1. OBJETIVO

Fornecer orientações para a adequada utilização do Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massas (CG/EM) na realização de análises qualitativas de substâncias ilícitas ou controladas.

2. REAGENTES, PADRÕES, MATERIAIS E INSUMOS

- Seringa de 10 µL para amostrador automático ou para injeção manual
- Coluna capilar HP-5 MS, HP-1 MS, RXI-5 MS, RXI-1 MS, DB-WAX, DB-5 MS ou DB-1 MS (ou outra coluna similar)
- Solventes orgânicos de grau analítico: acetato de etila, acetonitrila, álcool isopropílico, etanol, éter de petróleo, éter etílico, clorofórmio, diclorometano, hexano ou metanol
- Gás hélio grau 5.0

3. EQUIPAMENTOS

- Cromatógrafo Gasoso (CG) Agilent 6890N, 7890A e 8890
- Espectrômetro de Massas (EM) Agilent 5973 Inert, 5975 C e 5975 *triple axis* 5977B
- Amostrador líquido automático Agilent série 7693A, amostrador automático combinado CTC PAL G6500-CTC
- Estação de trabalho com *softwares* ChemStation e Data Analysis instalados, ou suíte de *softwares* Mass Hunter.

4. PRECAUÇÕES ANALÍTICAS

4.1. Seguir as orientações do POP-I-SEPLAB-02 Ambiente e Segurança.

4.2. Para injeção manual, a seringa a ser utilizada deve ser previamente lavada com o mesmo solvente utilizado na preparação da amostra, antes e após sua utilização. Recomenda-se o mínimo de 3 lavagens.

4.3. Os métodos de CG/EM descritos neste procedimento não devem ser utilizados para distinguir entre os isômeros ópticos.

4.4. Durante a preparação das amostras, deve-se tomar cuidado com sobrecarga de material, pH extremo, presença de óleos, açúcares e compostos que possam ser retidos no equipamento, de modo a evitar baixa sensibilidade ou efeitos residuais. Soluções ácidas ou básicas devem ser neutralizadas antes da injeção no equipamento.

4.5. Após extração/diluição das amostras, estas devem ser centrifugadas e/ou filtradas para evitar que partículas em suspensão e compostos indesejados sejam introduzidos no equipamento. Partículas não devem ser visíveis a olho nu no *vial* da amostra.

4.6. Problemas ou mensagens de erro no equipamento que não possam ser imediatamente corrigidos devem ser notificados aos responsáveis pela manutenção dos equipamentos de CG/EM para que sejam corrigidos.

5. PROCEDIMENTOS

5.1. Preparação de amostras e padrões

5.1.1. Para a extração de amostras deve ser consultado o MET-I-SEPLAB-01 Extração de Substâncias Ilícitas ou Controladas. Padrões porventura utilizados devem ser preparados por procedimento equivalente.

5.1.2. Agentes de derivatização podem ser utilizados, quando necessário, desde que os responsáveis pela manutenção dos equipamentos de CG/EM sejam anteriormente consultados.

5.2. Métodos de CG/EM

5.2.1. As descrições dos parâmetros dos métodos utilizados pelo SEPLAB estão localizadas no Anexo A.

5.2.2. Quando forem necessárias modificações nos métodos descritos no Anexo A, essas devem ser autorizadas conforme o POP-D-AGQL-13 Procedimento para Autorização de Desvios.

5.2.3. Amostrador automático deve ser utilizado sempre que possível.

5.2.4. Deve-se, necessariamente, utilizar o modo de injeção Splitless ou, de forma alternativa, durante a montagem da sequência no modo Split, aumentar o volume de injeção para até o máximo de 2 µL, nos seguintes casos: nenhuma substância suspeita seja identificada utilizando o modo Split, tratar-se de material sabidamente pouco concentrado ou a conclusão das análises resultar negativo para drogas.

