad, Adriana Magna, Mathieu Tabone* e Neici Fennali Hüsch

Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas e Instituto de Química*, Universidade Estadual de Campinas - C.P. 6111, 13083-970- Campinas-SP- Brasil

A incidência de doenças cardiovasculares prematuras em pacientes jovens tais como anemia megaloblástica, hipotireoidismo e tromboembolias está relacionada com o aumento da taxa de homocisteína no sangue ($>100\mu\text{mol/L}$). A homocisteína é um intermediário da biotransformação da metionina onde o aumento da mesma pode ocorrer devido a causas genéticas e adquiridas. O aumento da homocisteína no sangue ocorre em pacientes com erros inatos de metabolismo, que podem ser devidos a baixa produção da cistationa- β -sintase e 5,10-metilecoteetraidrofolato redutase, que são dependentes de folato e da vitamina B_{12} . A análise quantitativa de homocisteína usualmente é realizada por HPLC que é uma metodologia de alto custo. O objetivo deste trabalho se baseia no desenvolvimento de um método de baixo custo e simplicidade operacional e que consiste em uma análise cinética utilizando-se para isto a reação entre o *sodio/iodato* catalisada por compostos de enxofre (II) em meio ácido ou neutro:



O desenvolvimento desta reação é monitorado pela absorvância do iodo a 350nm. Os valores de absorvância são medidos em tempos fixos de 90 e 1080 segundos após a adição de homocisteína e cisteína a solução de *sodio/azoteto*. O limite de detecção das soluções padrões foram menores do que $5.0 \times 10^{-5} \text{mol/L}$, com um coeficiente de correlação de 0.998. Os dados obtidos foram comparados com as concentrações de folato e B_{12} , sendo que esta relação é inversamente proporcional a concentração de homocisteína. Testes estão sendo realizados com a finalidade de eliminar a cisteína que é um interferente do método. FAPESP, CNPq

162

EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES

Official Journal of the European Federation
for Pharmaceutical Sciences



Supplement:
Abstracts, 3rd Congress
of Pharmaceutical Sciences
(CEPAP 2001)
São Paulo, Brazil, April 4-11 2001

ELSEVIER

broad spectrum HPV biotinylated DNA probe (DAKO Y1404), and for visualization with a catalyzed signal amplification system by tyramide (Kit DAKO GenPoint). The results obtained disagree with the literature that reports HPV positivity in archive biopsies using the two methods tested, since we detected no positivity in *in situ* hybridization and only 4 positive cases by immunohistochemistry, one of them not associated with HPV. The negativity of the reactions may be justified by the less than ideal fixation used, i.e., permanence of the biopsies in 4% formalin for more than 24 h.

PL7 IRON STATUS IN UNDERGRADUATE TEENAGERS

R Mainardi¹, J E Dutra de Oliveira², C A N de Almeida², G G P Lemos², Z M O Gregório¹ & A M de Souza¹ – ¹Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, USP, E-mail: mainardi@fcfrp.usp.br; ²Faculdade de Medicina, Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP, Brasil

Iron deficiency is among the most widespread nutritional deficiencies in the world. Usually, it is clinically manifested as hypochromic anaemia. Several physiological alterations occur in the presence of iron-deficient anaemia, such as impairment of cardiovascular function, low learning and work capacity. Body mass in adolescence and early adulthood is found to be lower.

The aim of this study is to estimate the prevalence of iron deficiency and/or anemia in a group of teenagers (17–20 y), recently admitted to university.

Hb concentration was used to define anemia (120 g/L for women and 130 g/L for men). To assess iron status: ferritin (chemiluminescent EIA) and serum transferrin receptor (ELISA) were used.

A total of 87 teenagers were studied. None was anemic. Of this 54% were considered iron depleted or deficient with serum ferritin below 40 µg/L and serum transferrin receptor normal or elevated.

Our results indicate a high prevalence of iron depletion or deficiency among this age group, requiring nutrition education and/or intermittent preventive therapy to guarantee a desirable iron status.

