GUIA DE LABORATORIO

ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Autora: Martha Lucia Ruiz Benitez

Programa académico: Química y Farmacia

Agosto 2020

Universidad Simón Bolívar

1.INTRODUCCIÓN

La espectrometría de masas (EM), igualmente llamado MS (Mass spectrometry) es una técnica analítica de elucidación estructural que determina de forma cualitativa y cuantitativa la masa molecular de una muestra, en relación con su masa(m) y carga (z) = m/z. Esta técnica es de gran importancia ya que permite determinar el peso molecular de compuestos químicos pertenecientes a compuestos desconocidos o permite cuantificar compuestos conocidos en una muestra proveniente de los lípidos, péptidos, proteínas, compuestos con sustancias de composición similar, mediante el mecanismo de bombardeo de electrones sobre la muestra, permitiendo así la ionización de sus moléculas termolábiles, generando diferentes fragmentos pertenecientes a la muestra analizada.
Una de las características de la espectrometría de masa es que generalmente viene acoplada al cromatógrafo de gases y al cromatógrafo liquido permitiendo la detección de las moléculas separadas inicialmente por los cromatógrafos y cabe resaltar que la MS es una técnica que presenta gran sensibilidad permitiendo la identificación de elementos a bajas concentraciones.

2. OBJETIVOS

- Conocer los conceptos básicos de la técnica de espectrometría de masas (MS)
- Conocer las aplicaciones de la técnica de espectrometría de masas en el área Bioquímica y farmacéutica
- Conocer los fundamentos de LC-MS y GC-MS para la detección, identificación y cuantificación de analitos en muestras complejas

3. MATERIALES

- Cromatógrafo HPLC
- Cromatógrafo de gases
- Espectrómetro de masas
- Muestras
- Agua
- Diluyentes
- Etanol
- Acetona
- Acetato de etilo
- Acetonitrilo

4. FUNDAMENTO

El espectrómetro de masas determina la distribución de moléculas dependiendo de su carga/masa, generalmente viene acoplado a la cromatografía líquida de alta resolución y a la cromatografía de gases y estas técnicas son usadas para diversas aplicaciones tanto de las áreas biomédicas como medioambientales, dentro de las cuales están el análisis o presencia de drogas, fármacos, esteroides presentes en muestras humanas, para análisis de procesos industriales, determinar isótopos de diferentes elementos en un mismo compuesto, también sirve para detectar restos de pesticidas presentes en aguas, para analizar la composición de perfumes, análisis forense, entre otros.

De forma general, el espectrómetro de masas puede venir acoplado con los cromatógrafos HPLC (LC/MS) y con el cromatógrafo de gases (GC/MS). Las moléculas presentes de un analito deben ser analizadas según sus cargas, en donde inicialmente la muestra se calienta, es vaporizada (mediante el uso de una cámara de alto vacío) para obtener así los iones del analito en fase gaseosa (ionización), seguidamente es bombardeada con electrones para cargar las moléculas mediante la pérdida de un electrón de los átomos, fragmentándose, dando diferentes iones con carga y masa. Posteriormente los iones pasan por un acelerador de iones y pasan por un tubo curvo, entran a un campo magnético, que determina la trayectoria de los iones ya que los iones con carga son desviados y separados en función de su relación masa/carga (m/z) mediante la aplicación de campos eléctricos, magnéticos. Si la masa del ion es más grande la velocidad del paso por el tubo es menor, y si la masa es más pequeña la velocidad del paso por el tubo será mayor; así los iones más pequeños llegarán más rápido al detector (Figura 1), el cual los iones que pasen por ese detector producen una señal eléctrica que es enviada a un ordenado generando así un gráfico (picos cromatográficos) permitiendo así analizar el compuesto mediante los patrones de fragmentación y sus relaciones m/z apropiadas, detectado la presencia, cuantificación y estructura química del analito.