5.2.4.1. Caso julgue necessário, realizar novas extrações, conforme MET-I-SEPLAB-01 - EXTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ILÍCITAS OU CONTROLADAS.

5.2.4.2. Havendo suspeita de que se trate de substância não cromatografável via cromatografia gasosa, avaliar a possibilidade e viabilidade de realizar análises por cromatografia líquida ou outra técnica que julgar mais adequada

5.3. Injeções de branco

5.3.1. Injeções de branco devem ser realizadas em qualquer das seguintes situações:

- Antes da injeção de uma amostra, ou de uma série de amostras, utilizando o mesmo método que para a amostra;
- No máximo a cada 10 amostras;
- Sempre que houver uma mudança nas condições cromatográficas do instrumento (exceto aquelas que simplesmente mudarem o volume de injeção ou a razão de *split*);
- Injeções de branco adicionais podem ser executadas a critério do analista.

5.3.2. O mesmo solvente utilizado na preparação da amostra deve ser utilizado na preparação do branco.

5.3.3. Picos significativos em cromatogramas de brancos devem ser devidamente investigados e documentados.

5.4. Sequências

5.4.1. As sequências devem ser identificadas com a data corrente e não necessitam ser arquivadas.

5.4.2. Os arquivos de dados devem ser nomeados conforme o POP-I-SEPLAB-03 Rastreabilidade dos Registros Técnicos.

5.4.3. Os arquivos de dados devem ser salvos diretamente na pasta de cada usuário. Se a unidade de disco do computador estiver cheia, deve-se notificar o(s) responsável(is) pela manutenção dos CG/EM para realizar os procedimentos adequados.

6. AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

6.1. Cromatografia gasosa

6.1.1. O CG/EM fornece os dados de tempo de retenção e de espectrometria de massas.

6.1.2. Para que a cromatografia gasosa possa ser considerada como técnica analítica na identificação de uma substância, na categoria B, conforme POP-I-SEPLAB-09, é necessário efetuar a comparação do tempo de retenção do analito no cromatograma do material questionado com um tempo de retenção de referência, que pode ser obtido pela análise de um padrão daquele analito, realizada nas mesmas condições que o material questionado (mesmo equipamento, coluna, método etc).

6.1.3. Para determinação do tempo de retenção podem ser utilizados os integradores disponíveis nos *softwares* ChemStation ou Mass Hunter. Alternativamente, pode-se fazer a determinação manualmente, considerando o tempo de eluição em que o pico cromatográfico foi detectado.

6.1.4. Para utilizar o tempo de retenção para a identificação de um analito, o tempo de retenção obtido no cromatograma do material questionado deverá estar contido no seguinte intervalo: tempo de retenção de referência ± 0,10 minutos ou tempo de retenção de referência ± 1% (o que for maior).

6.1.5. Para a comparação dos tempos de retenção obtidos para a amostra e o padrão é aceitável um intervalo de tempo de até 30 dias entre as injeções.

6.1.6. Os cromatogramas dos padrões podem ser salvos na pasta "Padroes" contida em cada aparelho, e sua identificação deve ser feita conforme POP-I-SEPLAB-03 - Rastreabilidade dos Registros Técnicos.

6.1.7. Se entre a injeção da amostra e a injeção do padrão ocorrer manutenção da coluna cromatográfica, ou alguma alteração no aparelho que possa interferir no tempo de retenção dos analitos, a comparação dos tempos de retenção não pode ser realizada, sendo necessária uma nova injeção do padrão nas mesmas condições da amostra.

6.2. Espectrometria de massas

6.2.1. Para que a espectrometria de massas possa ser considerada como técnica analítica na identificação de uma substância, na categoria "A", conforme POP-I-SEPLAB-09, é necessário efetuar a comparação do espectro de massas questionado com o espectro de uma referência.