FAPESP

PL8 DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF TT VIRUS (TTV) IN BLOOD DONORS

S Kashima¹, M F Amarante¹, R Carneiro¹ & D T Covas^{1,2} – ¹Laboratório de Biologia Molecular, Hemocentro de Ribeirão Preto; ²Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Brasil, E-mail: skashima@pegasus.fmrp.usp.br

TT virus (TTV) was first described in 1997 in a patient

(T.T.) with posttransfusion hepatitis. Although the association between TTV and hepatitis is still unclear, studies showing the prevalence data are widely described in healthy blood donors and in patients with posttransfusional hepatitis with unknown etiology (non-A to G). TTV is a member of the *Circoviridae* family and has single-stranded DNA genome consisting of approximately 3800 nucleotides. Until now, three main genotypes have been described for TTV: genotypes 1, 2 and 3. The aim of this study is to detect the presence of TTV in healthy blood donors and to investigate the genotype of this virus among Brazilian blood donors. DNA-TTV was investigated in serum samples of 167 blood donors (mean age: 35; 75% male; 25% female). The amplification was done by nested-PCR method for the ORF-1 region of the genome using the primers: A5427 and A5430 (1st round); A2761 and A5432 (2nd round). In our results, DNA-TTV was detected in 17 serum samples of healthy blood donors (10.2%). All positive cases showed no significant elevation of alanine-aminotransferase (ALT) levels. These results showed that TTV can be detected in regular blood donors showing a prevalence in agreement with the epidemiological study in Japanese blood donors (Okamoto, 1998). The positive samples from 13 TTV strains were cloned and the genotype was determined by DNA sequencing. We compared partial sequences of 224 base pairs and nucleotide sequence variation among isolates was 30%. Phylogenetic analysis was performed by neighbor-joining method and the phylogenetic relationship of Brazilian isolates showed that 84.6% had high sequence similarity to genotype 1 and 15.4% to genotype 2.

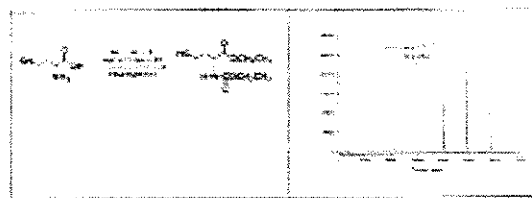
Financial Support: Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP)

PL9 ANALYSIS OF HOMOCYSTEINE IN PLASMA BY DIMP-T&R/MIMS TECHNIQUE

R Haddad, M A Mendes, M N Eberlin^{**}, N F Hoehr^{*} – State University of Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil; ^{*}FCM, P.O. Box 6111, ^{**}IQ, P.O. Box 6154, <http://thomson.iqm.unicamp.br>

Recently, the level of homocysteine in blood has been proposed as a novel, more reliable indicator for potential heart attacks and strokes. The toxicity directed at the endothelial cell when combined with blood clot promotion is a lethal marriage capable of producing heart attacks, strokes, and pulmonary embolism. The problem with homocysteine is that even though 70% is bound to plasma proteins in the blood stream, it is a potent toxin to cells that line blood vessels and interacts with specialized proteins and cells in the blood causing blood to easily clot. Here we describe the use of a new Direct Introduction Mass Spectrometry DIMP-T&R-MIMS system for semi-VOCs analysis of homocysteine in biological fluids. The new system permits faster and uniform heating of the

membrane loop. The following reaction was used for the derivatization of homocysteine, and to facilitate its permeation through the silicone membrane. The Figure DIMPT&R-MIMS responses for homocysteine quantitation after derivatization, test or recovery, reproducibility, detection limits and linearity were performed and show good results, recovery 97.7%, DL 5 μ M and $R=0.998$.



FAPESP

P1.10 ASSESSMENT OF HUMAN COMPLEMENT ACTIVATION: COMPARISON OF CONVENTIONAL END-POINT CH50 TEST WITH KINETIC HEMOLYTIC CUVETTE AND MICROPLATE ASSAYS

I. S. P. Croa¹, P. R. Brill¹, J. E. Barbosa² & C. H. M. Avelar¹

¹Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP. E-mail: luperox@usp.br.