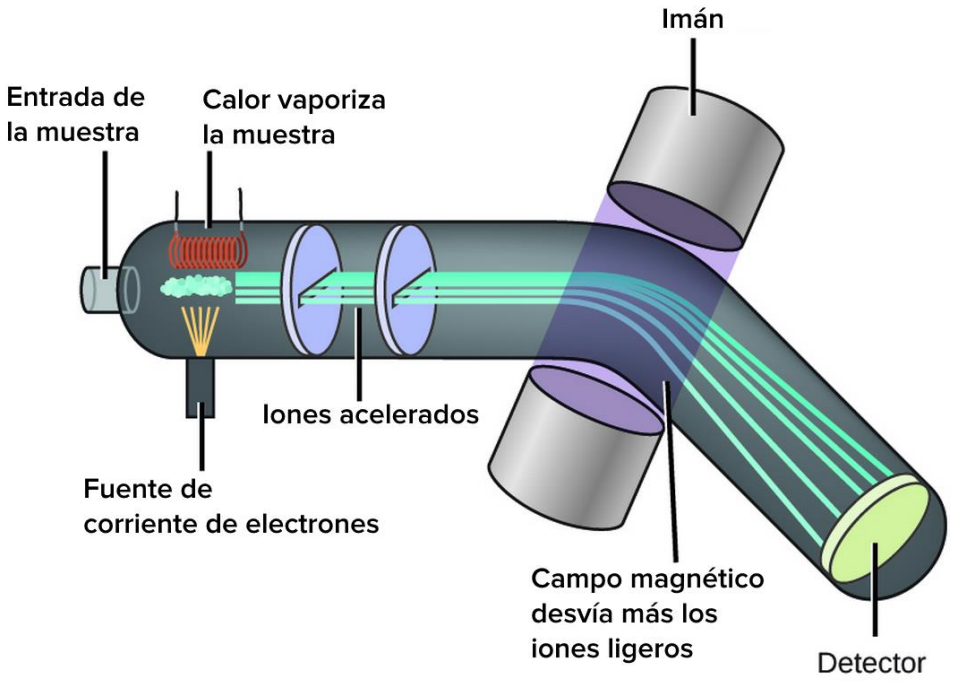

Figura 1. Partes de un espectrómetro de masas
Fuente: blog.analitek.com

Existen diversas formas o fuentes de ionización de las moléculas, dependiendo de las propiedades físico-químicas de las mismas, en donde los más usados son el ESI (Electrospray ionization) y el MALDI-TOF (Desorción/Ionización láser asistida por matriz). En donde el ESI en un método de electrospray que consiste en pasar los analitos en disolución por un fino capilar que presenta un campo magnético interno y presión de flujo elevado, es usado para analizar compuestos pesados y es usado en proteómica y en petroleómica (análisis de petróleo). Por otro lado, el MALDI-TOF es muy usado en proteómica para la identificación y caracterización estructural de biomoléculas, realiza una ionización suave, permitiendo la vaporización de moléculas no volátiles que sean termolábiles como las proteínas, lípidos, permite la identificación rápida de hongos, virus, bacterias, y esta fuente de ionización sirve para ionizar proteínas mediante una matriz orgánica cargada de electrones, donde las proteínas son polimerizadas en la matriz y se hace incidir un láser sobre esas muestras, vaporizando así las proteínas de la matriz, capturando electrones cuando salen ionizadas.

Finalmente, los gráficos (espectro) son generados por el equipo computo que se encuentra acoplado con el espectrómetro de masas en donde los resultados son presentados en gráficos de barras, en el cual el eje X indica la abundancia (porcentajes) del fragmento perteneciente a la muestra analizada y el eje Y indica la relación masa/carga de los

fragmentos, indicando así mismo el mayor valor m/z la masa molecular del analito entero estudiado (Figura 2).