6.2.2. Espectros de referência podem ser obtidos de três fontes, a saber:

- Bibliotecas eletrônicas disponíveis no SEPLAB, cuja consulta é feita a partir dos *softwares* ChemStation ou Mass Hunter, onde estão disponíveis os programas de busca PBM e NIST MS Search;
- Padrão analítico analisado nas mesmas condições da amostra, desde que ambos tenham o mesmo tempo de retenção, conforme detalhado em 6.1.4;
- Literatura científica, como farmacopeias, artigos publicados em periódicos científicos e outros. Nesse caso, é desejável que a referência consultada mencione as abundâncias relativas dos íons presentes no espectro de massas para possibilitar a comparação.

6.2.3. A confirmação da identidade de uma substância pela comparação entre o espectro de massas questionado e um espectro obtido em biblioteca eletrônica ou literatura científica (espectro de referência) deve ser feita seguindo os seguintes critérios:

6.2.3.1. Todos os íons que tenham abundância relativa (AR) superior a 10% no espectro de referência devem necessariamente estar presentes no espectro questionado, até o limite de 10 íons (caso o espectro de referência apresente mais de 10 íons com AR superior a 10%, devem ser avaliados apenas os 10 mais abundantes).

- A AR de um íon é a razão percentual entre a área do íon em questão e a área do íon majoritário (íon base) do espectro. No *software* NIST MS Search, esse valor aparece ao lado do íon. Por exemplo, se no *software* aparece a informação "10 largest peaks: 194 999 | 109 718 | 55 478 [...]", isso significa que o íon base é o 194, o segundo mais abundante é o 109 (AR de 71,8%) e o terceiro mais abundante é o 55 (AR de 47,8%).

6.2.3.2. Caso o espectro de referência não tenha ao menos três íons com AR superior a 10%, deve ser avaliada a presença dos 8 íons mais abundantes, independentemente de suas AR, que devem necessariamente estar presentes no espectro questionado.

6.2.3.3. O íon base do espectro questionado deve ser o mesmo do espectro de referência, ou algum outro íon cuja AR no espectro de referência seja superior a 70%. Nesse caso, o íon base do espectro de referência também deve ter uma AR superior a 70% no espectro questionado.

6.2.3.4. A tela do *software* NIST MS Search mostrando a comparação entre o espectro questionado e o espectro de referência deve ser salva como figura e arquivada na pasta do Dossiê Técnico, junto aos arquivos dos cromatogramas. Caso a comparação tenha sido feita com um espectro obtido em literatura científica, salvar a imagem e os dados do espectro questionado e as informações oriundas da literatura no mesmo local.

6.2.4. Para confirmação da identidade de uma substância pela comparação entre um espectro de massas questionado e um obtido de um padrão analisado juntamente à amostra questionada, devem ser observados todos os critérios descritos em 6.2.3, excetuando-se o descrito em 6.2.3.4; adicionalmente, devem ser selecionados ao menos três íons, dentre os mais abundantes e/ou característicos do espectro de referência, para comparação de suas AR com o espectro questionado. Não há restrição para o valor da AR dos íons no espectro de referência. Caso o íon molecular da substância esteja presente no espectro de referência numa AR superior a 5%, ele também deve ser selecionado para comparação. Essa comparação deve ser registrada na PLN-I-SEPLAB-28 Critérios de Análise de Espectros de Massas.

- A diferença máxima aceitável entre a contagem de um íon particular no espectro questionado com o mesmo íon no espectro de referência é de 30% em termos relativos ou ± 100 em termos absolutos, o que for maior. Para contagens iguais ou inferiores a 330, o intervalo calculado por ±100 absoluto passa a ser maior.
- Alguns exemplos de intervalos aceitáveis estão listados na tabela 01.

Tabela 01: Exemplos do cálculo dos faixas aceitáveis de contagem dos íons na comparação entre os espectros de massas da substância de referência e do questionado.