²Departamento de Biogenética e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Brasil

The standard 50% hemolytic complement (CH50) assay is the most commonly used method of screening patient sera for functional activity of the classical complement (C) pathway. To circumvent some disadvantages of this test, we propose to use kinetic hemolytic methods, which have higher sensitivity and are simpler to perform than the CH50 assay. The objective of our study was to compare manually developed kinetic hemolytic cuvette and microplate assays to a conventional CH50 test for measuring total classical C activity. The kinetic assays measure the time needed for 50% cell hemolysis (%) by reduction in absorbance at 700 nm. The cuvette tests were performed in two final reaction volumes: 1.2 mL and 2.4 mL (25 μ L and 50 μ L of serum, respectively). The microplate assay employed a final volume of 0.24 mL (5 μ L of serum) and the results were read automatically on a spectrophotometer. Statistical analyses showed good correlation for both the cuvette assays compared to the CH50 test ($P<0.05$). Excellent correlation was found when 1.2 mL was compared to 2.4 mL cuvette assay ($P<0.0001$). We also find that the newer method we propose, using microtiteration plates, compare well with the CH50 assay. This semi-automated microassay requires very small amounts of serum, is a simple and fast method and allows screening of large number of samples simultaneously. In conclusion, both cuvette and microplate assays can provide a practical

screen of C activity in clinical laboratories or research protocols that require this kind of measurements.

P1.11 DETECTION OF *T. gondii* BY HEMI-NESTED PCR AMPLIFICATION IN BLOOD SAMPLES OF SEROPOSITIVE INDIVIDUALS CO-INFECTED WITH HIV

V. M. W. Gomes¹, R. D. C. Honda¹, M. H. Hirata¹, C. K. Kanashiro², A. M. M. de Souza³, M. A. Daher¹ & Y. I. Yasunaka¹ – ¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; ²Centro de Referência em DST/AIDS da Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo; ³Curso de Farmácia da Universidade de Grande ABC, Brazil. E-mail: yasuim@unimab.br

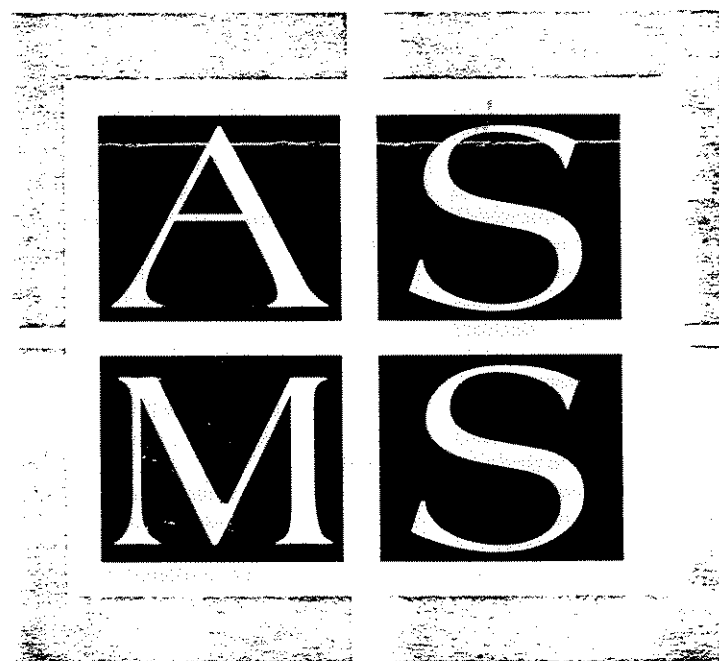
The reactivation of latent *T. gondii* cysts is one of the most common opportunistic infections in patients with AIDS. In this study, we have developed a hemi-nested PCR (Henes-PCR) procedure for detection of *T. gondii* in blood samples of 39 seropositive and 21 seronegative individuals. DNA was extracted by salting-out and chaotropic methods. Detection of *T. gondii* DNA was carried out by amplification of the TGR1 sequence by PCR and Henes-PCR procedures. The analytical sensitivity of Henes-PCR was greater (10^2 parasites/mL) than that of PCR (10^4 parasites/mL). The analysis of blood samples revealed that both amplification procedures showed high specificity (100%). In seropositive patients, 82% (32/39) were also positive for HIV. Moreover, PCR and Henes-PCR was positive in blood samples from 1 of 8 (12.5%) seropositive, non-treated, and HIV-infected patients. These preliminary data indicate a positive association between toxoplasmosis and HIV-infection. In conclusion, Henes-PCR is a useful tool for the detection of toxoplasmosis reactivation in HIV-infected individuals.