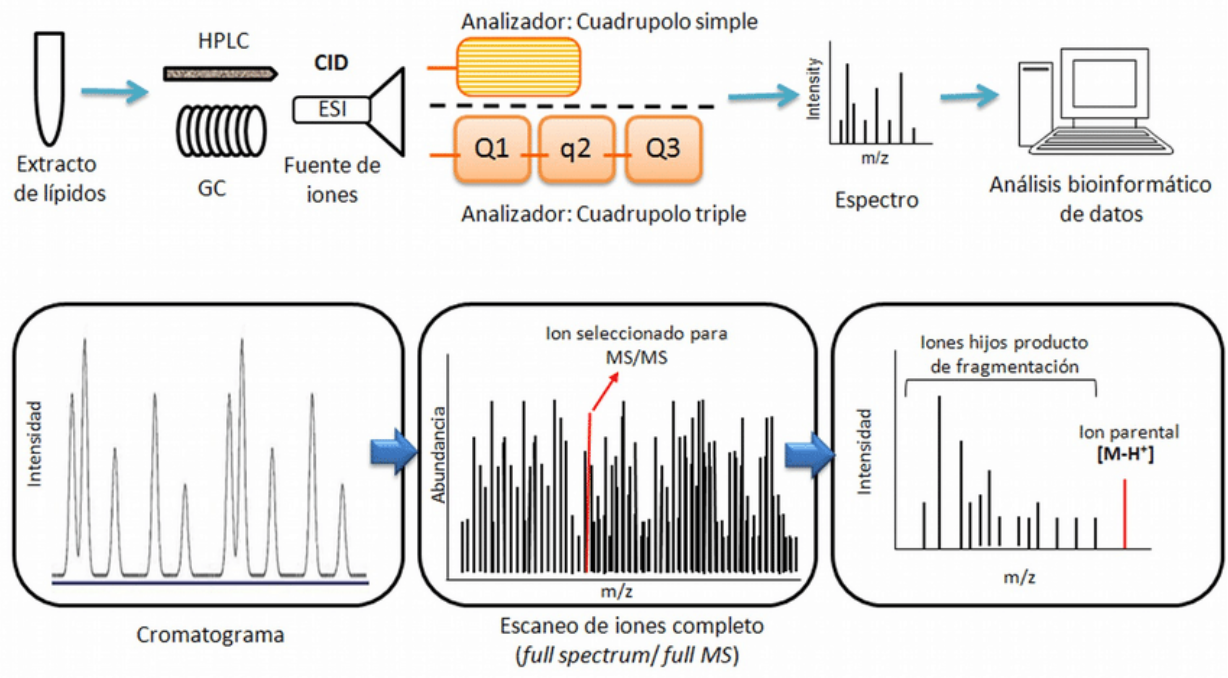

Figura 2. Fundamento de la técnica de espectrometría de masas
Fuente de la imagen:Carolina Bagnato. Análisis Estructural y Funcional de Macromoléculas, Chapter: 10. 2013.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Bagnato Carolina. Análisis Estructural y Funcional de Macromoléculas, Chapter: 10. 2013.
- David Drissner and Florian M. Freimoser. MALDI-TOF mass spectroscopy of yeasts and flamentous fungi for research and diagnostics in the agricultural value chain. Drissner and Freimoser Chem. Biol. Technol. Agric. (2017) 4:13.
- http://blog.analitek.com/espectrometria-de-masas-ms-fundamento-y-equipos-de-tecnologia-avanzaca-0-1.
- Huang, Angela et al. (2013) Impact of Rapid Organism Identification via Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of Flight Combined With Antimicrobial

Stewardship Team Intervention in Adult Patients With Bacteremia and Candidemia. *Clinical Infectious Diseases*, 57(9), pp.1237–1245.

- Joaquín Abián, Montserrat Carrascal, Marina Gay. Introducción a la Espectrometría de Masas para la caracterización de péptidos y proteínas en Proteómica. Laboratori de Proteòmica CSIC/UAB, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona IIBB-CSIC, IDIBAPS, Barcelona Proteómica, Número 2, Diciembre 2008.

- Pomilio, Alicia Beatriz; Bernatené, Eduardo Alberto; Vitale, Arturo Alberto. Espectrometría de masas en condiciones ambientales con ionización por desorción con electrospray Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, vol. 45, núm. 1, marzo, 2011, pp. 47-79.

- Robin Patel. A Moldy Application of MALDI: MALDI-ToF Mass Spectrometry for Fungal Identification. J. Fungi 2019.

- www.creative-proteomics.com

PREGUNTAS

1. ¿Por qué es usado diferentes mecanismos de ionización en la espectrometría de masas?

2. Si se quiere estudiar el contenido de aminoácidos presentes en las proteínas, que técnica de separación utilizaría y si es necesario usar espectrometría de masas o no y explique por qué?

3. ¿Qué diferencia existe entre la espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear?