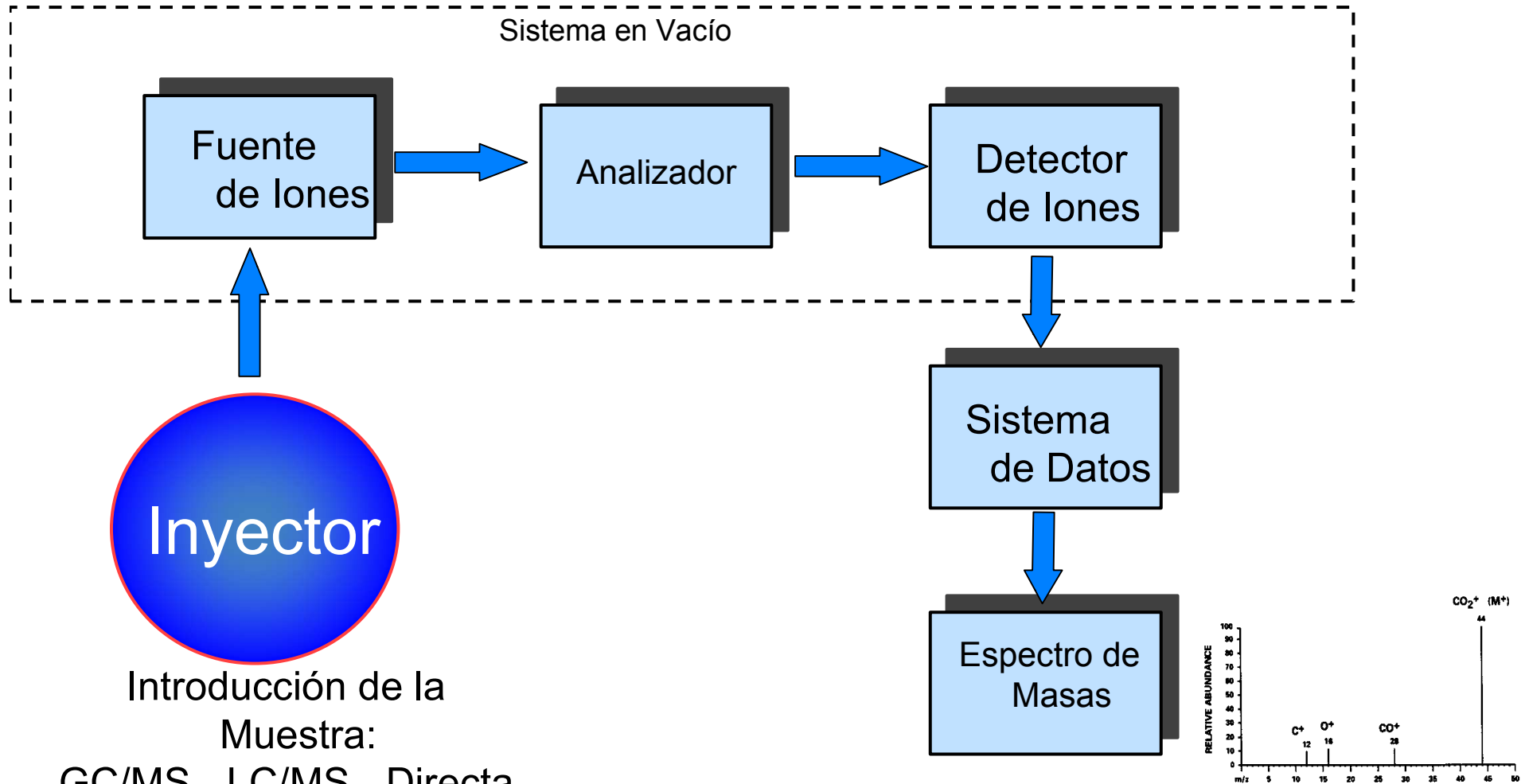


Seminario de Espectrometría de masas para usuarios del SUIC

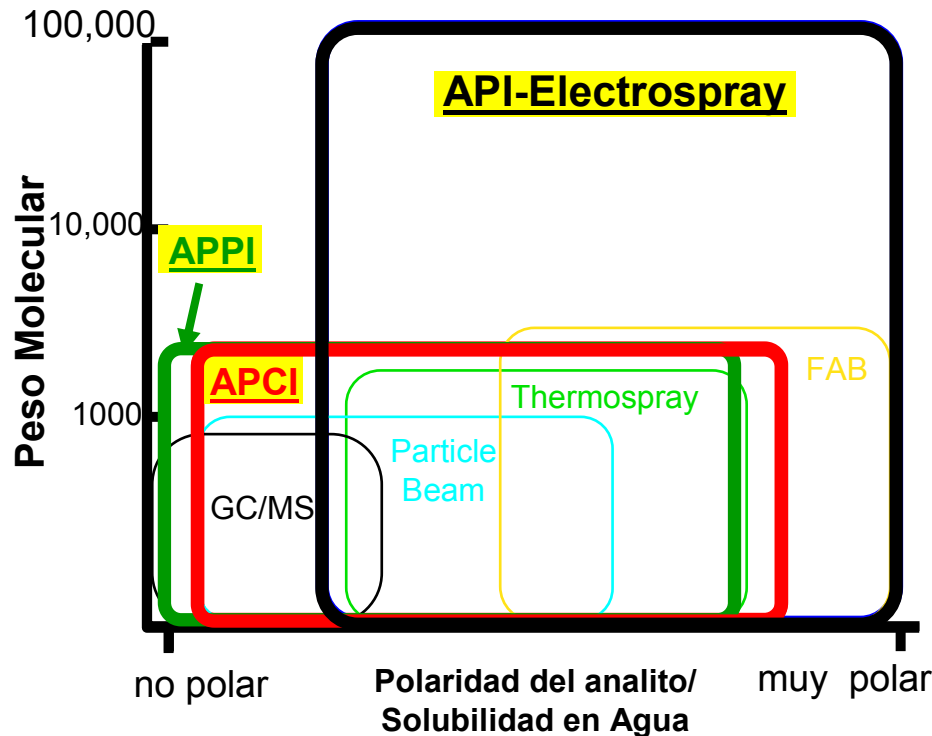
→ La espectrometría de masas es una técnica analítica muy potente usada para:

- **Identificar compuestos desconocidos.**
- **Cuantificar materiales conocidos.**
- **Elucidar la estructura química de las moléculas.**

Diagrama de un Espectrómetro de Masas



Aplicabilidad Relativa de las Técnicas de Ionización en LC/MS



**Las interfases LC/MS tipo A.P.I.:
Electrospray /APCI
son hoy en día las más utilizadas**

API-Electrospray (LC y CE):

- La técnica de ionización más suave.
- **Ideal también para compuestos lábiles.**
- Interfase con mayor sensibilidad y aplicabilidad.
- Válida para compuestos de baja-media a muy **alta polaridad que se puedan ionizar en solución.**
- Mediante la formación de **iones con múltiples cargas**, permite el análisis de compuestos de muy elevado peso molecular.

APCI (LC):

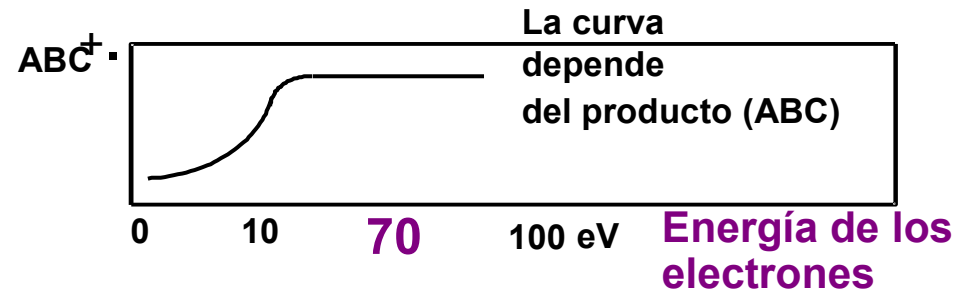
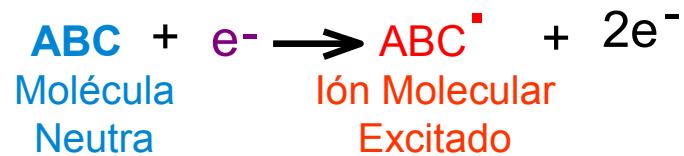
- Válida para compuestos de baja a alta polaridad; no se requiere que estén ionizados en solución.
- **Requiere compuestos con una cierta volatilidad.**
- **Buena sensibilidad para compuestos de polaridad y peso molecular intermedios.**
- Técnica que complementa a API - Electrospray para el análisis de analitos poco polares.

APPI (LC y CE):

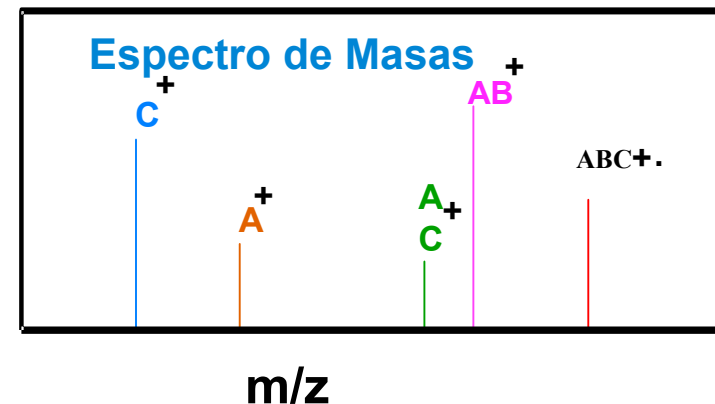
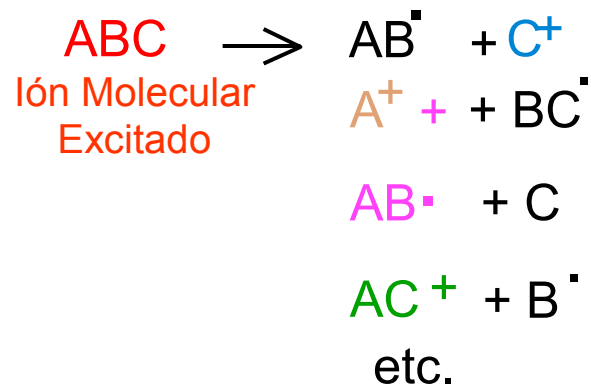
- Válida para compuestos de muy baja a alta polaridad; no requiere que estén ionizados en solución.
- Requiere compuestos con una cierta volatilidad.
- Posibilita el **análisis de compuestos apolares.**

Proceso de Ionización por Impacto Electrónico (EI)

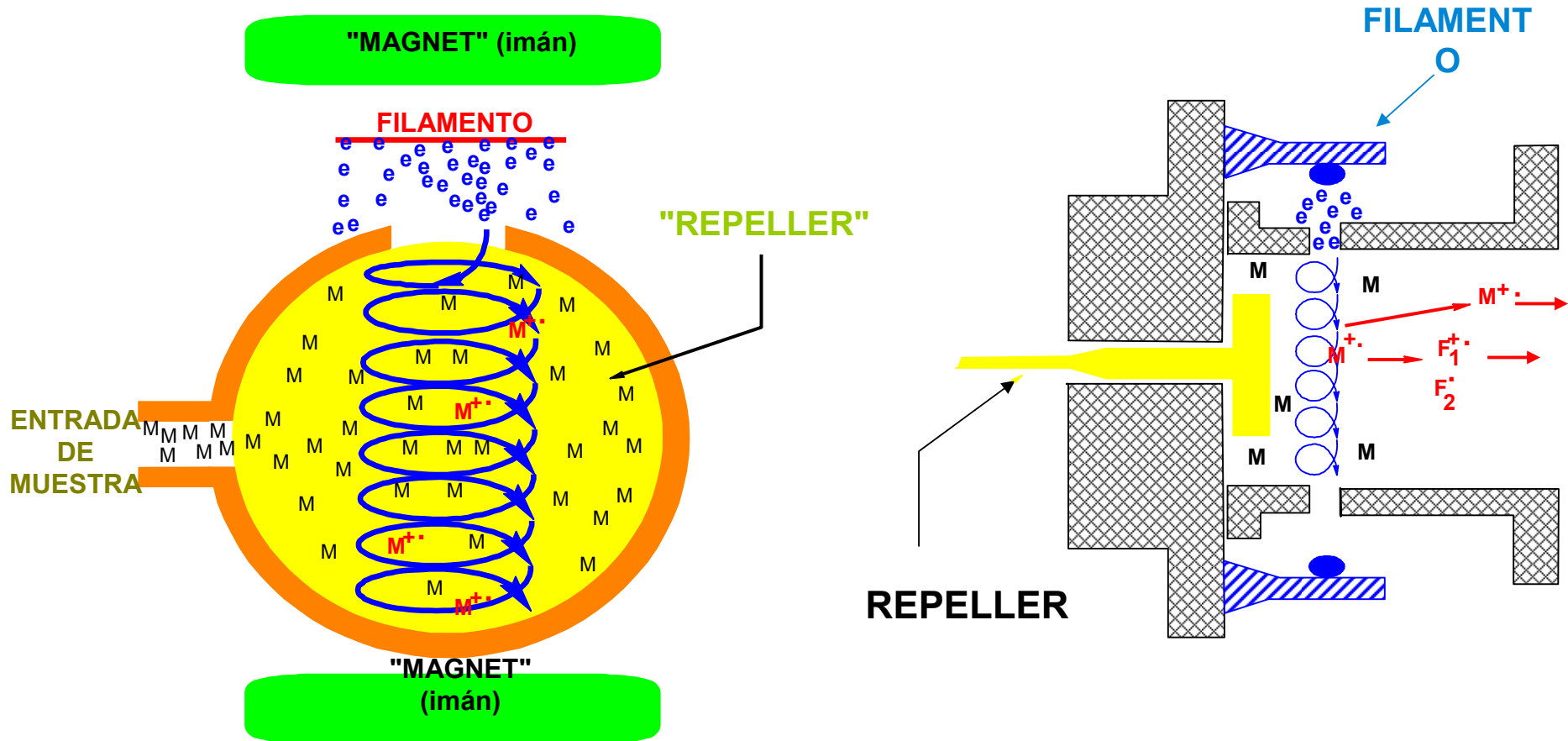
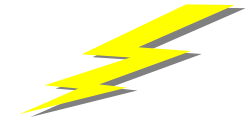
Ionización: +



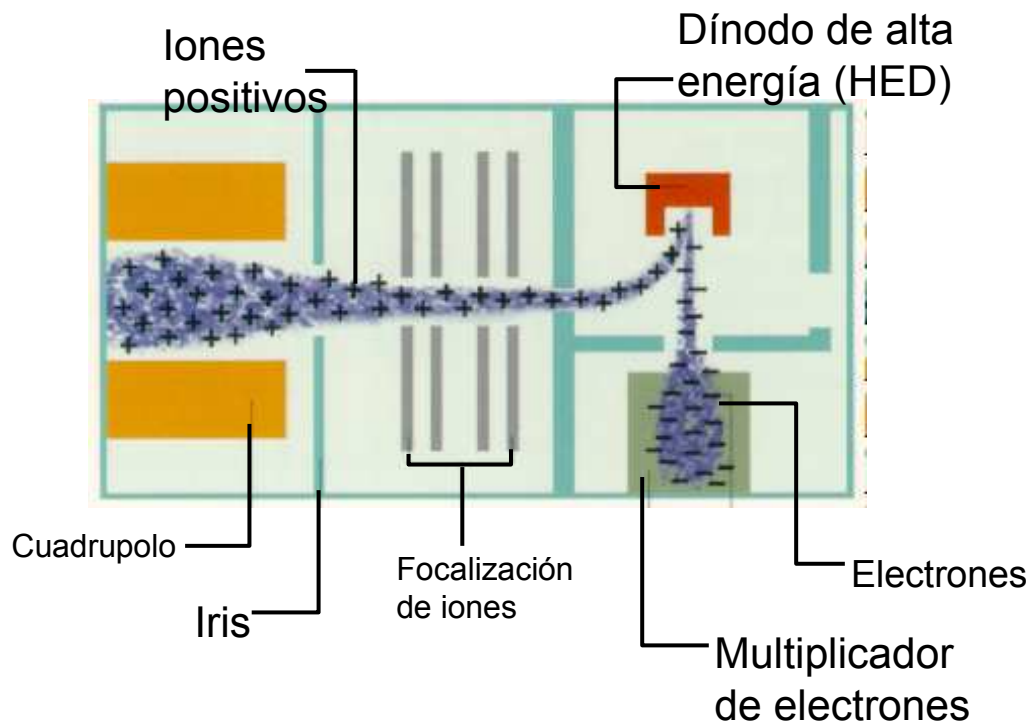
Fragmentación:



Detalle de la Ionización por Impacto Electrónico



Detector de Iones: Electromultiplicador

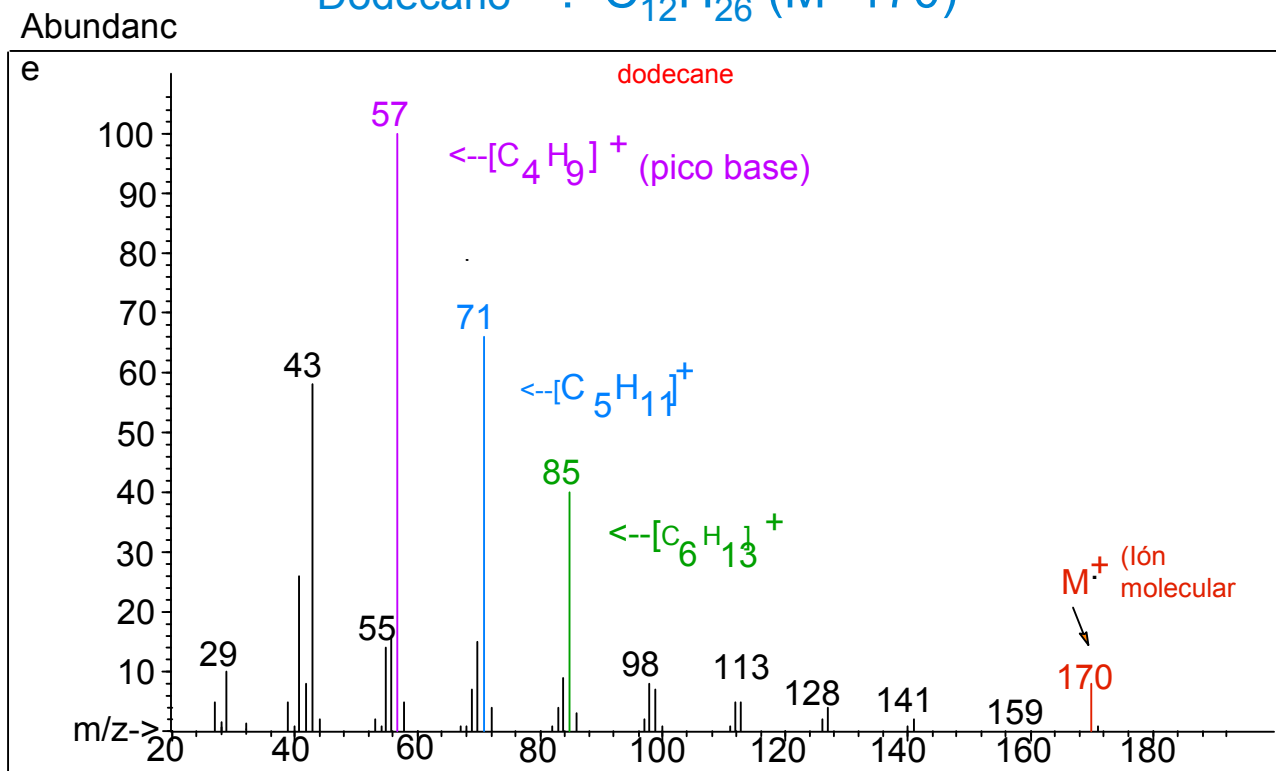


- **HED:** Aumenta la vida del electromultiplicador en 2 ó 3 veces puesto que a éste le llegan electrones en vez de iones y le permite más bajos voltajes de trabajo, además mejora la sensibilidad de todo el sistema.

- Los electromultiplicadores (EM) son capaces de aumentar la corriente por un factor de 1,000,000 pero el rango de trabajo típico es de 100,000.
- El tamaño de la señal (y ruido) es función del voltaje del EM, cuanto mayor es el voltaje mayor es la señal. La relación NO es lineal en lo que respecta al voltaje o m/z.
- El EM tiene un tiempo de vida finito. Este tiempo de vida es función de la corriente de salida, cuanto mayor es ésta, menor es el tiempo de vida del EM.

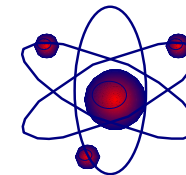
Típico Espectro de Masas

Dodecano : $C_{12}H_{26}$ (M=170)

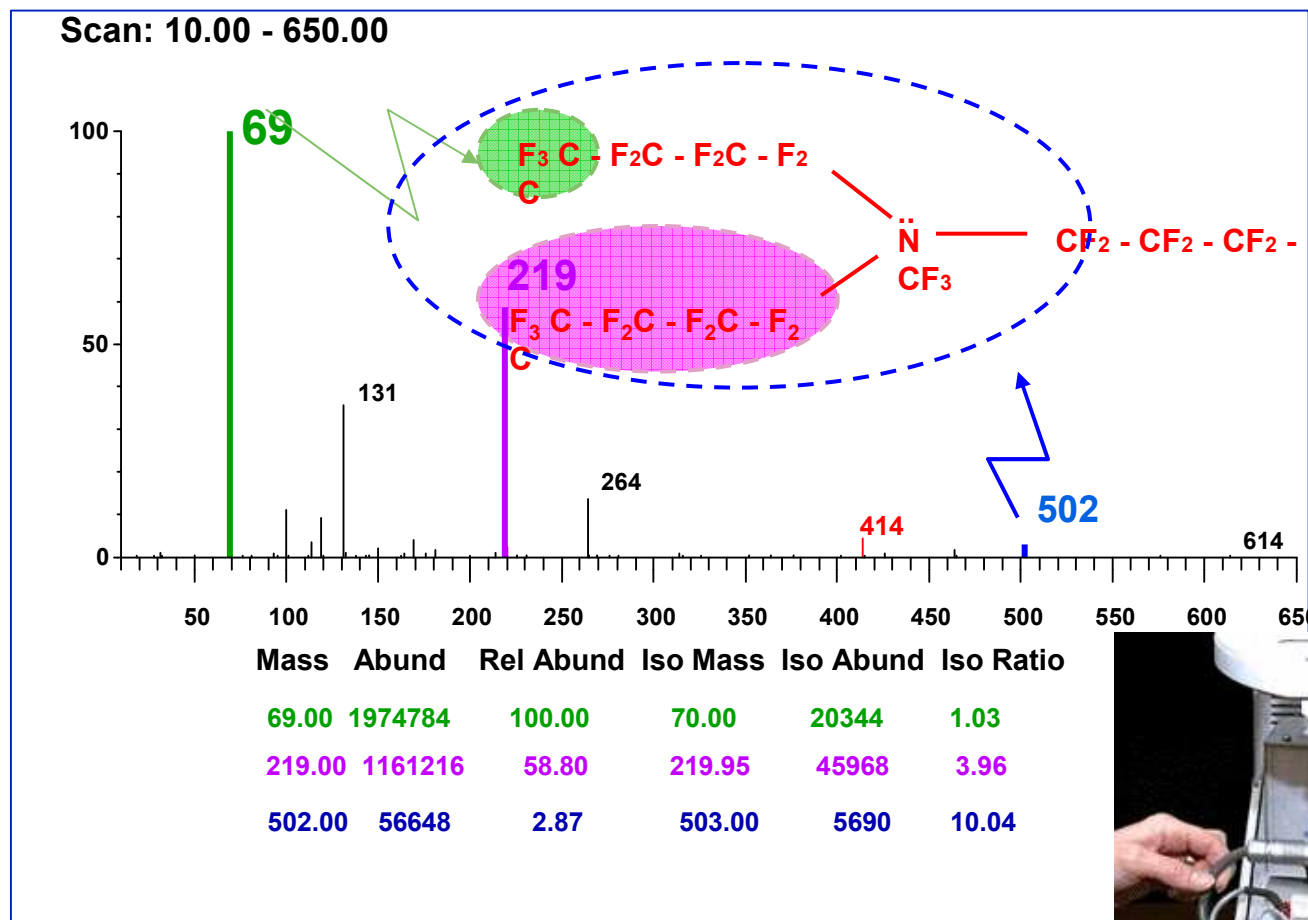


- Ión Molecular (M^+): pérdida de un electrón
- Pico Base: ión más abundante del espectro

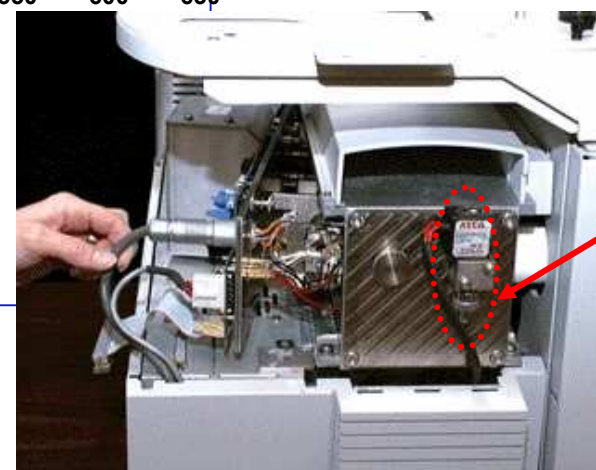
Sintonizado MS con PFTBA



Espectro Perfluorotributilamina (PFTBA: C₁₂F₂₇N PM:671)



Vial/Electroválvula
para introducción
vapores de solución
de sintonizado:
PFBTA



Informe Sintonizado Automático

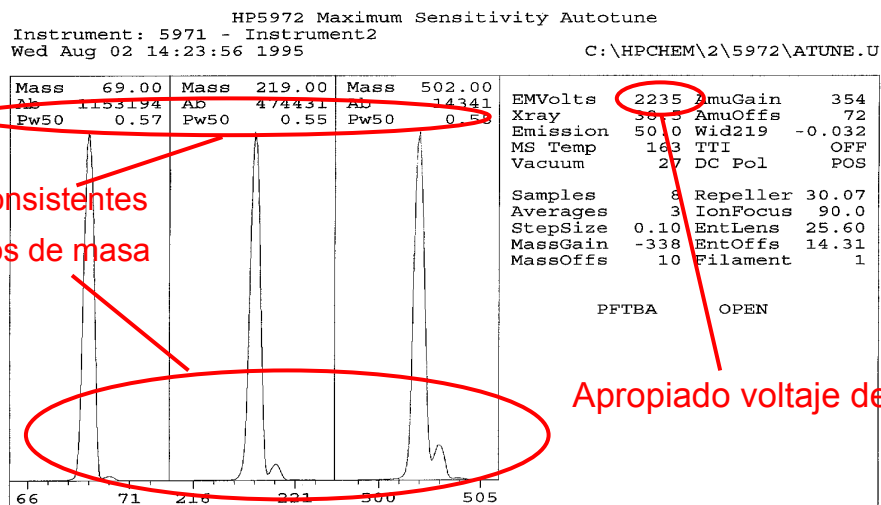


→ Aspectos a controlar

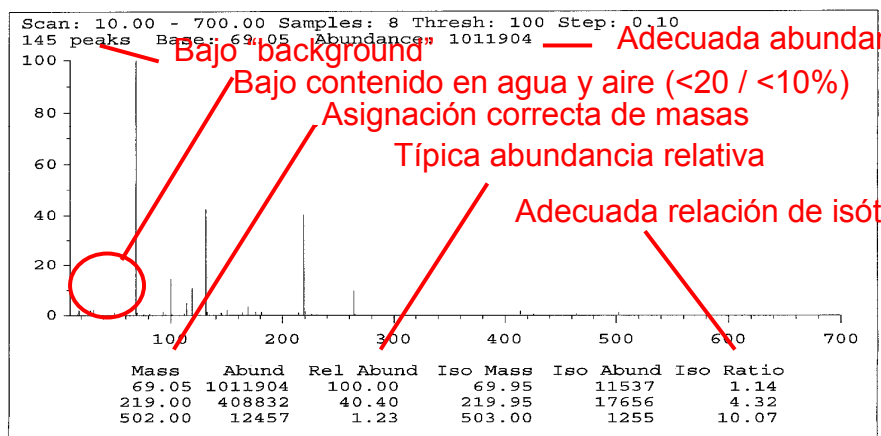


Anchos de pico de masa consistentes
Perfiles simétricos de los picos de masa

El chequeo automático que se obtiene después del sintonizado revisa todos estos aspectos a controlar



Apropiado voltaje del EM



Bajo "background" Adecuada abundancia absoluta

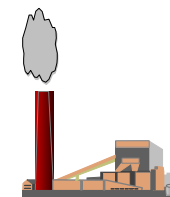
Bajo contenido en agua y aire (<20 / <10%)

Asignación correcta de masas

Típica abundancia relativa

Adecuada relación de isótopos

Iones típicos procedentes de contaminación y background



MASSES	COMPOUND GENERAL CLASSIFICATION	POTENTIAL COMPOUND SOURCE
18, 28, 32, 40, 44	AIR	H ₂ O, N ₂ , O ₂ , Ar, CO ₂
18	CLEANING SOLVENTS	WATER
31	-	PRIM. ALCOHOL (METHANOL)
77	-	BENZENE OR XYLENES
91, 92	-	TOLUENE
105, 106	-	XYLENES
15, 43, 58	-	ACETONE
85	-	FREONS
73, 147, 207, 221	DIMETHYL-	SEPTUM OR STATIONARY
281, 295, 355, 429	POLYSILOXANE	PHASE
41, 43, 55, 57, 68, 69, 76, 77	HIDROCARBON	FINGERPRINTS, MECHANICAL
71, 85, 99		PUMP OIL
149	PHTHALATES	PLASTICIERS IN TUBING,
94, 168, 170, 186, 262, 278, 354, 446		DIFFUSION PUMP OIL

Para reducir “background” (H₂O, N₂, O₂,...) es útil empezar los bárridos desde masa 29 o 33

Modalidades de Ionización: Impacto Electrónico (EI)

¿Qué es un Espectro EI clásico?

Metil estearato ($C_{19} H_{38} O_2$)⁺ M = 298

Ión (M+1)⁺ = 299

Contribución isotópica del carbono:

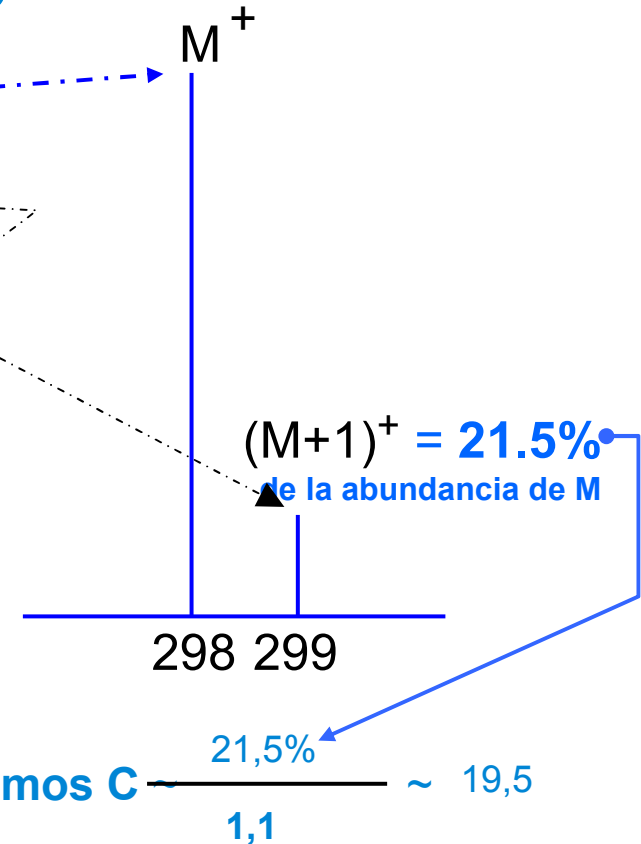
$$C_{19} \times 1.1\% \text{ de } C_{13} = 20.9\%$$

Contribución isotópica del deuterio:

$$H_{38} \times 0.015\% \text{ de } D = 0.6\%$$

Contribución isotópica total = 21.5%

Los espectros clásicos de EI deben proporcionar picos isotópicos con relaciones respecto al ion molecular muy cercanas a los valores teóricos.