AR do íon no espectro de **referência**	Contagem do íon no espectro de **referência**	Cálculo do intervalo aceitável	Faixa aceitável de contagem do íon no espectro **questionado**
100% (Íon base)	999	30% relativo	699 – 999
80%	800		560 – 999
60%	600		420 – 780
34%	340		238 - 442
33%	330	± 100 absolutos	230 – 430
10%	100		0 – 200
1%	10		0 – 110

- Caso seja necessário avaliar a AR de um íon que não esteja listado entre os dez mais abundantes do espectro questionado, sua AR pode ser calculada manualmente. Para isso, no *software* ChemStation, selecionar o espectro de massas questionado e clicar em Spectrum > Tabulate, para obter a abundância absoluta do íon majoritário e do íon de interesse. No caso do programa Mass Hunter, usar o módulo *Qualitative Analysis*, após selecionar um espectro de massas, clicar em "MS Spectrum Peak List 1", e com o botão direito clicar em "add/remove columns", adicionar "Abund%" (removendo tudo menos as informações de m/z, Abund e Max Abund), e ok, para ter as mesmas informações de abundância absoluta do íon majoritário e do íon de interesse. Em seguida, calcular a AR do íon de interesse pela equação:

$$AR = 100 * \frac{Abundância\ íon\ de\ interesse}{Abundância\ íon\ majoritário}$$

6.2.5. Alternativamente, todos os fragmentos podem ser mostrados no programa NIST Search da seguinte forma: clicar com o botão direito do mouse em qualquer lugar da janela de informações do espectro de massas desconhecido, e no menu que irá aparecer, selecionar "properties"; em seguida selecionar a aba "Unknown Text info", clicar marcando a opção "m/z Intensity list", e por último clicar em "ok". Para mostrar a intensidade de todos os fragmentos do composto presente na biblioteca, basta clicar na aba "Hit Text Info", em seguida clicar marcando a opção "m/z Intensity list" e por último clicar em "ok".

6.2.6. O espectro questionado não pode apresentar íons estranhos ao espectro padrão com relação m/z superior a 100 e AR superior a 20%, a não ser que possa ser demonstrado que esses íons se referem a uma co-eluição com outras substâncias ou ao ruído no cromatograma. Essa demonstração pode ser feita, por exemplo, através da extração de cromatogramas de íons ou subtração do *background* de um espectro.

6.3. Registro no Dossiê Técnico do caso

6.3.1. Os arquivos obtidos devem ser salvos na pasta do Dossiê Técnico do caso, localizada na rede interna do Laboratório, conforme descrito no POP-I-SEPLAB-03 Rastreabilidade dos Registros Técnicos.

6.3.2. O registro de caso deve conter os arquivos referentes a brancos, amostras e padrões de referência, quando utilizados.

7. REFERÊNCIAS

- Agilent 6890, 7890 e 8890 GC Instrument Manuals
- Agilent 5973, 5975 e 5977B Instrument Manuals
- AORC Guidelines for the Minimum Criteria for Identification by Chromatography and Mass Spectrometry (2015). <http://www.aorc-online.org/documents/aorc-ms-criteria-modified-23-aug-16/>. Acesso em 24 de abril de 2019.

- GTFCh Guideline for quality control in forensic-toxicological analyses (2018). <https://www.gtfch.org/cms/images/stories/files/Guidelines-for-quality-control-in-forensic-toxicological-analyses-GTFCh-20090601-20180125.pdf>. Acesso em 24 de abril de 2019.