P1.12 PHENOLIC COMPOUNDS DO NOT AFFECT INTERFERENCE BY ASCORBIC ACID IN BIOCHEMICAL TESTS THAT USE OXIDASE/PEROXIDASE SYSTEMS

F. Martinello & E. L. da Silva – E-mail: eassantos@uol.com.br. Departamento de Análises Clínicas, Centro de Genética da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.

Ascorbic acid (AA) produces a negative interference in several biochemical tests based on the oxidase/peroxidase reaction systems (Trinder). In the Trinder system the oxidized chromophore is measured, which is yielded from H₂O₂, peroxidase, a phenolic compound and 4-aminophenazone (4-AF) reaction. Uric acid measurement based on the Trinder reaction that use 3,5-dichloro-2-hydroxybenzoic-sulfonate-DHBS has higher negative interference by AA than cholesterol, glucose and triglycerides.

**The 48th ASMS
CONFERENCE
on
MASS SPECTROMETRY
and ALLIED TOPICS**



**Long Beach
California
June 11 – 15, 2000**

THURSDAY POSTERS

7:30 – 8:00 am	SET UP POSTERS, Exhibit Hall B
8:45 – 10:15 am	POSTER SESSION: Authors of ODD numbered posters (i.e. 001, 003) present.
1:30 – 3:00 pm	POSTER SESSION: Authors of EVEN numbered posters (i.e. 002, 004) present.
3:00 – 3:30 pm	REMOVE POSTERS. Please leave posters until 3:00 pm.