Ayudas en la interpretación de espectros

- M = impar indica la presencia de un nº impar de átomos de N
- M = par indica la ausencia o presencia de un nº par de átomos de N

Modalidades de Ionización en GC/MS

- **Impacto Electrónico (EI)**

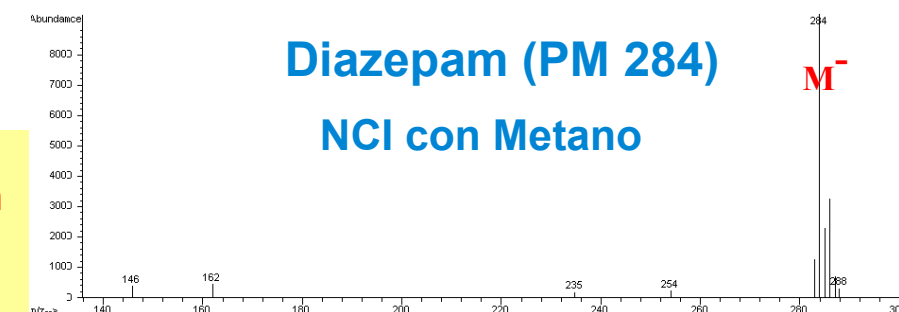
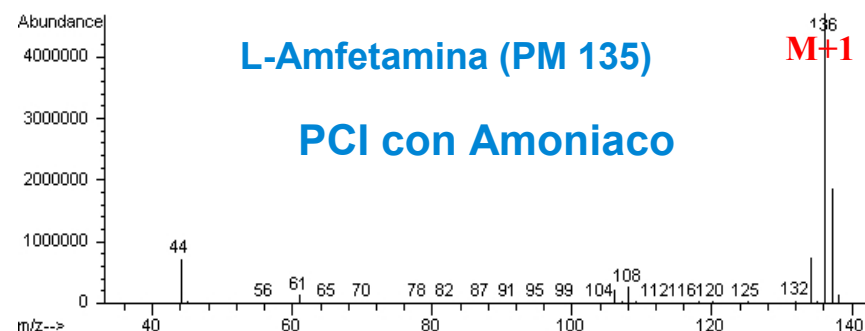
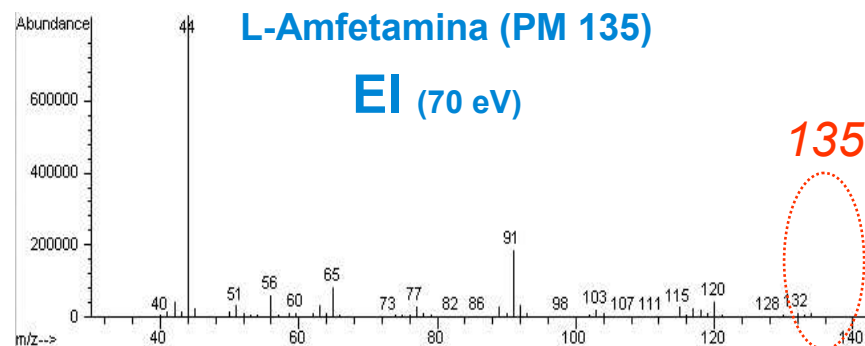
Es con diferencia **la modalidad más utilizada**. Es la empleada para **búsquedas en Bibliotecas genéricas de espectros**

- **Ionización Química Positiva**

- **Ionización Química Negativa**
NCI es la más selectiva y sensible

EI: técnica de ionización muy ENERGÉTICA. FRAGMENTA LA MOLECULA y en ocasiones el ión molecular apenas se detecta

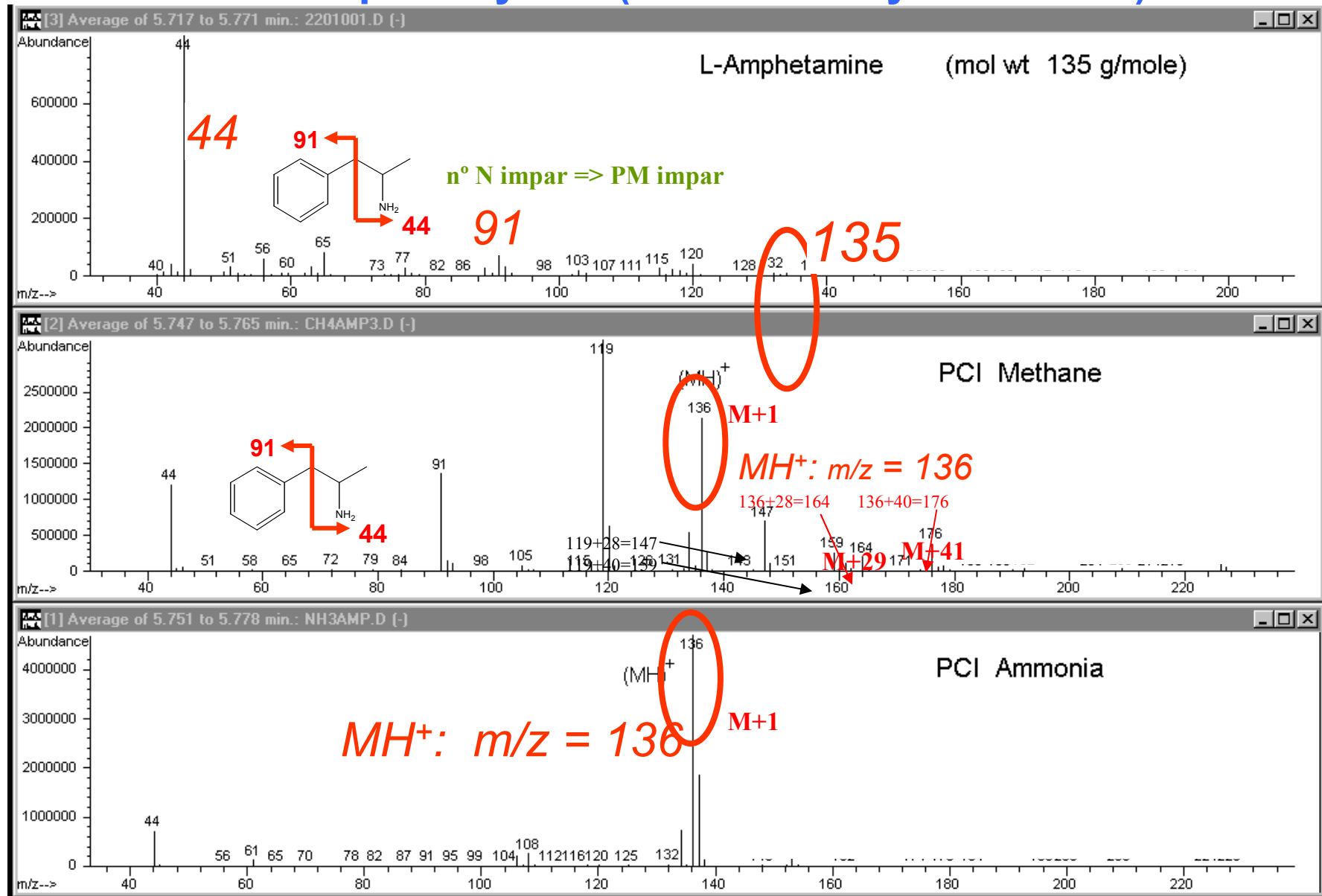
CI/NCI: técnica de ionización muy SUAVE. Apenas Fragmenta la molécula y el IÓN MOLECULAR SUELE SER EL PICO BASE



Ionización Química

- Forma **iones a partir del “gas reactivo”** por bombardeo con electrones.
- Los iones del gas reactivo sufren reacciones con moléculas de la muestra produciéndose iones de la misma
- La ionización química (CI) es **mucho más suave que la ionización por impacto electrónico (EI)**, por lo que se **produce menos fragmentación**.
- El **gas reactivo más común es el metano**, que produce iones con prácticamente cualquier molécula de muestra.
- Otros gases reactivos (isobutano, amoníaco) son más selectivos y producen incluso menos fragmentación.
- Es una técnica que en modo negativo da muy alta sensibilidad.
- Es el método más frecuentemente utilizado para determinar pesos moleculares de compuestos.
- Con **metano se forma: M+1, M+29; M+43. Muy útil para asegurar M.**
- Con **amoníaco se suele formar el M+1 y el M+18. Es muy selectivo (aminas).**
- Con isobutano sólo suele obtenerse el M+1.

Amfetamina por EI y PCI (con Metano y Amoniaco)

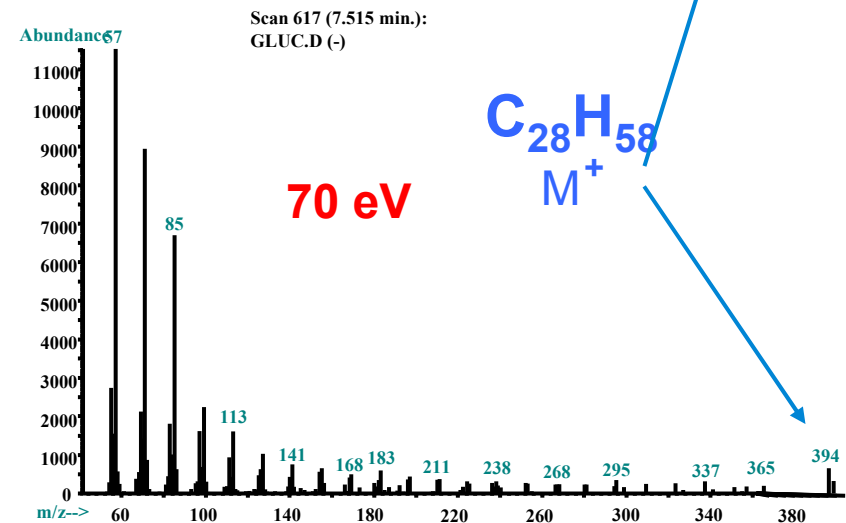
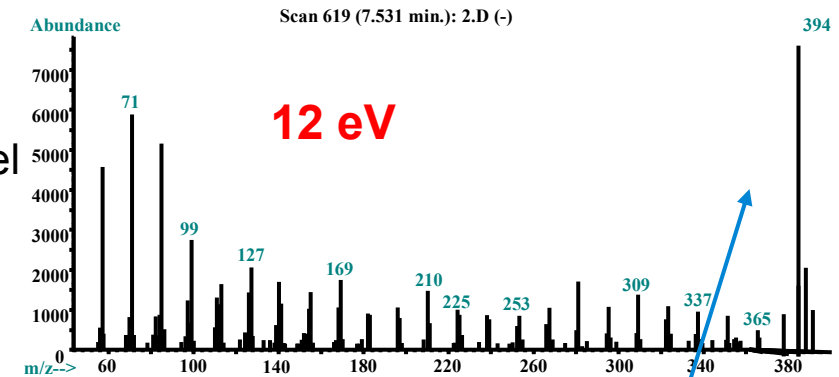


Voltaje de Ionización Variable (5-240 eV)

Beneficios:

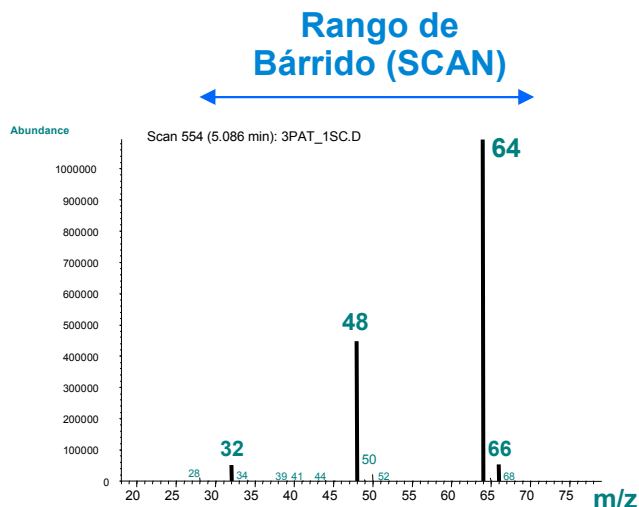
- Los voltajes pequeños proporcionan una menor fragmentación general y por otro lado incrementan el ion molecular en relación a la ionización estándar a 70eV
- Los voltajes pequeños proporcionan ionización selectiva [ej...: aromáticos en alcanos]
- Los voltajes altos con CI son también posibles y proporcionan una mayor sensibilidad

La reducción del eV facilita la localización del ión molecular



Modos Adquisición en GC/MS: modo SCAN

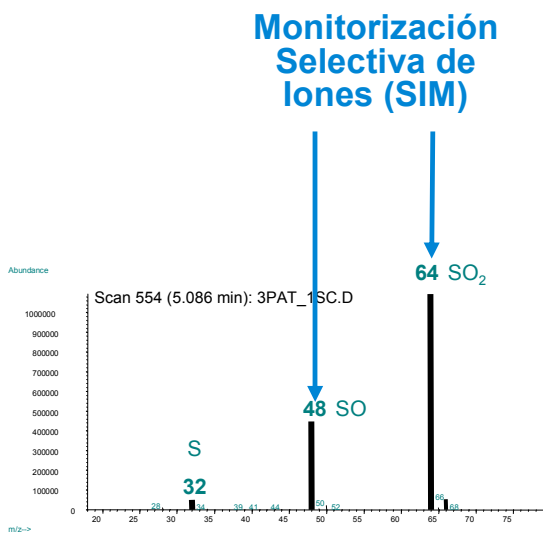
Modo SCAN: consiste en **hacer barridos entre dos masas** para tener una información total del contenido de la muestra a analizar. Es el modo a emplear en análisis cualitativo para la **identificación de compuestos por búsqueda en biblioteca** de espectros. También puede utilizarse para análisis cuantitativos.



- En modo SCAN el MSD es un **detector universal con una sensibilidad media cuando se trabaja con el TIC**, y muy **selectivo y con buena sensibilidad cuando se trabaja con iones extraídos EIC** (Extracted Ion Chromatogram).
- **TIC** (Total Ion Chromatogram): cromatograma correspondiente a la suma de abundancias a todas las masas adquiridas.
- **EIC** (Extracted Ion Chromatogram): cromatograma correspondiente a una determinada masa (extraída del barrido).
- La sensibilidad se incrementa con la reducción del rango de masas seleccionado.

Modos Adquisición en GC/MS: modo SIM

Modo SIM: consiste en una **monitorización selectiva de iones característicos** de los compuestos presentes en la muestra. En **modo SIM el MSD es un detector muy sensible y muy selectivo**. Es el modo a emplear para análisis cuantitativo de trazas de compuestos conocidos.



Se efectúa mediante una programación en el tiempo de grupos de los iones a adquirir

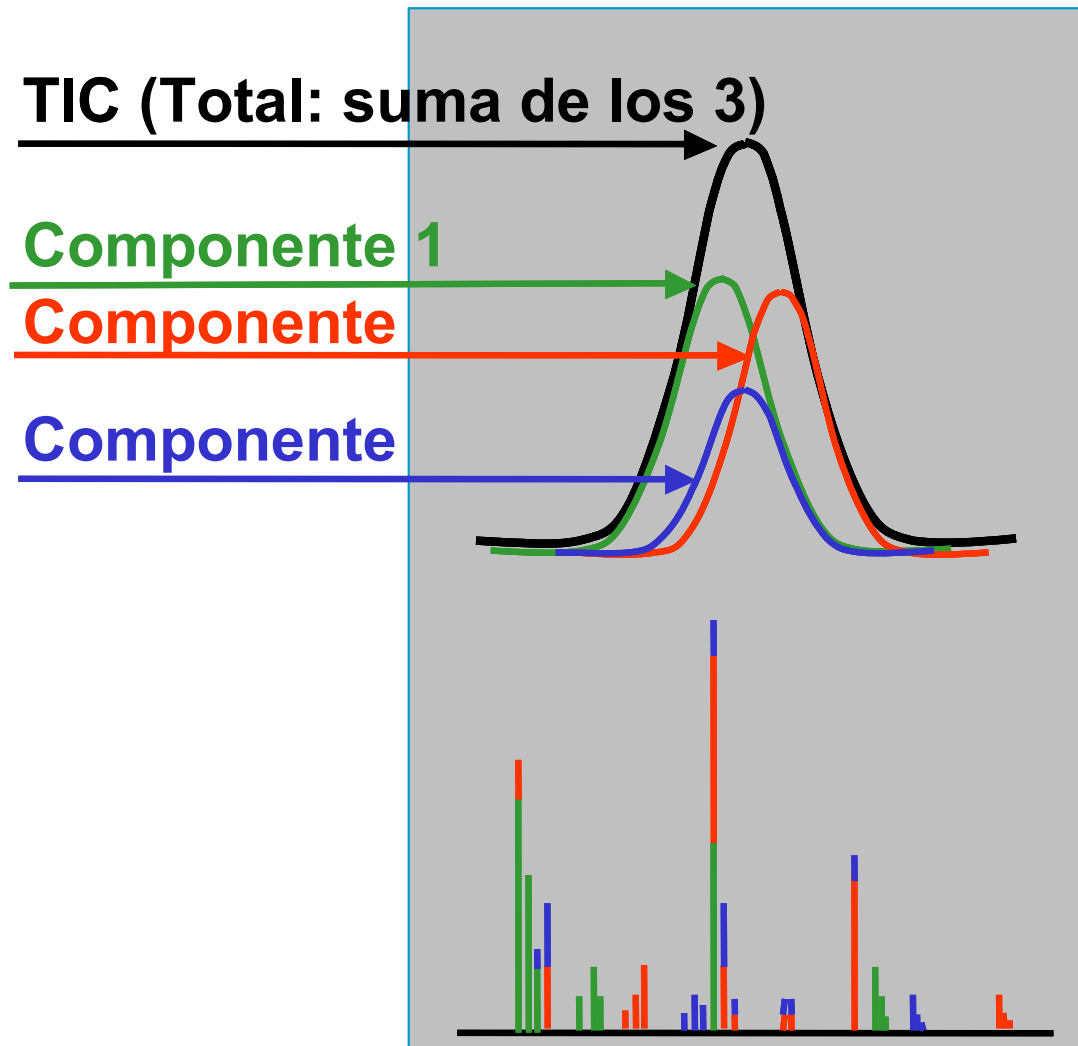
- La **comparación de las respuestas relativas de los distintos iones** (cualificadores), con respecto a las del patrón permite **confirmar la identificación** del compuesto cuantificado.
- La **sensibilidad se incrementa con la reducción del nº de masas** seleccionado y la selectividad con el aumento de la masa monitorizada.
- La gran selectividad del MSD permite poder **llegar a cuantificar compuestos que se coeluyan**.
- La modalidad SIM con cuadrupolo proporciona, especialmente a nivel de trazas, una mejor reproducibilidad cuantitativa que el modo SCAN, no obstante éste (scan) admite mayores concentraciones de analito.
- En modo SIM el TIC es el cromatograma correspondiente a la suma de abundancias de todas las masas adquiridas.