8. HISTÓRICO DE REVISÕES

Versão	Data	Descrição
00	13/05/2014	Emissão Inicial
01	24/03/2015	Inclusão do item 5.2.5; alteração do intervalo de aceitação do tempo de retenção obtido em relação ao tempo de retenção de referência no item 6.1.7; inclusão do método "Drogas Sintéticas – RTL" no Anexo A
02	24/11/2015	Exclusão do tempo de retenção de travamento do método Drogas Sintéticas – RTL no Anexo A.
03	30/03/2017	Inclusão do método Fatburner no Anexo A.
04	05/12/2017	Reestruturação do item 6, com substituição dos itens 6.1 e 6.2.
05	04/01/2018	Correção do método 8, "Drogas Sintéticas", que deixou de ser um método com RTL.
06	07/01/2019	Alteração do item 6.2.3 para formalização da PLN-I-SEPLAB-28. Alterações nos itens 6.2.4 e 6.2.5 para maior clareza nos cálculos dos intervalos aceitáveis.
07	26/04/2019	Reformulação dos itens 6.2.3, 6.2.4 e 6.2.5 indicando novos critérios para a comparação de espectros de massas questionados com espectros de bibliotecas eletrônicas. Alteração nos equipamentos disponíveis no laboratório. Inclusão de nova referência bibliográfica.
08	08/07/2020	Exclusão dos itens 5.2.5 e reformulação do item 6.1.2, nos dois casos retirando a possibilidade de uso de métodos com "Retention Time Locking". Inclusão do item 6.2.5 explicando como mostrar todos os fragmentos de massa no *software* NIST Search.
09	08/07/2024	Nova redação do item 5.2.4 e inclusão dos itens 5.2.4.1 ou 5.2.4.2.

Parâmetros dos Métodos de GC/EM

1. Método "RAPIDO"

Indicado para compostos que eluem até 10 min, anfetaminas, cocaína, opiáceos, benzodiazepínicos e uso geral.

CG	Interface CG/MS
- tempo inicial 2,00 min - temperatura inicial 150 ºC - rampa 40 ºC/min - temperatura final 315 ºC - tempo final 4,87 min - tempo total corrida de 10,99 min - razão de split 50:1 - volume de injeção 0,2 µL - temperatura do injetor 280 ºC	- temperatura 280 - 300 ºC **MS** - modo de aquisição Scan - solvente delay 1,50 min - faixa de scan 40 – 550 - tipo de tune: stune.u - Gain Tune: 1 a 15

2. Método "RAPIDO SPLITLESS"

Indicado para compostos que eluem até 10 min, anfetaminas, cocaína, opiáceos, benzodiazepínicos e uso geral, quando não identificados pelo método RÁPIDO.

CG	Interface CG/MS
- tempo inicial 2,00 min - temperatura inicial 150 °C - rampa 40 °C/min - temperatura final 315 °C - tempo final 4,87 min - tempo total corrida de 10,99 min - modo splitless - tempo de válvula split fechada: 1,0 min - volume de injeção 0,2 µL - temperatura do injetor 280 ºC	- temperatura 280 - 300 ºC **MS** - modo de aquisição Scan - solvente delay 2,30 min - faixa de scan 40 - 550 - tipo de tune: stune.u - Gain Tune: 1 a 15

3. Método "MACONHA"

Indicado para análise de material vegetal aparentando ser maconha.

CG	Interface CG/MS
- tempo inicial 2,00 min - temperatura inicial 150 °C - rampa 40 °C/min - temperatura final 315 °C - tempo final 4,87 min - tempo total corrida de 10,99 min - razão de split 50:1 - volume de injeção 0,2 µL - temperatura do injetor 280 °C - lavagem microseringa com mistura hexano : acetato de etila (1:1)	- temperatura 280 - 300 °C **MS** - modo de aquisição Scan - solvente delay 1,50 min - faixa de scan 40 - 550 - tipo de tune: stune.u - Gain Tune: 1 a 15

4. Método "MACONHA SPLITLESS'

Indicado para análise de resíduos de maconha, quando não identificados no método MACONHA.