PG240	ESI-FT-ICR-MS ^a : <u>Paul Gates</u> ¹ ; Marc Roddis ¹ ; Ylva Roddis ¹ ; Peter Leadlay ¹ ; James Staunton ¹ ; <i>Cambridge University, Cambridge, UK</i>	ThPG253	Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis RAS, Moscow, Russia
PG241	Coulombically-Mediated Conformations of the Fourth Generation Poly (propylene imine) Dendrimer in the Gas Phase: <u>Gina A. Zientara</u> ¹ ; Anne E. Counterman ¹ ; David E. Clemmer ¹ ; <i>Indiana University, Bloomington, IN</i>	ThPG254	Alkyl chain structure determination of zinc dithiophosphates in lubricating oils by GC/EI/MS and GC/ECNCl/MS: <u>Michel Becchi</u> ¹ ; Frederic Perret ¹ ; Bernadette Carraze ² ; Jean-François Beziau ² ; Jean-Pierre Michel ³ ; CNRS, SCA, BP22, Vernaison, France; PSA, S.C.A. Physico-chimiques, Velizy, France; Service Lubrifiants, PSA, Belchamp, France
PG242	Identification of taxoids in extracts from <i>Taxus wallichiana</i> by ESI-MS and MS/MS: <u>P. Stefanowicz</u> ¹ ; J. Prasain ¹ ; Y. Konishi ¹ ; <i>Biotechnology Research Institute, Montreal, Canada</i>	ThPG255	GC/MS Analysis of Intact Sydnominine Ring: <u>Jeongae Lee</u> ¹ ; Song-Ja Park ¹ ; Heesoo Pyo ¹ ; Dong-Seok Lho ¹ ; <i>Korea Institute of Science and Technology, Seoul, Korea</i>
PG243	Analysis of anabolic steroids with liquid chromatography/tandem mass spectrometry: <u>Pieter E. Joos</u> ; Marc Van Ryckeghem; Rene E. Van Gricken; Jos Vonckx; <i>University of Antwerp, Antwerp, Belgium; SGS Depauw & Stokoe, Melsele</i>	ThPG256	Mass Spectrometric Analysis of Dinuclear Lewis Acid Complexes with Aluminum: <u>Lidia Matveeva</u> ¹ ; Andrew Cottone ¹ ; Michael J. Scott ¹ ; Oleg Matveev ¹ ; David H. Powell ¹ ; <i>University of Florida, Gainesville, FL</i>
PG244	Amino Acid Analysis by CE-ESI-MS: <u>Werner Eberhardt</u> ¹ ; Tomoyoshi Soga ² ; <i>Agilent Technologies, Waldbronn, Germany; Yokogawa Analytical Systems Inc., Tokyo, Japan</i>	ThPG257	Fluorous amine scavenger compounds as a new calibration standard for the EI-MS in the mass range of 100-3000 amu: <u>Kasi V. Somavajula</u> ¹ ; Vyacheslav N. Fishman ¹ ; Bruno Linclau ¹ ; Dennis P. Curran ¹ ; <i>University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA</i>
PG245	The analysis of boronic acids by ESI and APCI positive and negative ionization: <u>John A. Castoro</u> ¹ ; DuPont Pharmaceuticals Co., Chemical Process R&D, Deepwater, NJ	ThPG258	The synthesized chromatography separation for non-hydrocarbon fraction in heavy oils: <u>Li Yuan</u> ; Renhua Kang; Rong-sheng Liao; Li Ren-wei; <i>Institute of geology and geophysics, C.A.S., Beijing, China; Hekou petroleum factory, Shengli Oil Field, Dongying, Shandong, China; Institute of Petroleum Geology Exploration, Dongying, Shandong, China</i>
PG246	LC/ESI/MS/MS and GC/MS Analyses of Oxidized Amino Acids from Tissue Proteins: Analytical Tools for Exploring the Role of Oxidative Stress and Protein Damage in vivo: <u>Joseph P. Gaut</u> ¹ ; Jaeman Byun ¹ ; Jay W. Heinecke ¹ ; <i>Washington Univ., St. Louis, MO</i>	ThPG259	Automated Identification of Trace Contaminants in Natural Essential Oils by Rapid Exact Mass GC-MS Analysis Using a GCT Mass Spectrometer: <u>Peter M. Hancock</u> ¹ ; Anthony Newton ¹ ; Martin R. Green ¹ ; <i>Micromass UK Limited, UK</i>
PG247	Identification of an Unknown Impurity: An Investigation of the Physical Property of 4-Trifluoromethylaniline: <u>Narasimhan Kasthurikrishnan</u> ¹ ; Derek Tickner ¹ ; Tamim Braish ¹ ; <i>Pfizer, Inc., Groton, CT</i>	ThPG260	A mass spectrometric study of doubly-charged porphyrins: <u>Mathias Schäfer</u> ¹ ; Herbert Budzikiewicz ¹ ; <i>University Köln, Cologne, Germany</i>
PG248	Identification of a Potent Anti-Bacterial Basic Lipid: <u>W. J. Griffiths</u> ¹ ; M. Ibrahim ¹ ; B. Agerberth ¹ ; <i>Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden</i>	ThPG261	Analysis of Freeze Dried Planar Supported Phospholipid Bilayers by Secondary Ion Mass Spectrometry: <u>Chris W. Diehnelt</u> ¹ ; Hanbin Mao ¹ ; Paul S. Cremer ¹ ; Emile A. Schweikert ¹ ; <i>Texas A&M University, College Station, TX</i>
PG249	HPLC-MS-MS analysis of bitter acids in hops and beer: <u>Peter Kovarik</u> ¹ ; Yves Mouget ¹ ; Takeo Sakuma ¹ ; <i>PE Sciex, Toronto, Canada</i>	ThPG262	C2H2/N2 Microwave Discharge Plasma: Production of C3N4: <u>Mikhail Kargev</u> ¹ ; Toshihiro Fujii ¹ ; Junichi Muraki ¹ ; Sundaram Arulmozhiraja ¹ ; <i>National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan</i>
PG250	Negative Ion Exact Mass MS/MS of Orsellinic Acid: <u>Gordon C. Kearney</u> ¹ ; Neil I. Johnson ² ; <i>Micromass UK LTD, Manchester, UK; University of Southampton, Southampton, UK</i>	ThPG263	Electron Impact Induced Fragmentation of Fused Sila-oxa-norbornenes: <u>Sasa Kazazic</u> ¹ ; Dunja Srzic ¹ ; Srecko Kirin ¹ ; Snjezana Pecur ¹ ; Leo Klasinc ¹ ; <i>Institute Rudjer Boskovic, Zagreb, Croatia</i>
PG251	ÅY-Lactam Antibiotics in Milk: a Multi-Residue Method using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry: <u>Sonja Riediker</u> ¹ ; Jean-Marc Diserens ¹ ; Richard H. Stadler ¹ ; <i>Nestlé Research Center, Nestec Ltd., CH-1000 Lausanne 26, France</i>		ION ACTIVATION, 263 - 309
PG252	DIMP-T&R-MIMS: Its Use for the Analysis of Vitamin C, of Metabolites in Urine, and of Aminoacids in Blood Plasma: <u>Maria A. Mendes</u> ¹ ; <u>Marcos N. Eberlin</u> ¹ ; Lilian L. Rocha ¹ ; Renato Haddad ¹ ; Nelci F. Höehr ¹ ; <i>State University of Campinas - UNICAMP, Brazil</i>	ThPH263	Alkali Metal Ion Affinities of Alkali Metal Hydroxides Measured by Threshold Collisionally Activated Dissociation: <u>Da Ren</u> ¹ ; Chrys Wesdemiotis ¹ ; <i>The University of Akron, Akron, OH</i>
		ThPH264	Rule Regarding Hydrogen Transfer during Low-Energy CID of Small Molecules: <u>Paul W. Brown</u> ¹ ; Adeboye Adejare ² ; Jason Morrill ³ ; <i>Quintiles, Kansas City, MO; Idaho State University, Pocatello, ID; University of Missouri, Kansas City, MO</i>

DIMP-T&R-MIMS: Its Use for the Analysis of Vitamin C, of Metabolites in Urine, and of Aminoacids in Blood Plasma

Marcos N. Eberlin , Maria Anita Mendes, Lilian L. Rocha, Renato Haddad e Nelci F. Höehr
State University of Campinas - UNICAMP - Campinas, SP - Brazil

Introduction: Membrane introduction mass spectrometry (MIMS) is a powerful technique for the analysis of VOCs in aqueous matrixes; for semi-VOCs, however, MIMS shows often poor performance. The trap&release MIMS technique developed by Lauritsen [Lauritsen, F. R.; Ketola, R. A. *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 4917] is able, however, to lower considerably the detection limits of semi-VOCs. Herein we describe the use of a new DIMP-T&R-MIMS system for semi-VOCs analysis in water and biological fluids.

Methods and Instrumentation: The DIMP-T&R-MIMS system [Mendes, M. A.; Eberlin, M. N. *Analyst*, **2000**, 125, 21] is shown in Figure 1. A standard Extrel ion source was used with just a minor modification: the i.d. of one of the two gas entrance lines was enlarged to 1/2 in. The capillary membrane was provided by Dow Corning Co.: Silastic Medical-grade tubing, wall tickness: 0.022 in., i.d.: 0.025 in., o.d.: 0.047 in.

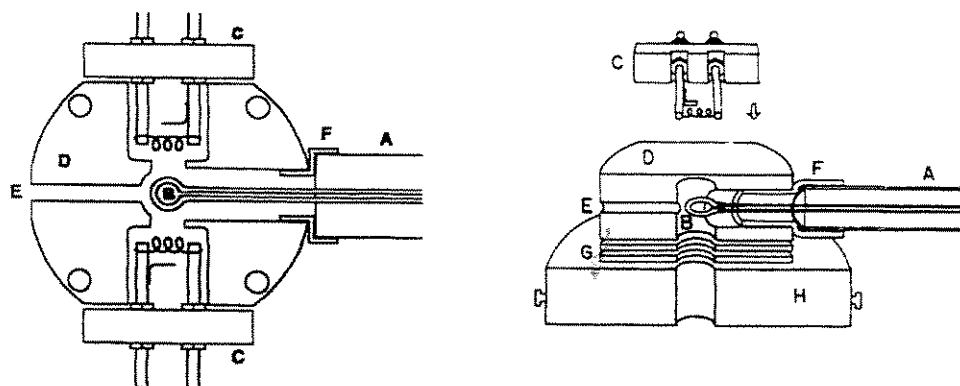


Figure 1: Two orthogonal cross-sections of the DIMP/T&R-MIMS system: (A) DIMP probe; (B) capillary membrane loop; (C) filaments; (D) ion source block; (E) Cl gas entrance; (F) ceramic probe adapter; (G) focusing lenses; (H) ion source holder.

Results and Discussion: T&R-MIMS preconcentrates the VOCs inside the membrane before thermal desorption that promotes efficient transport of the SVOCs into the gas phase. The new DIMP-T&R-MIMS system differs from the original system because it uses a direct insertion membrane probe (DIMP) probe to place the capillary membrane loop inside the ion source block exactly between two parallel filaments (Figure 1). The new system permits faster and uniform heating of the membrane loop.

Homocysteine: Recently, the level of homocysteine in blood has been proposed as a novel, more reliable indicator for potential heart attacks and strokes [<http://www.homocysteine.com>]. The problem with homocysteine is that even though 70% is bound to plasma proteins in the blood stream, it is a potent toxin to cells that line blood vessels and interacts with specialized proteins and cells in the blood causing blood to easily clot. The toxicity directed at the endothelial cell when combined with blood clot promotion is a lethal marriage capable of producing heart attacks, strokes, and pulmonary embolism.

Homocysteine derivatization: The following reaction was used for the derivatization of homocysteine, and to facilitate its permeation through the silicone membrane.

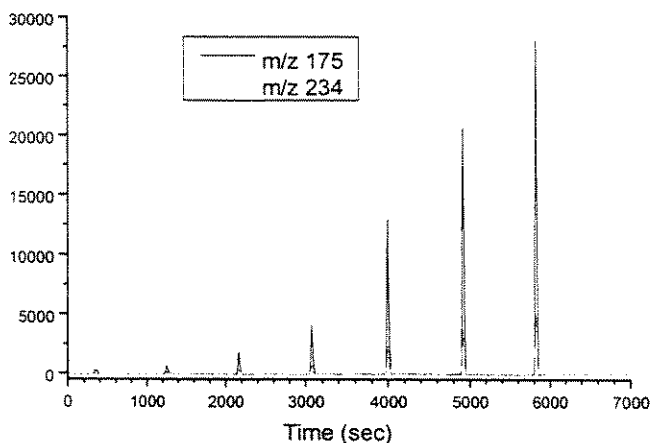
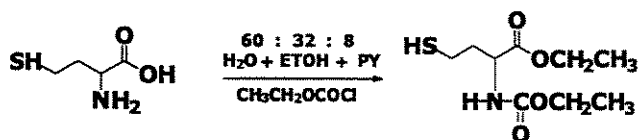


Figure 3: DIMP/T&R-MIMS responses for homocysteine quantitation after derivatization.

Vitamin C: The DIMP/T&R-MIMS system is suitable for combined drug analysis, and we have used it for combined quantitation of vitamin C, acetylsalicylic acid and caffeine in medicinal tablets. Figure 1 shows vitamin C quantitation.

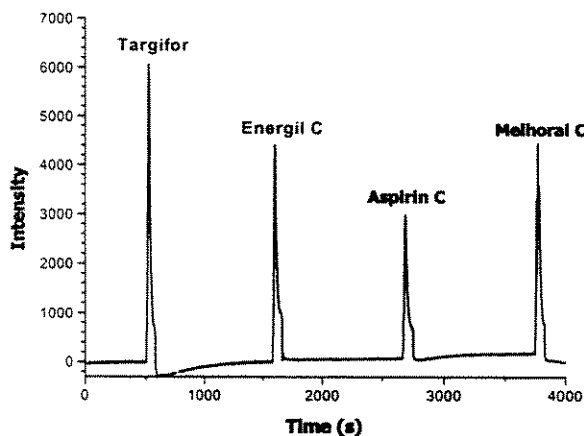


Figure 2: DIMP/T&R-MIMS responses used to quantitate Vitamin C in medicinal tablets.

Conclusion: DIMP-Trap&Release MIMS is a powerful technique for combined VOC and SVOC analysis in aqueous solutions, and in biological fluids such as urine and blood plasma. Herein we have demonstrated its use for vitamin C quantitation in medicinal tablets, and for the aminoacid homocysteine in blood plasma.

FAPESP/CNPq