Adquisición SCAN "versus" SIM

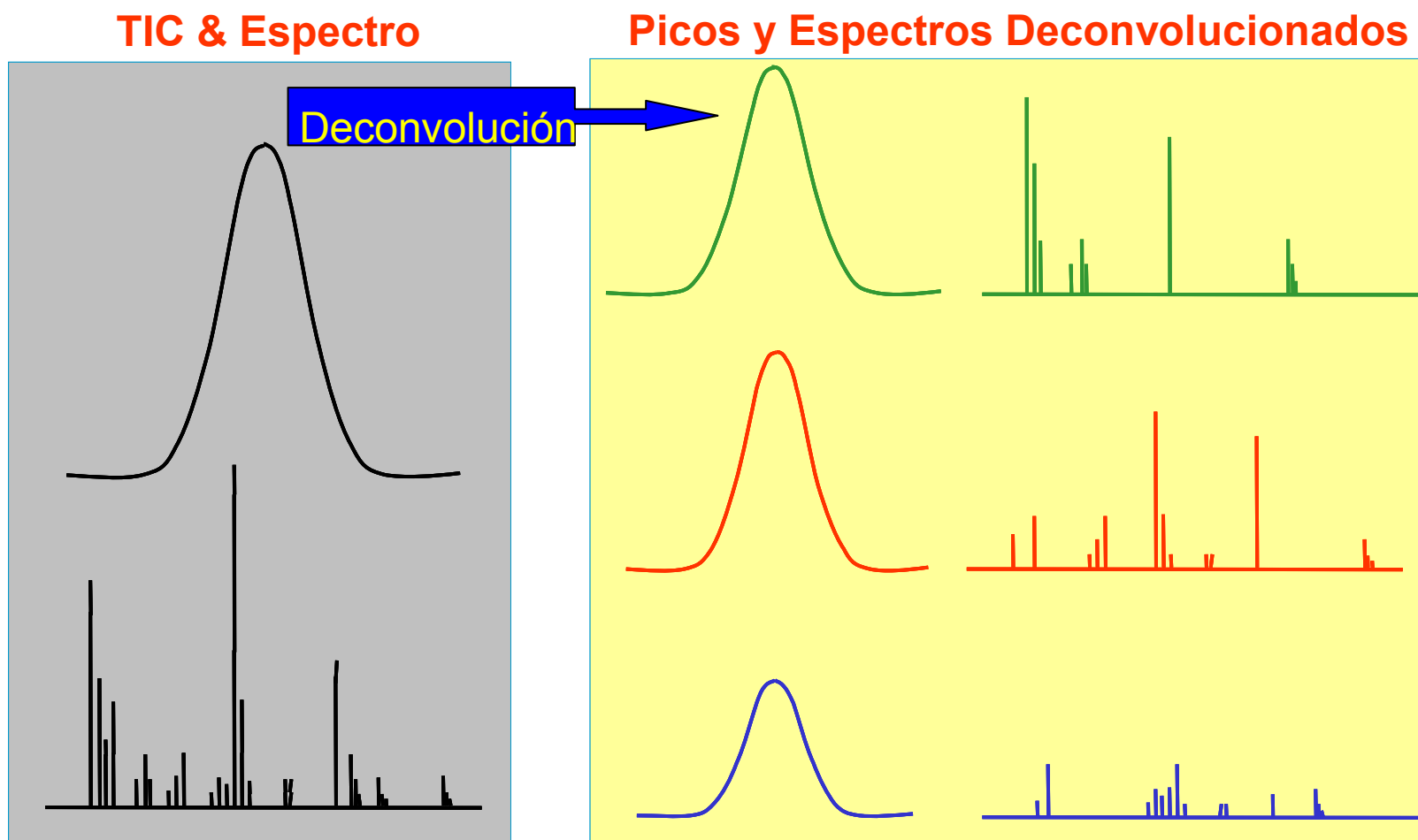
25 pg de 3 sulfamidas (+250 pg de sulfaclorpiridazina) - CUADRUPOLO



En Muestras Complejas 1 Pico (TIC) Suele Estar Formado por Varios Compuestos No Resueltos



Deconvoluciona y Extrae los Compuestos Individuales y sus Espectros



Consideraciones Prácticas en LCMS

Introducción Técnicas de Ionización a Presión Atmosférica Utilizadas en LC/MS



- Electrospray
- APCI
- MALDI

Las distintas fuentes de ionización son intercambiables entre los distintos equipos (si son de la misma marca, claro)

Consideraciones en la Conexión LC/MS

HPLC

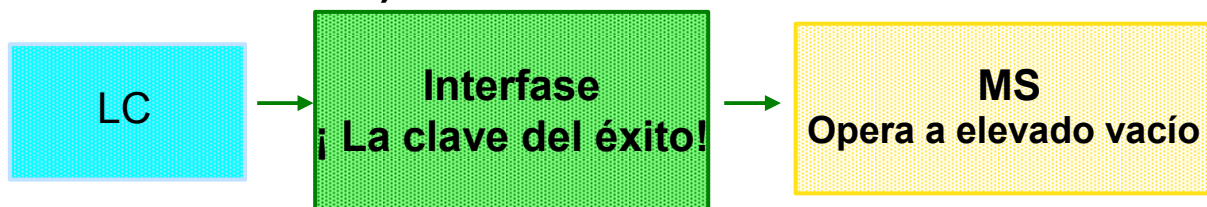
- Separación en fase líquida a alta presión
- Produce una alta carga de vapor
- Temperatura próxima a ambiente
- Sin límites en rango de masas
- Puede utilizar tampones no volátiles

MS

- Se necesita alto vacío
- Tolera una carga de gas limitada
- Opera a Temperatura elevada
- Depende de m/z y del tipo de filtro de masas
- Prefiere tampones volátiles

1 ml/min líquido →
(orientativamente)

1 litro/min vapor

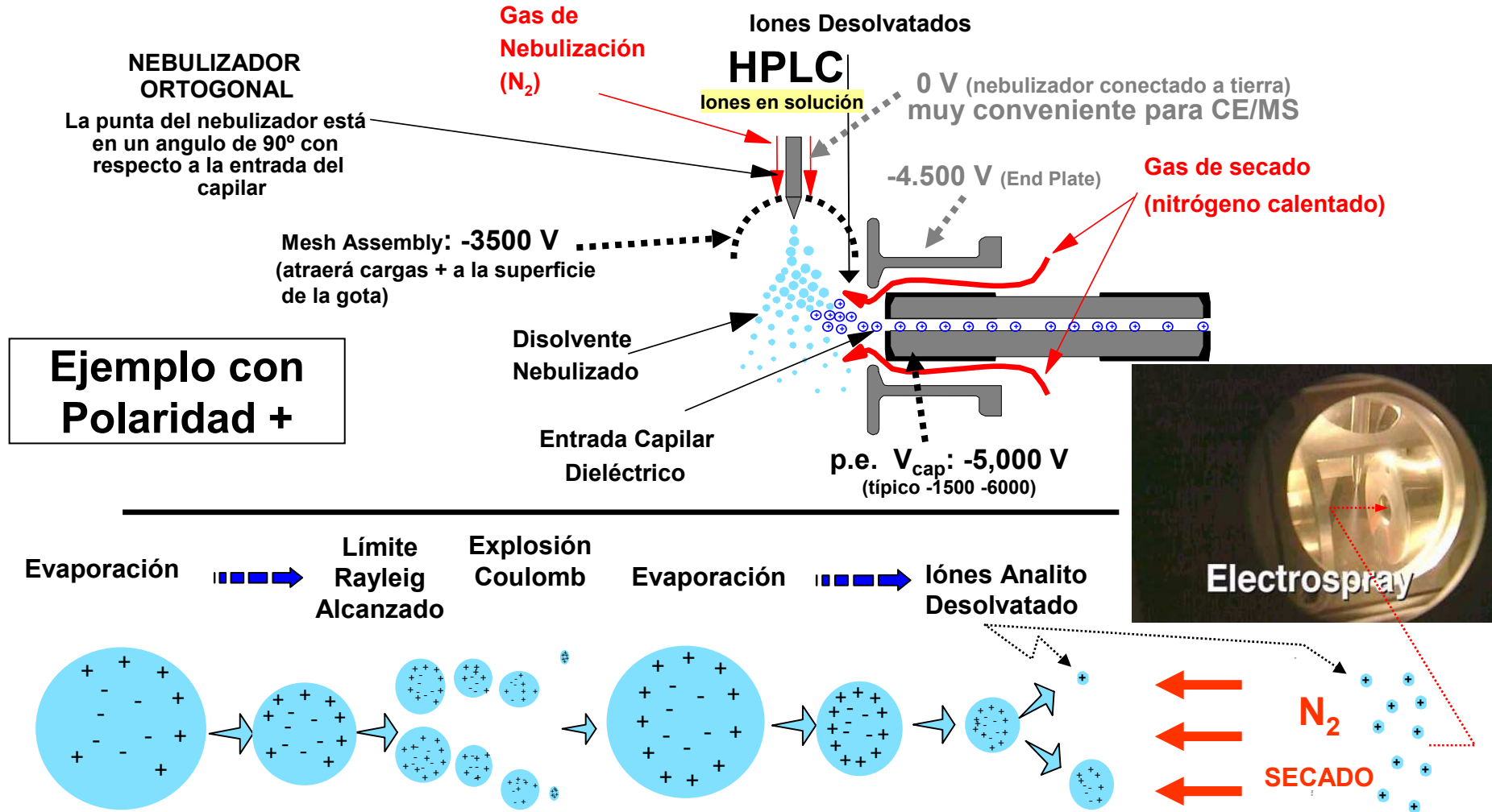


Interfases LC/MS: API-Electrospray / API-APCI/ APPI / FAB/ Termospray

Filtros MS: Cuadrupolo (Q) / Trampa Iones / QQQ / TOF /Q-TOF/Sector Magnético

Diseño de la Fuente de Iones Electrospray

La presencia de sales no volátiles dificultara considerablemente la eficiencia del proceso de desolvatación



- JOHN B. FENN CONSIGUIÓ EL NOBEL EN 2002 POR SU DESCUBRIMIENTO DEL ELECTROSPRAY

artículo discusión editar historial

John B. Fenn

John B. Fenn (15 de junio de 1917, Nueva York) es un químico y profesor universitario estadounidense galardonado con el Premio Nobel de Química del año 2002.

Biografía [\[editar\]](#)

Estudió química en el *Berea College*, donde se graduó el 1947. Se doctoró en Química por la Universidad de Yale en 1940, y desde 1952 se dedica a la docencia. Entre aquel año y 1967 fue profesor de química en la Universidad de Princeton, y después fue catedrático de Ingeniería Química en la Universidad de Yale entre 1967 hasta 1987, y actualmente ejerce como ingeniero de investigación en la Virginia Commonwealth University.

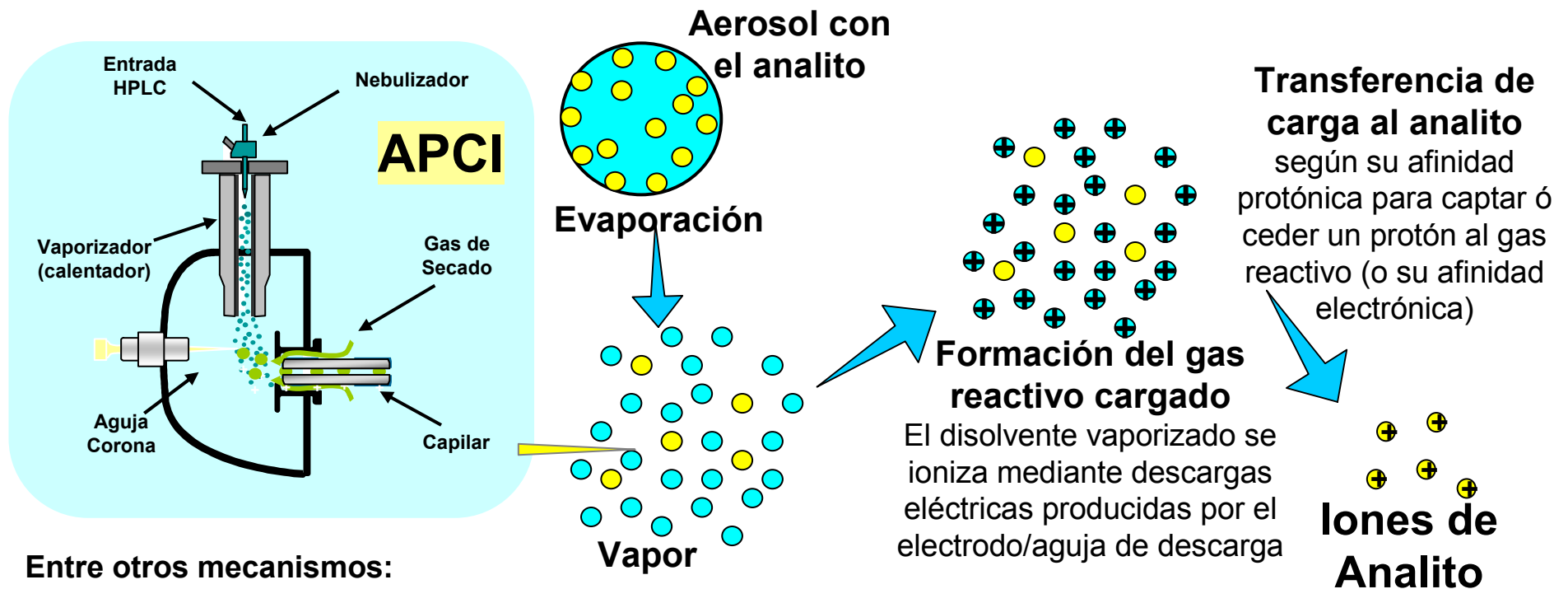


Investigaciones científicas [\[editar\]](#)

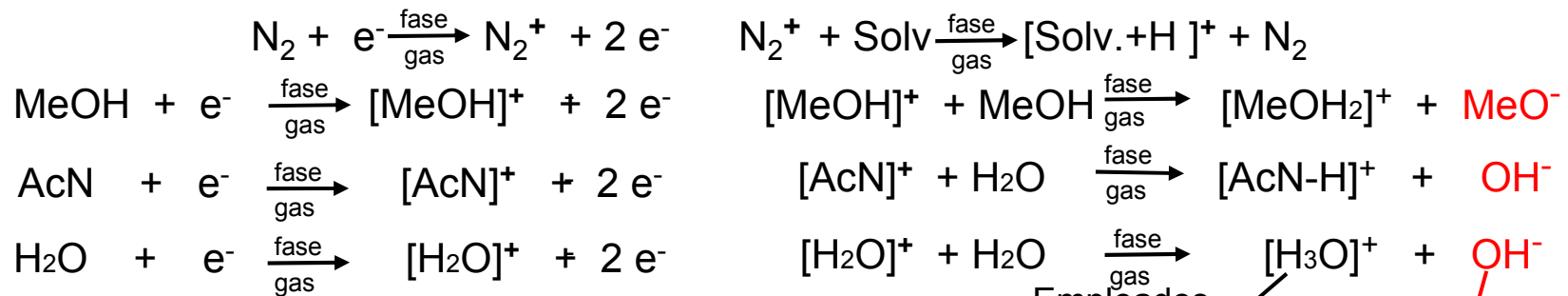
En 1988 publicó el método ESI (*Electro Spray Ionization*), una nueva técnica basada en la espectroscopia de masas que permite detectar y analizar proteínas. Este descubrimiento permitió comprender mejor los procesos vitales y aumentar rápidamente la velocidad con la cual los nuevos compuestos farmacéuticos complejos podrían ser evaluados, conduciendo directamente al desarrollo de las medicaciones para detener el avance del SIDA (inhibidores de proteasa) desarrollada en la década de 1990.

En 2002 compartió el premio Nobel de Química, junto con el japonés Kōichi Tanaka y el suizo Kurt Wüthrich, por el desarrollo de métodos de identificación y de análisis estructural de macromoléculas biológicas que han contribuido a una mejor comprensión de los procesos vitales.