CG	Interface CG/MS
- tempo inicial 2,00 min - temperatura inicial 150 °C - rampa 40 °C/min - temperatura final 315 °C - tempo final 4,87 min - tempo total corrida de 10,99 min - modo splitless - tempo de válvula split fechada: 1,0 min - - volume de injeção 0,2 µL - temperatura do injetor 280 °C - lavagem microseringa com mistura hexano : acetato de etila (1:1)	- temperatura 280 - 300 °C **MS** - modo de aquisição Scan - solvente delay 2,30 min - faixa de scan 40 - 550 - tipo de tune: stune.u - Gain Tune: 1 a 15

5. Método "ESTENDIDO"

Indicado para os compostos que eluem após 10 min, substâncias não identificadas, esteroides, canabinóides sintéticos, suplementos alimentares.

CG	Interface CG/MS
- tempo inicial 2,00 min - temperatura inicial 150 °C - rampa 40 °C/min - temperatura final 315 °C - tempo final 14,87 min - tempo total corrida de 20,99 min - razão de split 50:1 - volume de injeção 0,2 µL - temperatura do injetor 280 °C	- temperatura 280 - 300 °C **MS** - modo de aquisição Scan - solvente delay 1,50 min - faixa de scan 40 - 550 - tipo de tune: stune.u - Gain Tune: 1 a 15

6. Método "ESTENDIDO SPLITLESS"

Indicado para os compostos que eluem após 10 min, quando não identificados no método ESTENDIDO, substâncias não identificadas, esteroides, canabinóides sintéticos, suplementos alimentares.

CG	Interface CG/MS
- tempo inicial 2,00 min - temperatura inicial 150 °C - rampa 40 °oC/min - temperatura final 315 °C - tempo final 14,87 min - tempo total corrida de 20,99 min - modo splitless - tempo de válvula split fechada: 1,0 min - volume de injeção 0,2 µL - temperatura do injetor 280 °C	- temperatura 280 - 300 °C **MS** - modo de aquisição Scan - solvente delay 2,30 min - faixa de scan 40 - 550 - tipo de tune: stune.u - Gain Tune: 1 a 15

7. Método "SOLVENTE"

Indicado para análises de solventes e diluentes em geral.

CG	Interface CG/MS
- tempo inicial 5,00 min - temperatura inicial 50 °C - rampa 8 °C/min - temperatura final 170 °C - tempo final 1,00 min - tempo total corrida de 21,00 min - razão de split 100:1 a 300:1 - volume de injeção 0,2 µL - temperatura do injetor 250 °C	- temperatura 280 - 300ºC
	MS
	- modo de aquisição Scan - solvente delay 0 min - faixa de scan 30-250 - voltagem relativa: 0 a – 400 V - tipo de tune: stune.u - Gain Tune: 1 a 15

8. Método "DROGAS SINTÉTICAS"

Indicado para análises de compostos sintéticos em geral.

CG	Interface CG/MS
- tempo inicial 2,00 min - temperatura inicial 100 °C - rampa 12 °C/min - temperatura final 300 °C - tempo final 10,00 min - tempo total corrida de 28,67 min - razão de split 10:1 - volume de injeção 0,2 µL - temperatura do injetor 250 °C	- temperatura 280 - 300 ºC
	MS
	- modo de aquisição Scan - solvente delay 1.8 min - faixa de scan 30-550 - tipo de tune: stune.u - Gain Tune: 1 a 15

9. Método "FATBURNER"

Indicado para análises de suplementos alimentares com ação declarada emagrecedora e produtos que declarem conter DMAA.

CG	Interface CG/MS
- tempo inicial 2,00 min - temperatura inicial 70 °C - primeira rampa 40 °C/min - temperatura intermediária 200ºC - tempo intermediário 4,00 min - segunda rampa 40 ºC/min - temperatura final 315 °C - tempo final 4,00 min - tempo total corrida de 16.125 min - razão de split 60:1 - volume de injeção 0,5 µL - temperatura do injetor 280 °C	- temperatura 280 - 300 ºC **MS** - modo de aquisição Scan - solvente delay 1.9 min - faixa de scan 20-400 - tipo de tune: stune.u - Gain Tune: 1 a 15