Proceso APCI (Ionización Química)



Entre otros mecanismos:



Proceso APCI +
El analito CAPTA protones
del disolvente



Empleados
en **APCI** +
[Solv+H]⁺

Empleados
en **APCI** -

Criterios Selección Técnica Ionización

ELECTROSPRAY:

- Compuestos iónicos, o polímeros/biopolímeros que en disolución adquieren múltiples cargas (péptidos – proteínas - ...).
- Compuestos termolábiles con grupos funcionales ionizables en disolución, o de los que se pueden obtener sus sales sódicas (ESI-) o sus clorhidratos (ESI+)
- Técnicas que requieran trabajar a nano o microflujos

APCI / APPI:

- Compuestos NO termolábiles de media-baja polaridad y que contengan algún heteroátomo. Moléculas sin grupos funcionales ionizables.
- Preferencia por trabajar con fases móviles NO tamponadas
- “Necesidad” de trabajar con fases fuertemente tamponadas por necesidades cromatográficas. **(APCI/APPI toleran mayores concentraciones de tampón)**

En buena parte de los casos se podrán utilizar las 2 técnicas

Consideraciones Electrospray “versus” APCI

Electrospray:

- 1.- La **sensibilidad depende de la concentración de analito**; por ello admite flujos muy bajos (microbore /CE).
- 2.- El **pH de la fase móvil es crítico**. Con gradientes habrá que controlar pH en todos los canales (acidular/basificar también fases orgánicas).
- 3.- El **solvente orgánico de la fase móvil apenas afecta a la ionización**.
- 4.- **[Tampón volátil] < 25mM***
*Concentraciones elevadas pueden dificultar la evaporación/ionización por formación de par iónico
- 5.- **[Tampón no volátil]* <5-10mM**
*tampón no volátil dificulta la desolvatación/ionización (el fosfato la dificulta menos con polaridad negativa, pero ensucia más el detector).
- 6.- **Fácilmente forma aductos con Na y K**
 - Basta una concentración 25-100µM para una buena formación de aductos.
 - Los aductos con NH₄ son menos estables.
 - La formación de aductos dificulta la Fragmentación

APCI (/APPI):

- 1.- La **sensibilidad depende de la CANTIDAD de analito**; por ello no convienen flujos muy bajos
- 2.- El **pH de la fase móvil NO es crítico**. No requiere del empleo de tampones
- 3.- El **solvente orgánico de la fase móvil afecta mucho a la ionización**.
Metanol o Acetona (y aún más el agua) mejor que Acetonitrilo
- 4.- **[Tampón volátil] < 100mM**
- 5.- **[Tampón no volátil] <5-10mM**
- 6.- **No forma aductos con Na y K. Si los puede formar con NH₄**

Consideraciones Prácticas en LCMS

Consideraciones en la Selección de Eluyentes y Tampones para LC/MS



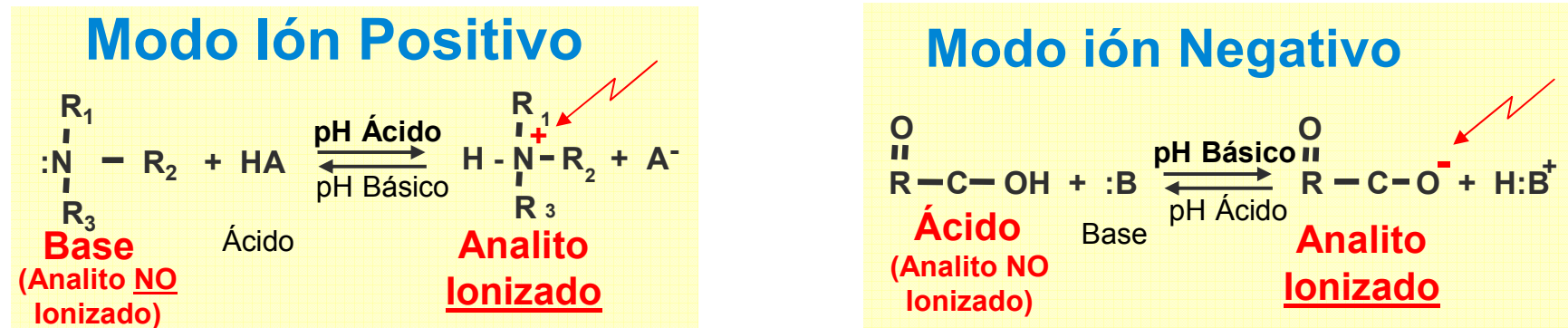
Influencia de:

- pH
- Concentración y Volatilidad del tampón

Consideraciones Varias: Típicos en LC/MS

- Supresión de la Ionización por formación par iónico fuerte
- Iones típicos de "Background"
- Adaptación de un método de HPLC a LC/MS

Influencia del pH en LC/MS con Electrospray



pH	Comp. Básicos	Comp. Ácidos
pH=pK+2 (pH básico)	1% ionización	99% ionización
pH=pK+1	10% ionización	90% ionización
pH=pK	50% ionización	50% ionización
pH=pK-1	90% ionización	10% ionización
pH=pK-2 (pH ácido)	99% ionización	1% ionización

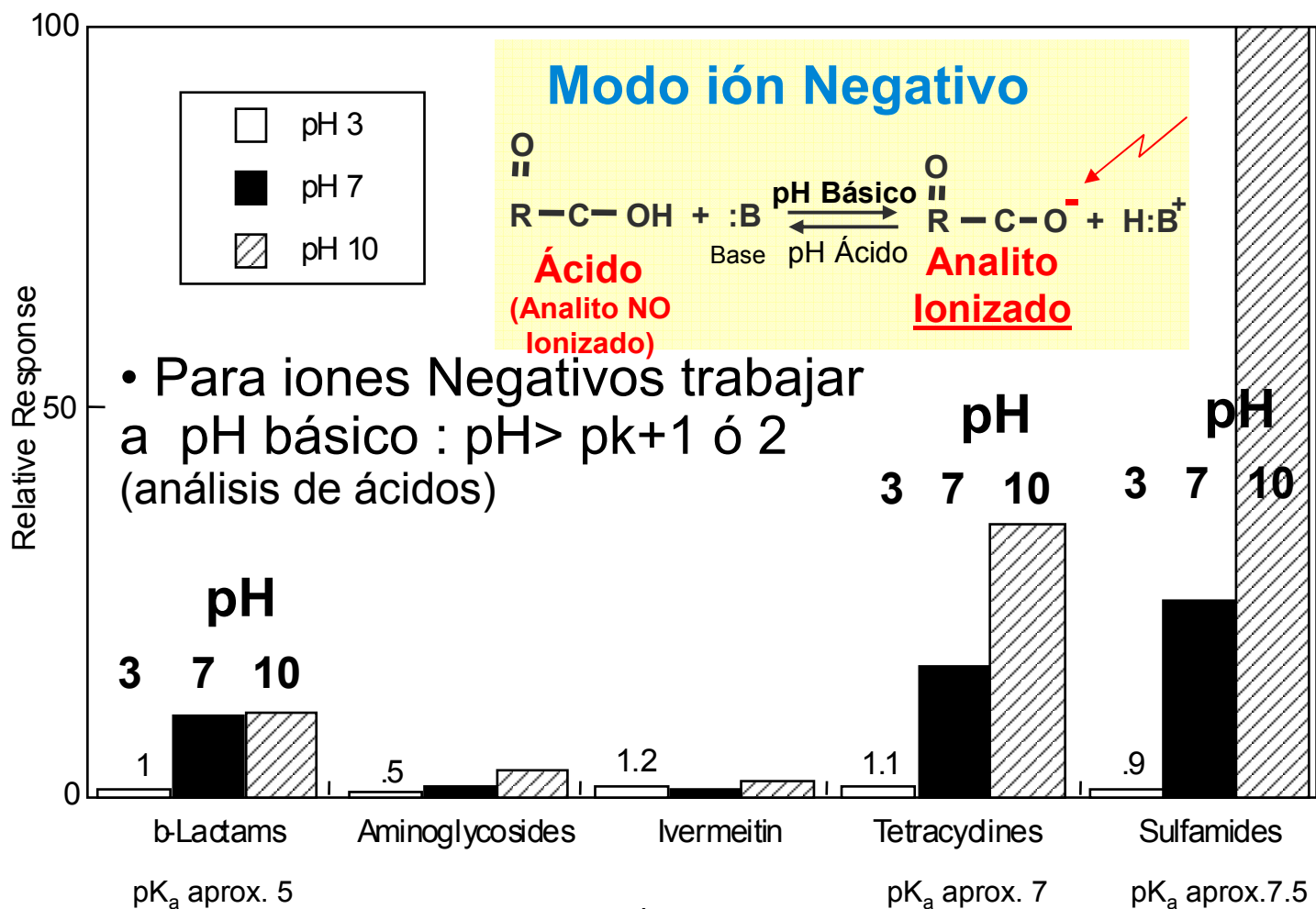
• Para Óptima Sensibilidad con Electrospray trabajar:

pH (básico) > pK + 1 para Ácidos en modo negativo

pH (ácido) < pK - 1 para Bases en modo positivo

• Para una buena repetibilidad de la respuesta obtenida en Electrospray y de los tiempos de retención será especialmente importante un buen control del pH de la fase móvil, cuando éste sea próximo al pK_a (+/-1) de alguno de los analitos, dada la gran variabilidad en su grado de ionización en esta zona

Influencia del pH en la Detección de Iones Negativos mediante Electrospray (ESI)



Tampones Típicos para API-ES y APCI

Modo ión positivo (uso pH < 7.0; <5 preferido)

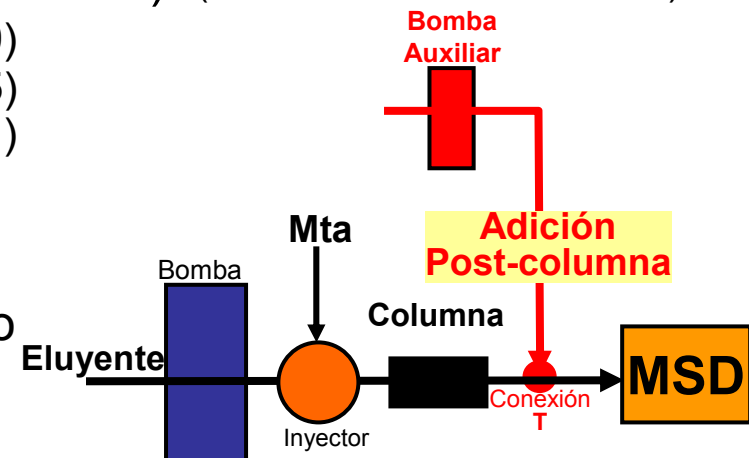
- Ácido acético (rango pH 3.8-5.8)
- Ácido fórmico (rango pH 2.8-4.8)
- (Ácido trifluoroacético (TFA) (rango pH 1.5-2.5))
(no recomendable – usar mínima concentración posible de TFA)

Modo ión negativo (pH > 7.0; 9 preferido)

- Hidróxido amónico (rango pH 8.2-10.2) (o formiato/ acetato amónico)
- Trietilamina (TEA) (rango pH 10.0-12.0)
- Dietilamina (DEA) (rango pH 9.5-11.5)
- Piperidina (rango pH 10.1-12.1)

Consideraciones Varias:

- La **adición post-columna de ácido o base permite ajustar el pH** si el proceso cromatográfico necesita otro de diferente.



- Los **tensoactivos pueden interferir en la evaporación**. Los reactivos de **par iónico suelen producir un elevado background**, si se requieren utilizarlos volátiles como tributilamina (TBA) o ácido heptafluorobutírico (HFBA). La formación de un **par iónico fuerte puede suprimir la ionización del analito**.

Iones más Típicos como "Background"

Iones	Modo	Procedencia
64	ES +	Acetonitrilo + Na
102	ES +	Trietilamina (se absorbe en teflón y plástico del HPLC)
113	ES -	TFA
116	ES + ó -	Contenedor de calibrante
145,147	ES +	Acetonitrilo + Cu (proviene del acero del sistema)
149, 391, 419, 413	ES + ó -	Ftalatos (contenedores de dtes., N2, filtro de gases...)
331	ES +	Polietilén propileno

Para evitar contaminaciones "persistentes" de aditivos utilizados anteriormente, se recomienda **reservar un canal** (y material de vidrio: botellas – matraces-...) **para utilizar con aditivos "problemáticos"** (TEA / aminas / TFA / ...) que queden adsorbidos

Adaptación de un Método HPLC a LC/MS

ELECTROSPRAY

- Sustitución de tampones no volátiles por tampones volátiles
- La concentración de tampón volátil deberá ser < 10 mM
- Si ha de emplearse tampón no volátil, usar uno donde la parte aniónica o catiónica sea volátil (y a la menor concentración posible)

Fosfato amónico en lugar de fosfato sódico ó potásico

- Mejor si la porción no volátil del tampón es ionizable en el modo usado

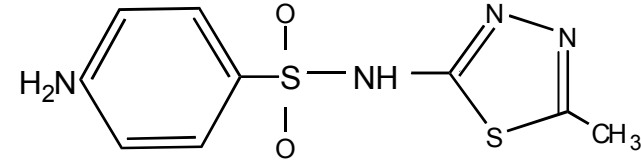
Fosfato (H_2PO_4^-) en modo negativo

APCI

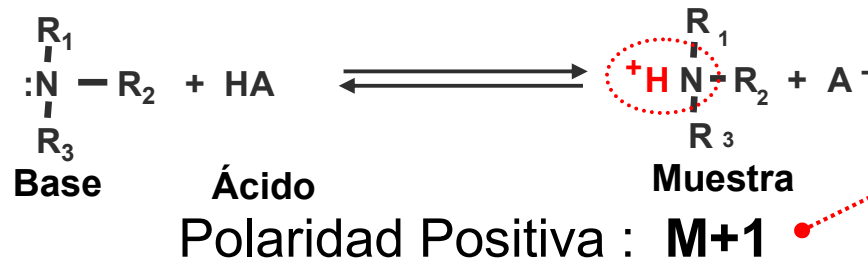
- Debe emplearse tampón volátil
- La concentración de tampón volátil deberá ser < 100 mM
- Al no requerir APCI el uso de tampones para controlar la ionización del analito bastantes métodos pueden transferirse directamente

Características Típicas del Espectro en LC/MS

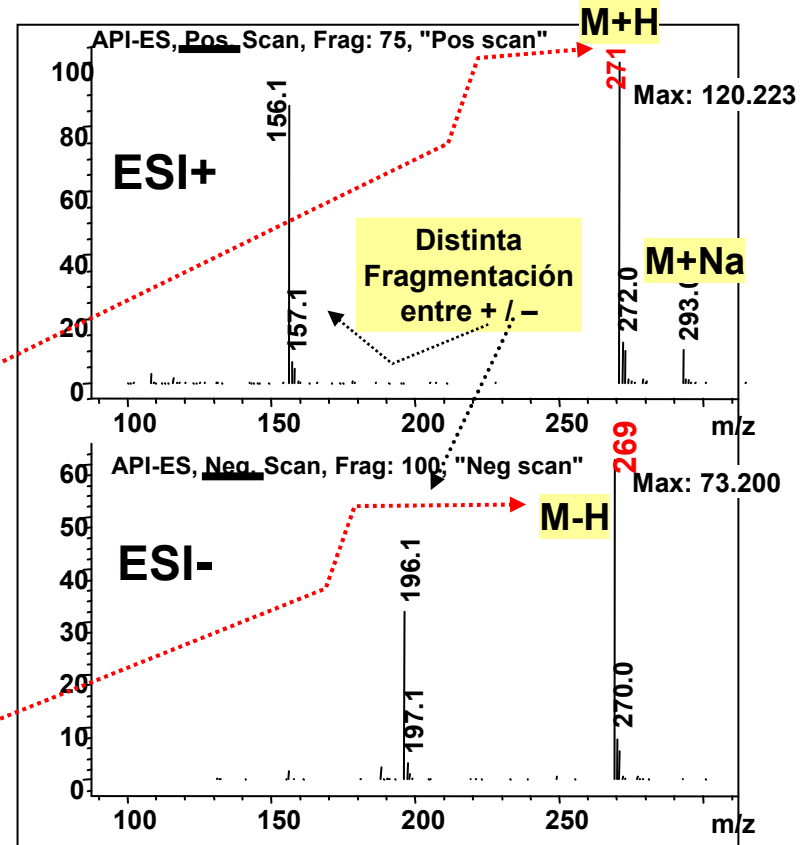
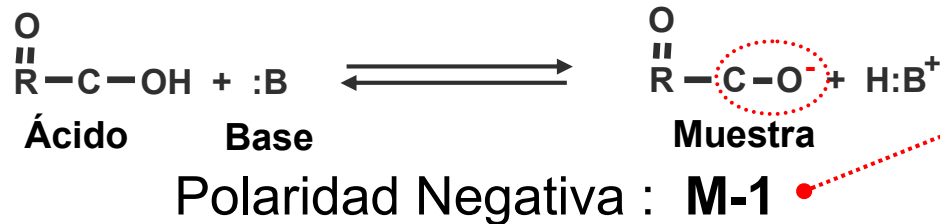
- Suele presentar poca fragmentación
- El pico base suele ser el ión “quasi molecular”
- El espectro y proporción entre iones es instrumento-dependiente >> Las bibliotecas se las debe crear el propio usuario



Modo iones Positivos



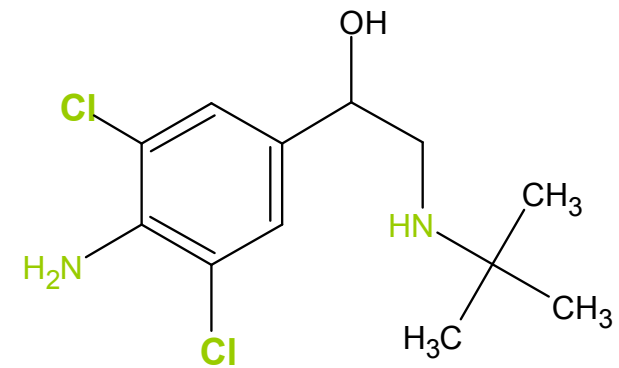
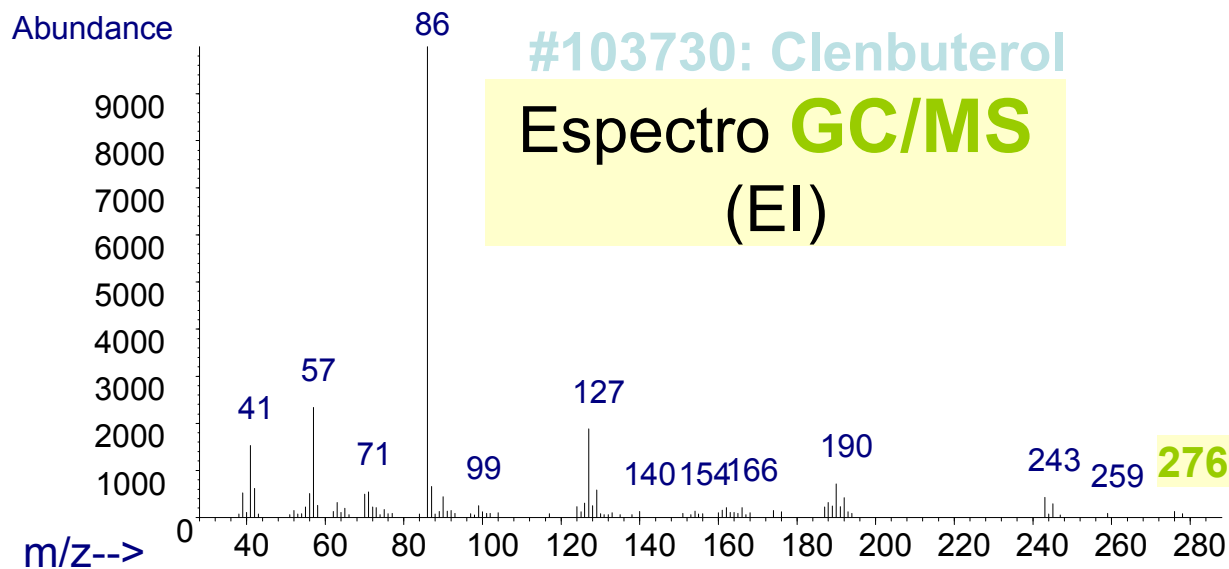
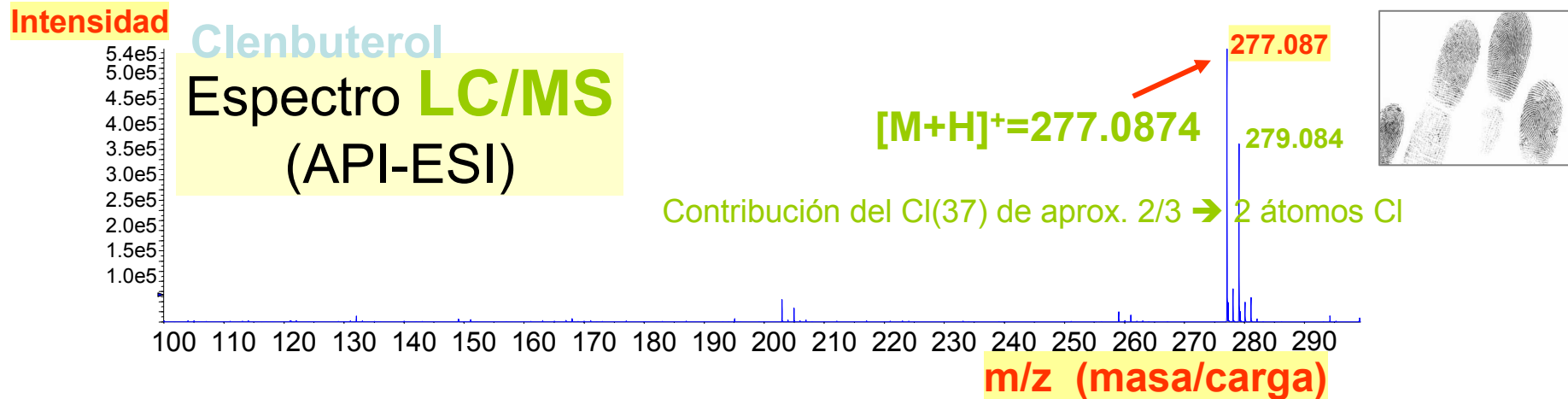
Modo iones Negativos



Utilizar en los cálculos Pesos mono-Isotópicos (no los moleculares)

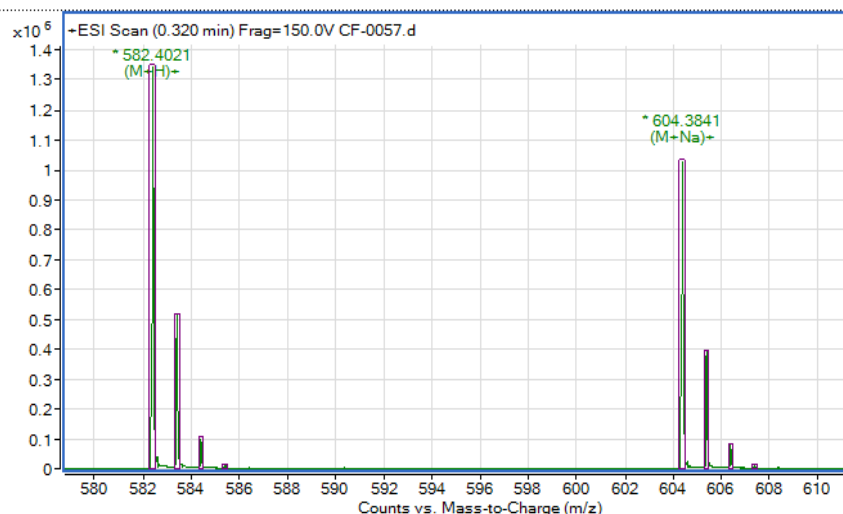
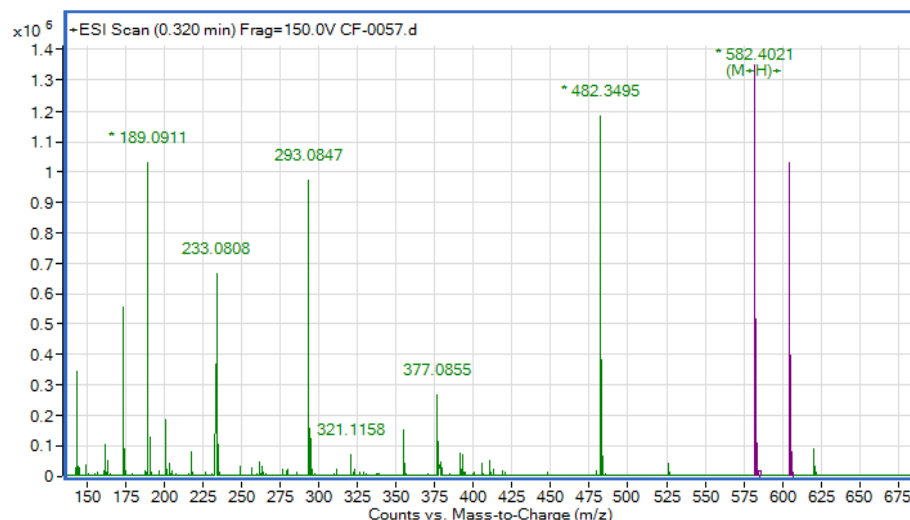
Ejemplo Cl = 35 (ó 37 para cálculos isotópicos - no 35.45)

Espectros LC/MS, CE/MS -APCI “versus” GC/MS - EI)



Clenbuterol
PM = 276 Da

Presentación de un análisis



MS Formula Results: + Scan (0.320 min)

m/z	Ion	Formula	Abundance
582.4021	(M+H) ⁺	C33 H52 N5 O4	1358686.4

Best	Formula (M)	Ion Formula	Score	Calc m/z	Diff (ppm)	Mass Matc
<input checked="" type="checkbox"/>	C33 H51 N5 O4	C33 H52 N5 O4	98.93	582.4014	-1.2	98.24

Isotope	Abund Sum%	Calc Abund Sum%	m/z	Calc m/z	Diff (ppm)
1	68.23	67.85	582.4021	582.4014	-1.22
2	25.92	25.96	583.405	583.4045	-0.92
3	5.07	5.39	584.4071	584.4074	0.42
4	0.78	0.8	585.4092	585.4101	1.66

m/z	Ion	Formula	Abundance
604.3841	Mass to Charge: the monoisotopic m/z of the species for which the formulas on this list have been calculated		

Best	Formula (M)	Ion Formula	Score	Calc m/z	Diff (ppm)	Mass Matc
<input checked="" type="checkbox"/>	C33 H51 N5 O4	C33 H51 N5 Na O4	98.55	604.3833	-1.36	97.86

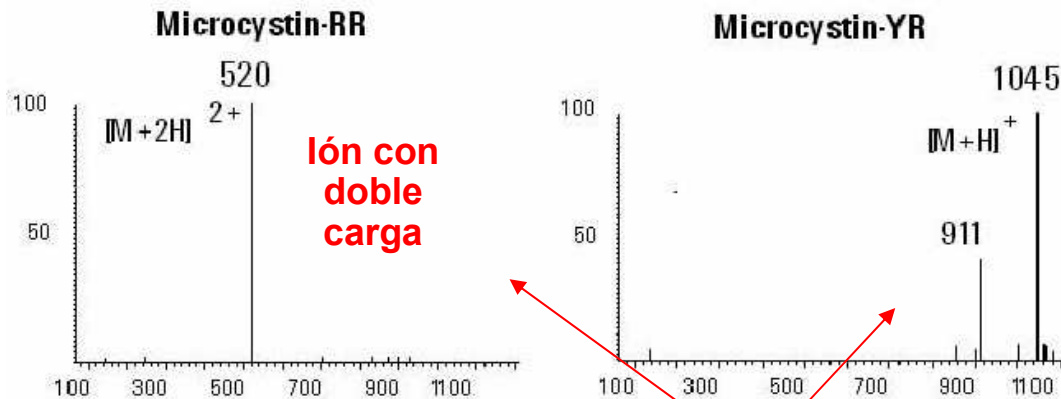
Isotope	Abund Sum%	Calc Abund Sum%	m/z	Calc m/z	Diff (ppm)
1	68.49	67.85	604.3841	604.3833	-1.35
2	25.73	25.96	605.3868	605.3864	-0.66
3	5.04	5.39	606.3889	606.3893	0.63
4	0.74	0.8	607.3923	607.3921	-0.27

José Rodríguez
SUIC. UMU



Ejemplos Espectros LC/MS (AP-ESI / APCI)

- Los espectros en LC/MS suelen presentar poca fragmentación



VENTAJAS MÍNIMA FRAGMENTACIÓN DEL ESPECTRO LC/MS:

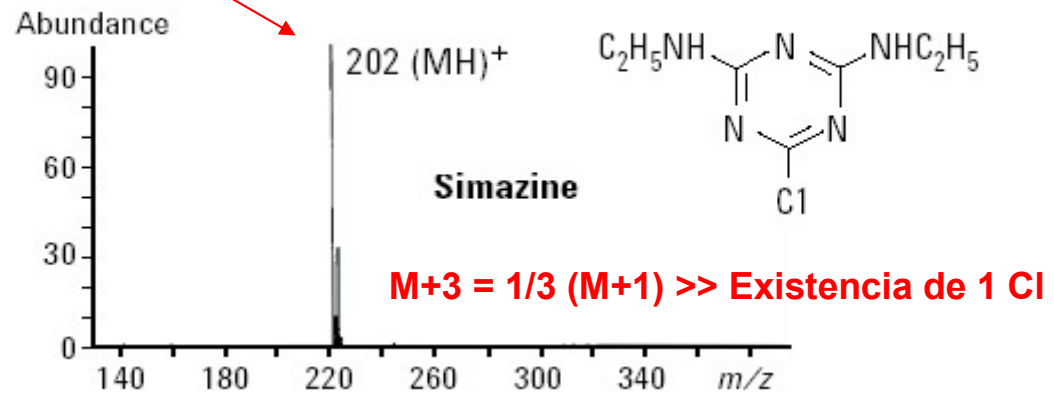
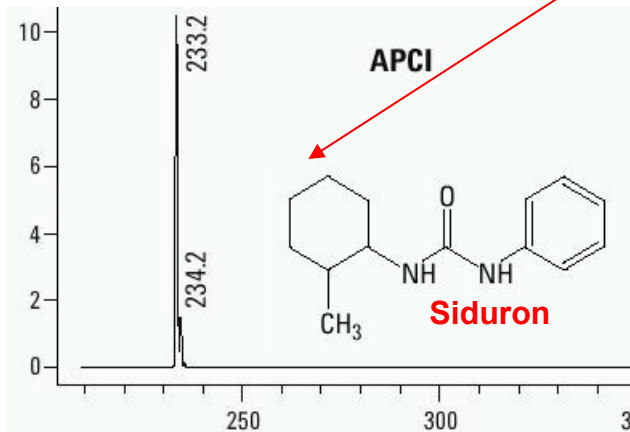
- Mayor Selectividad
- Mayor Sensibilidad

INCONVENIENTES:

- Menor información estructural*

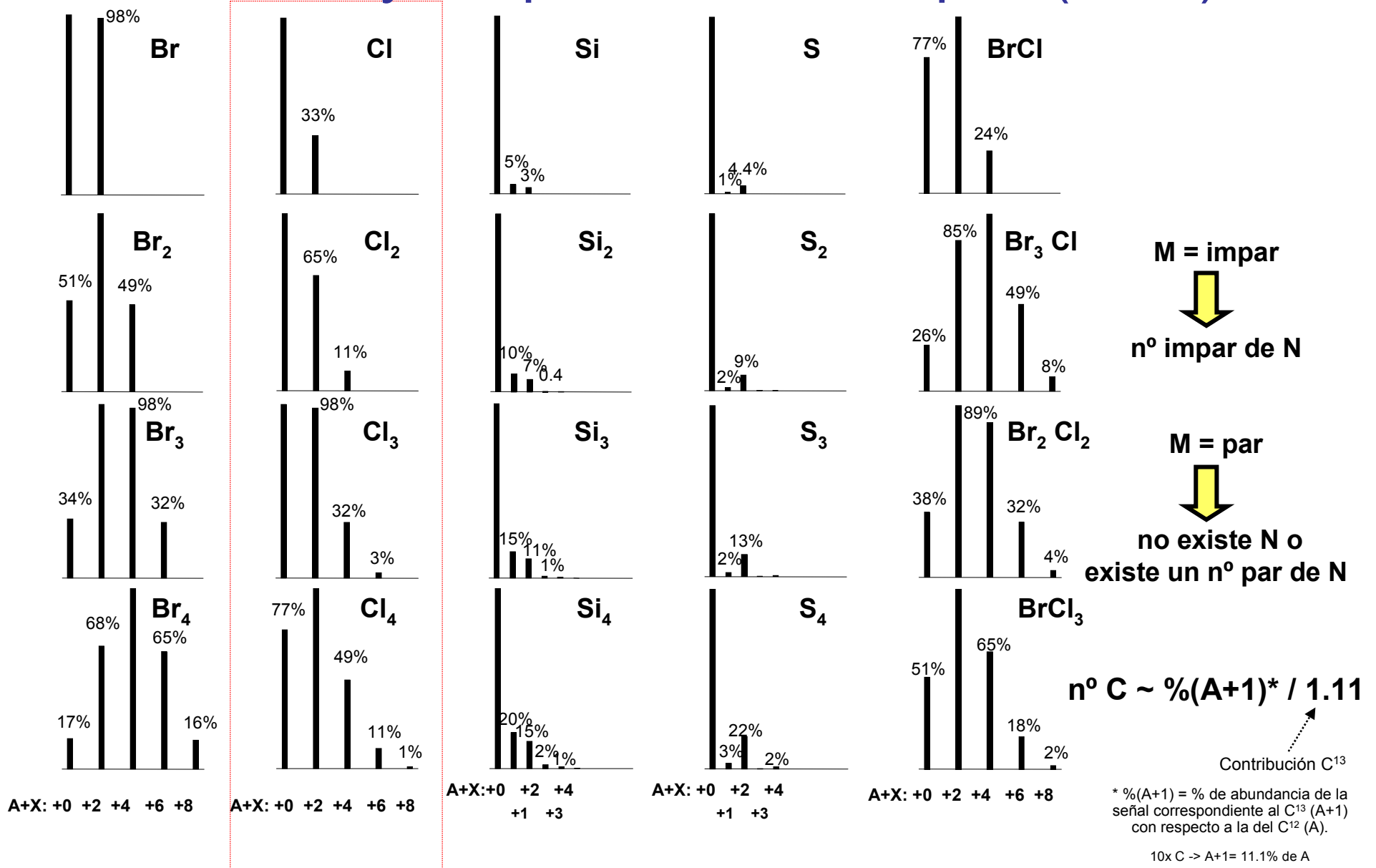
* En LC/MS aumentando suficientemente el Voltaje del Fragmentador (voltaje a la salida del capilar) se puede aumentar la fragmentación en los espectros para obtener mayor información estructural, aunque la mejor alternativa es la utilización de sistemas de LC/MSⁿ

- Representaciones en forma "diagrama barras"
- Representación espectro "completo"



- Las proporciones de los iones a A, A+2, A+4,... Permite reconocer la presencia de ciertos elementos

Pérfiles y Proporciones Isótopos (A+2)

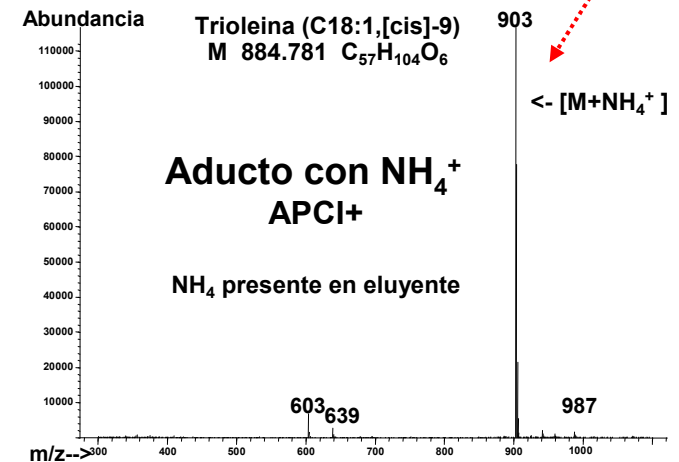


Formación de Aductos en LC/MS

- **Na⁺, K⁺, NH₄⁺, pueden competir con los H⁺ en la ionización del analito.**
- **En Electrospray +:** en presencia pequeñas concentraciones^{*a} de sales Na⁺ (K⁺ / NH₄⁺) **se observan muy habitualmente los aductos M+23 (M+39 / M+18).** Estos **NO se observan en polaridad negativa.** En caso de duda (p.e. análisis de trazas) la **adición de Na⁺ y K⁺ puede ayudar a confirmar el M.** Incluso en algunas ocasiones **pueden facilitar su ionización:** algunas moléculas neutras con tendencia a formar puentes de hidrógeno (p.e. Mentol y carbohidratos) se pueden conseguir ionizar mediante la formación de aductos con NH₄⁺ y metales alcalinos (probar AcNH₄ o AcNa como tampón).
- **En APCI+:** **Se forman aductos con NH₄⁺, pero NO con Na⁺ o K⁺.**
- **En APCI-:** se pueden formar en ocasiones aductos con compuestos halogenados si el eluyente contiene algún disolvente halogenado (basta un pequeño porcentaje).
- **En modo Negativo (ESI y APCI)** puede **adicionarse un anión** procedente del eluyente:
$$M + A^- \Rightarrow [M+A]^-$$

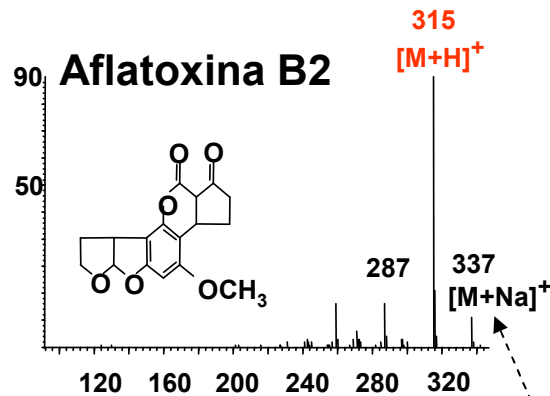
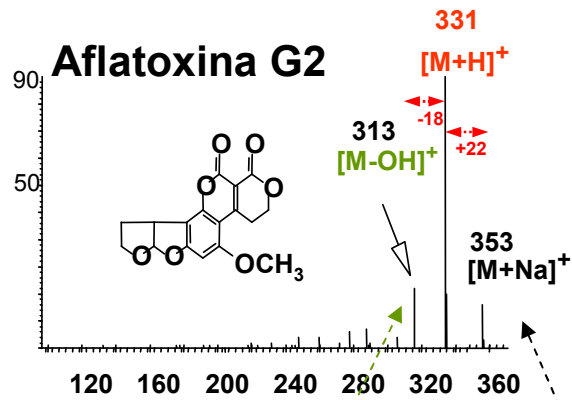
A⁻: Carboxilato (AcO⁻, HCOO⁻, TFA⁻), Haluro (Cl⁻, I⁻, ...)
- En instrumentos que no desolvaten perfectamente al analito se puede observar la formación de aductos con disolvente. (p.e. acetonitrilo - por formación puentes hidrógeno)

^{*a} Bastan niveles μM de Na, K o NH₄ para poder obtener aductos.

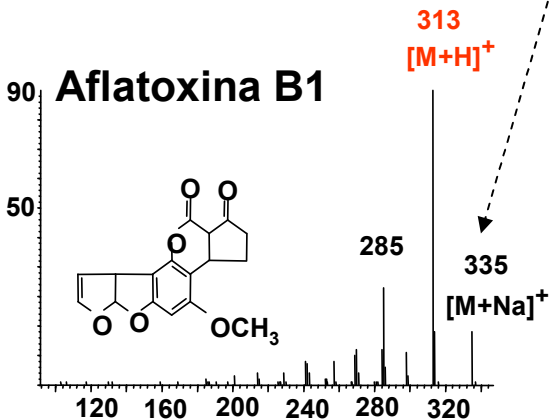
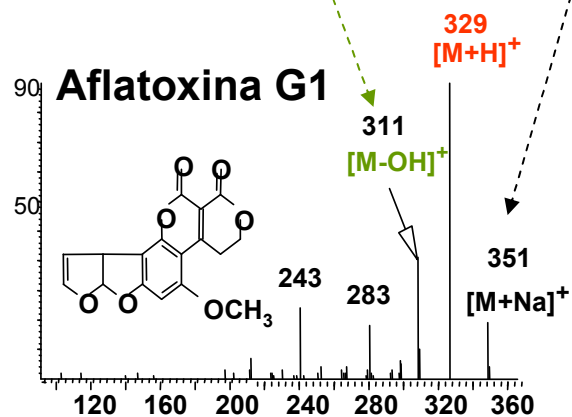


Ejemplos Formación Aductos LC/MS: Espectros Aflatoxinas (ESI+) y Saponina (ESI-)

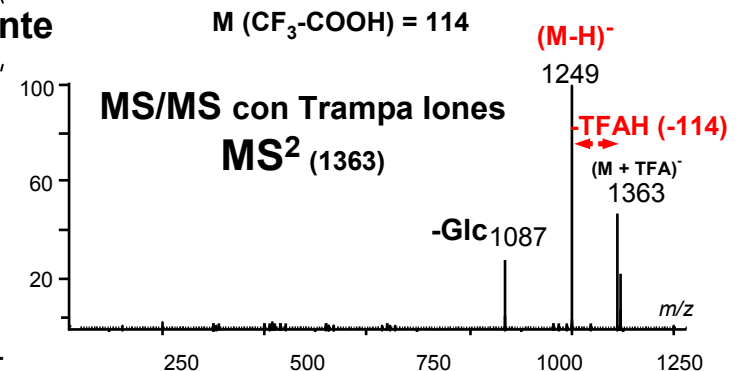
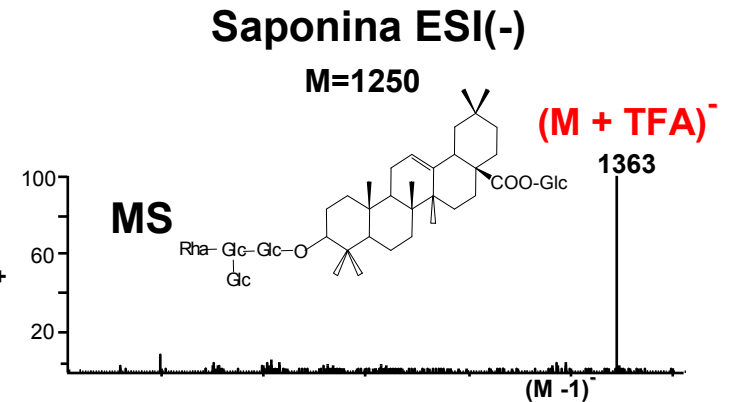
ADUCTOS ESI+ con Na⁺



Pérdidas agua (-18) Aductos por la presencia de Na⁺ en eluyente



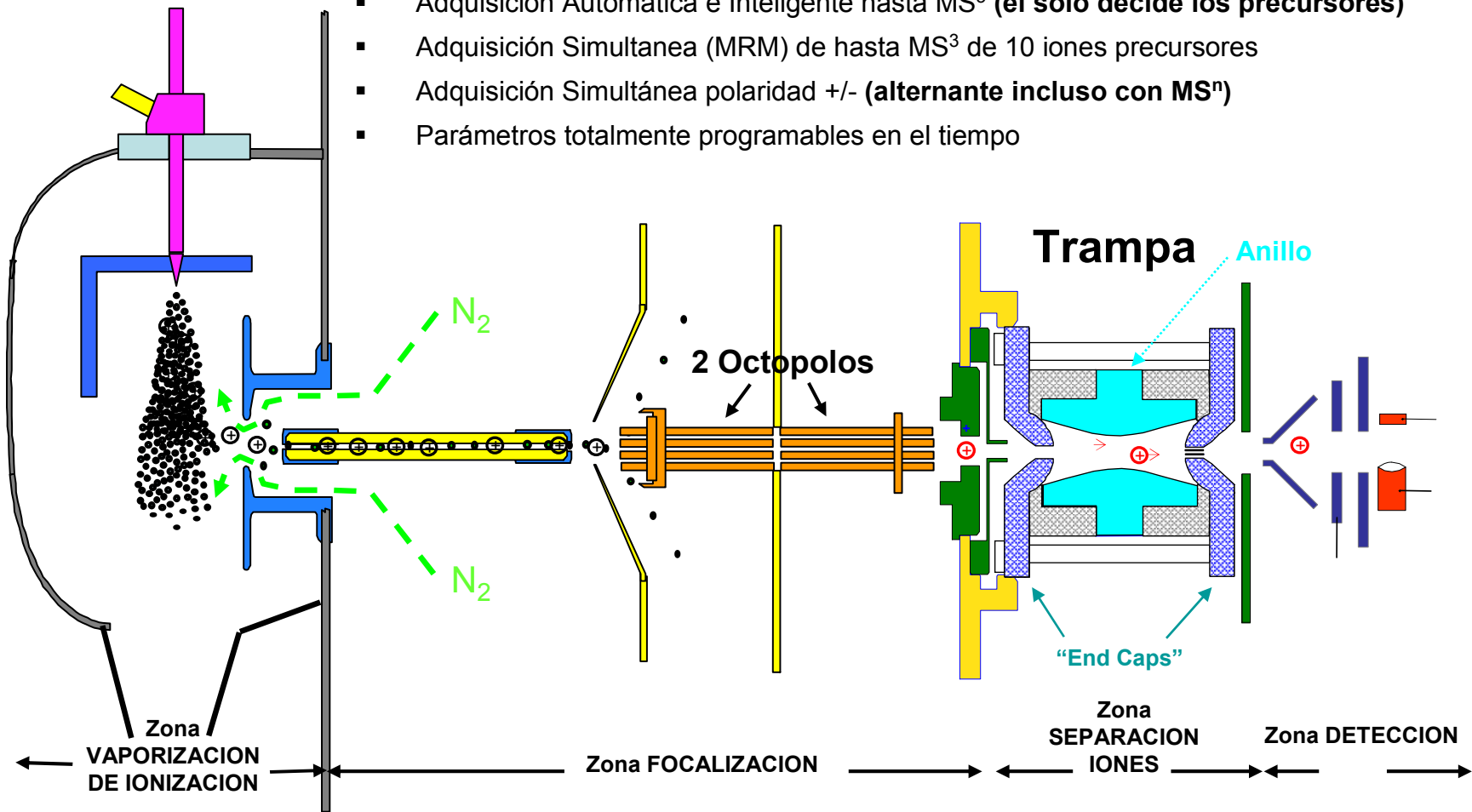
ADUCTO ESI- con TFA⁻



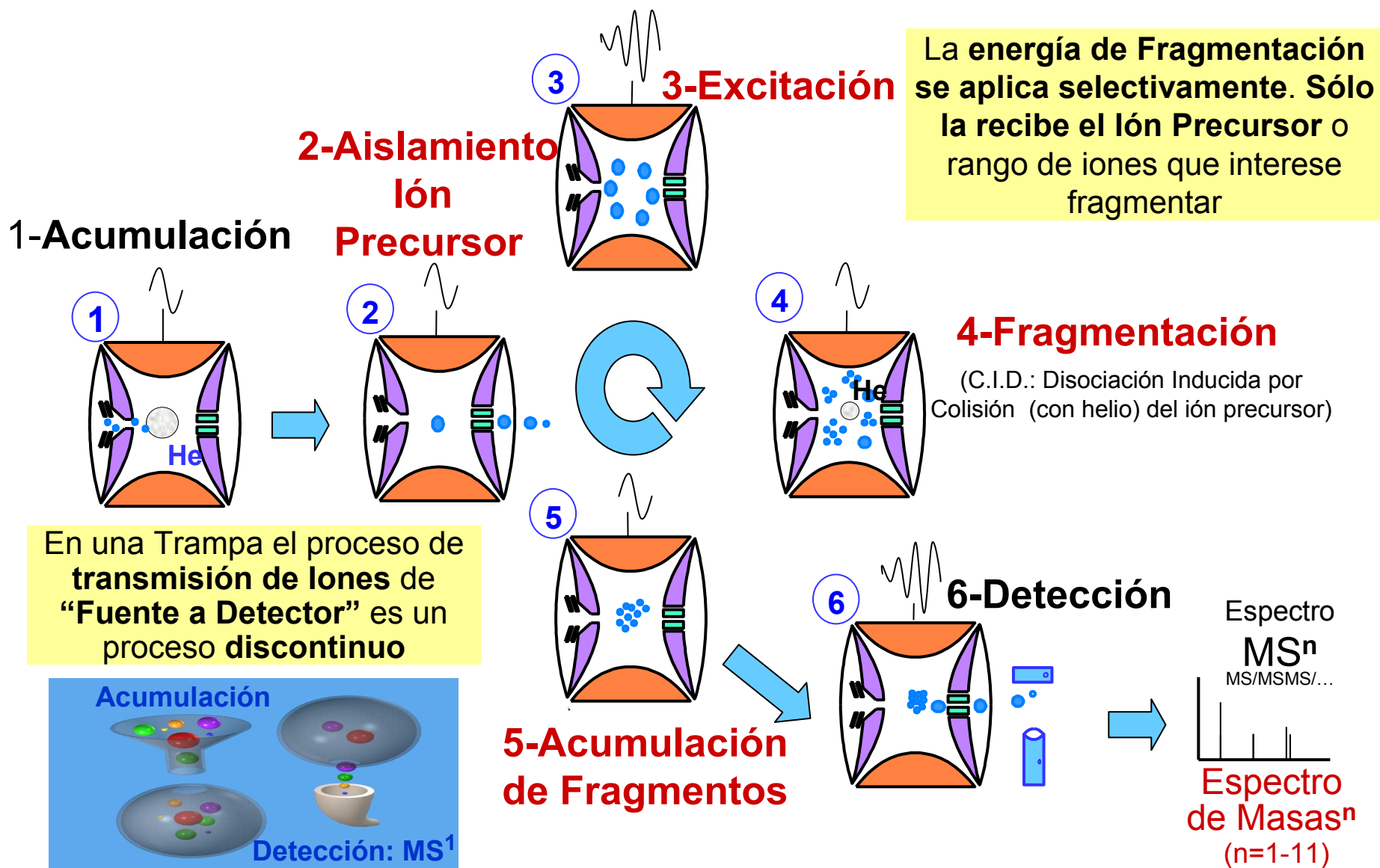
• Muestra analizada por ESI(-) mediante infusión de una disolución que contiene TFA (ácido trifluoroacético)

Diseño del Sistema con Trampa de Iones

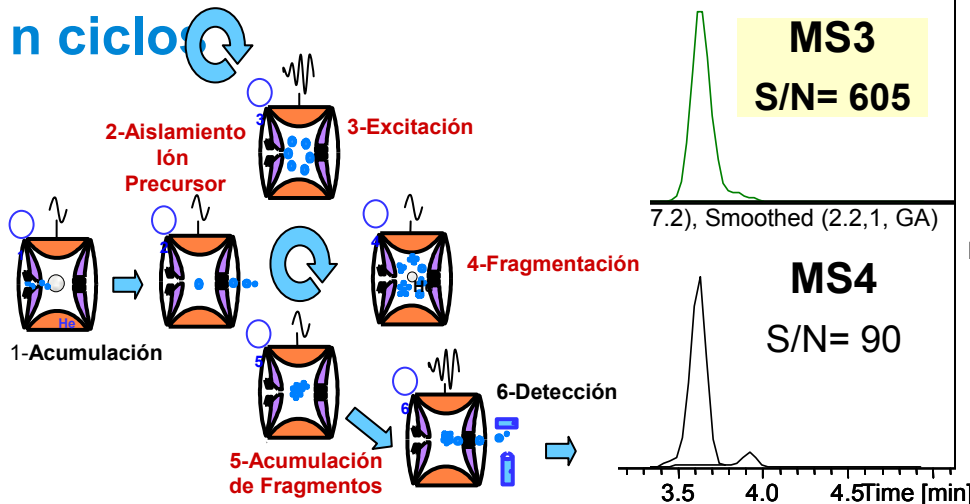
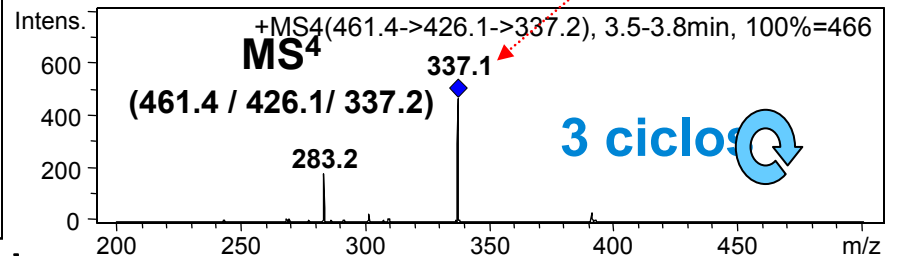
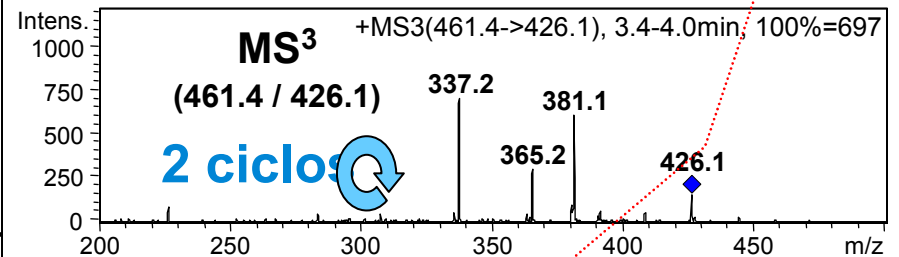
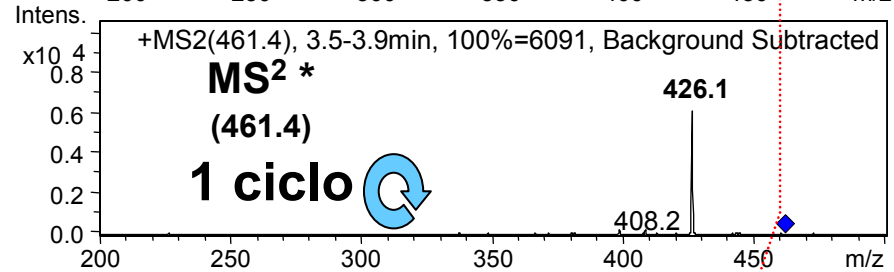
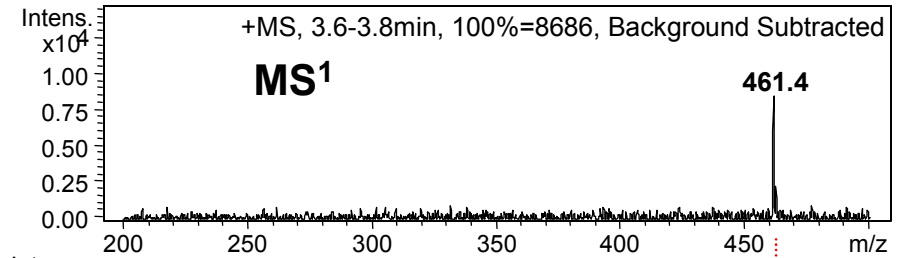
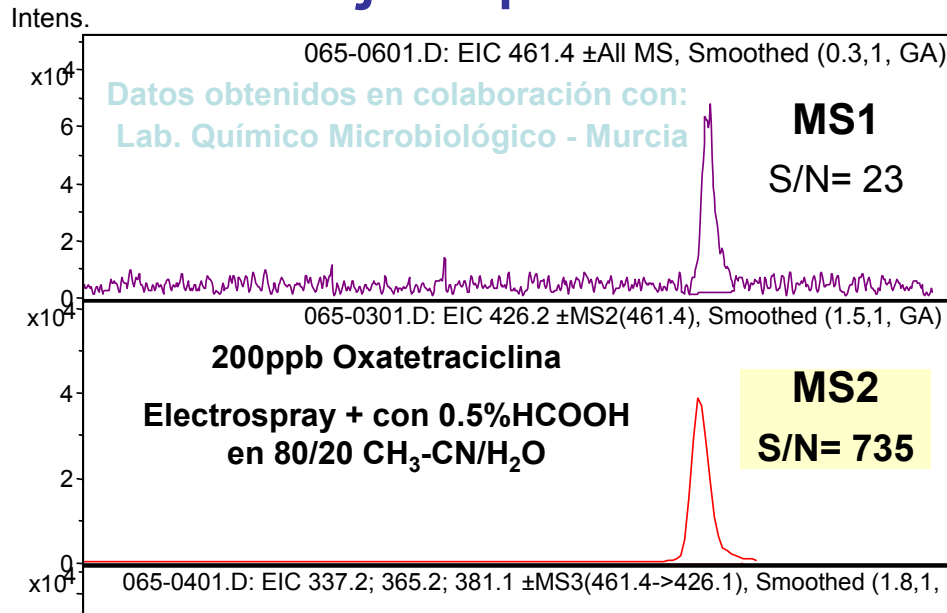
- Excelente Sensibilidad y Calidad Espectral
- Hasta MS¹¹ en modo manual
- Adquisición Automática e Inteligente hasta MS⁵ (**él solo decide los precursores**)
- Adquisición Simultánea (MRM) de hasta MS³ de 10 iones precursores
- Adquisición Simultánea polaridad +/- (**alternante incluso con MSⁿ**)
- Parámetros totalmente programables en el tiempo



Trampas de Iones: Obtención Espectro MSⁿ

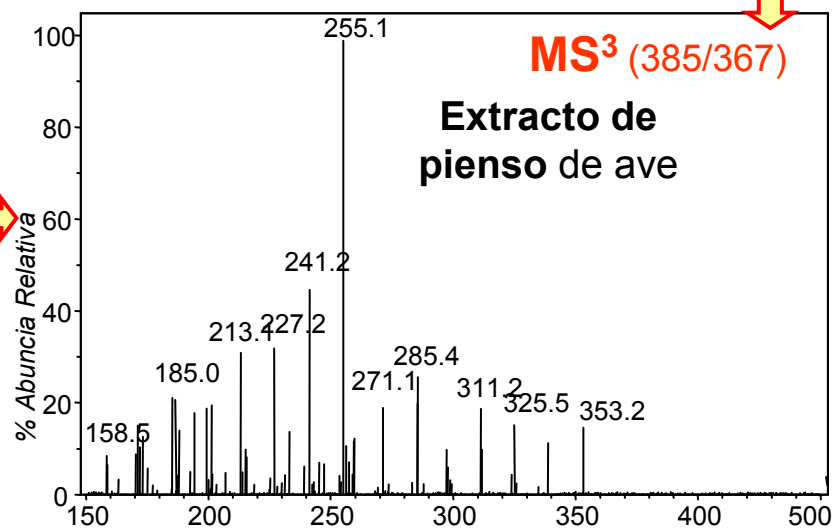
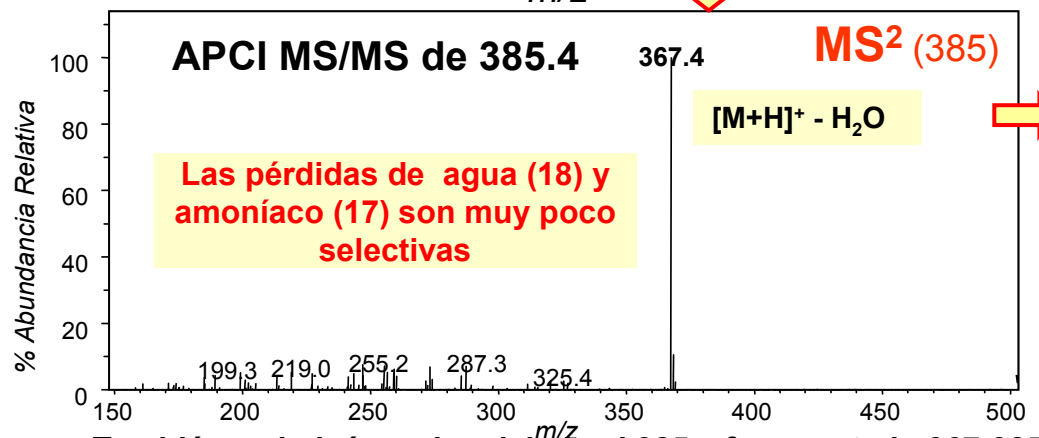
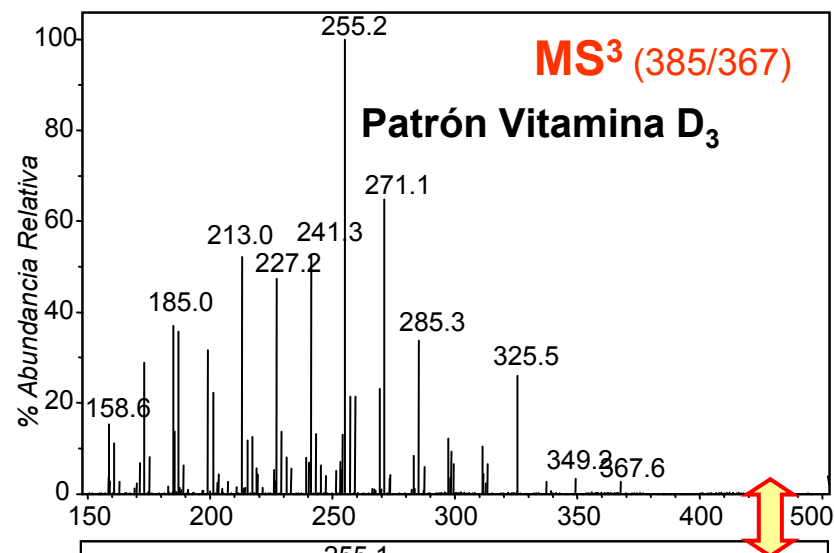
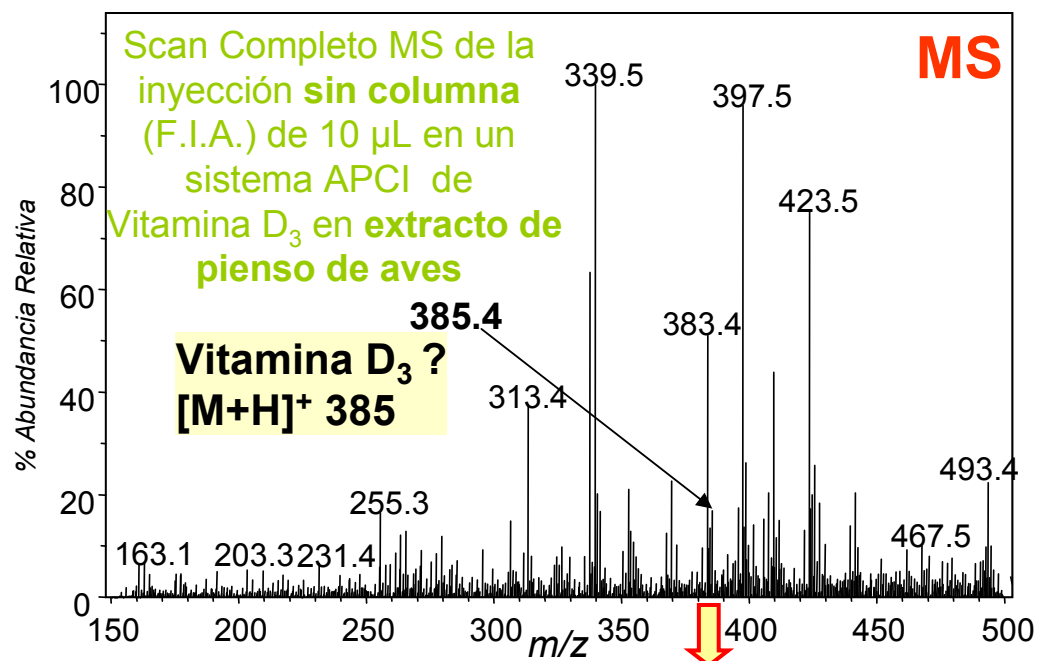


Ejemplo Obtención Espectro MSⁿ



La gran selectividad proporcionada por MS² y MS³ suele proporcionar una **mejor sensibilidad** en la detección de picos minoritarios

Análisis Vitamina D₃ por MSⁿ por Inyección Directa (FIA) mediante Supresión “Fondo de la Muestra”

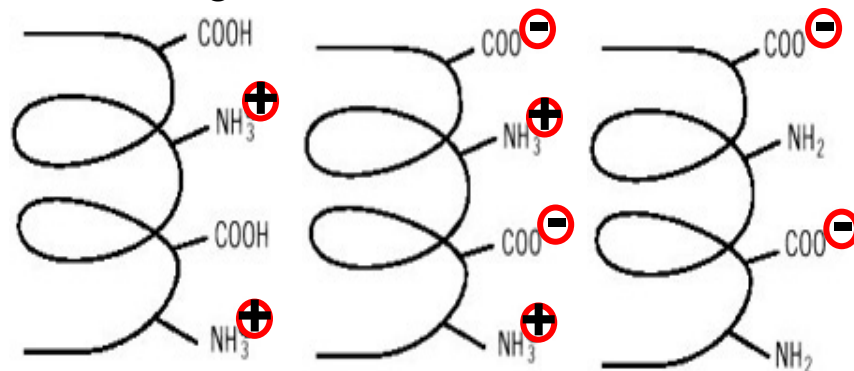


También se habría poder aislado el 385 y fragmentado 367-385

Espectros de Iones con Múltiples Cargas

- **Moléculas de gran tamaño**, p.e. péptidos y proteínas, suelen proporcionar en **ESI iones con Múltiples Cargas** \Rightarrow respuesta a múltiples relaciones m/z (masa/carga)

- Con **moléculas anfotéricas** (moléculas con grupos ácidos y básicos - p.e. Péptidos y Proteínas) si **pH = pI** (pto. Isoeléctrico) \Rightarrow molécula globalmente será **neutra**:



pH < pI

pH = pI

pH > pI

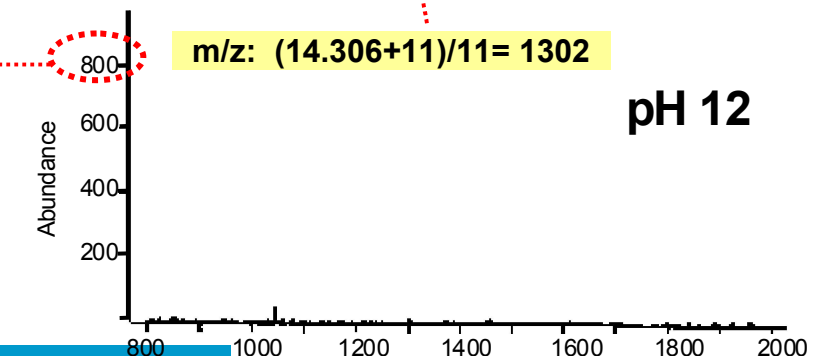
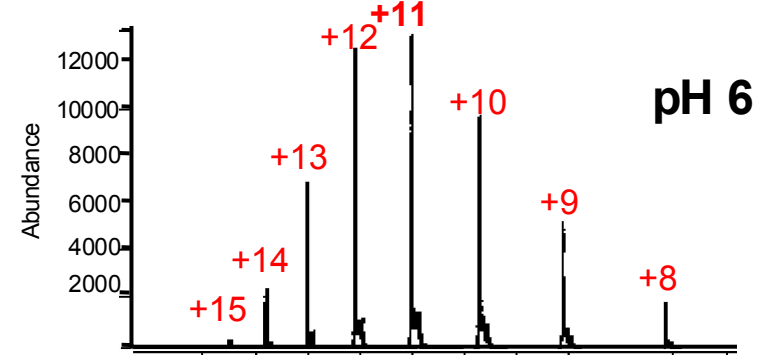
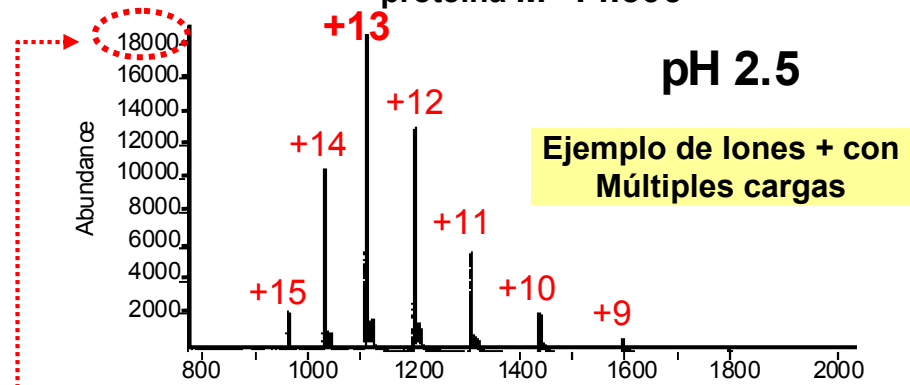
Carga: **positiva**

neutra

negativa

- **El perfil del espectro de iones con múltiples cargas variará en función del pH de la fase móvil.**

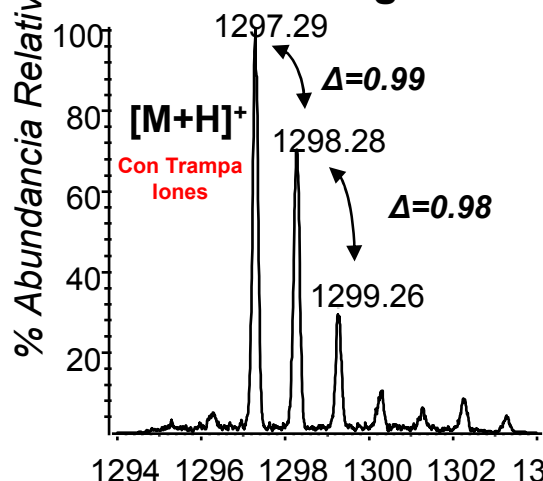
Espectro MS (ESI+) de LISOZIMA
proteína M=14.306



Reconocimiento de Iones con Múltiples Cargas

TRAP: Angiotensina I Humana: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu PM 1296

Iones con 1 carga: $\Delta m/z = 1.0$



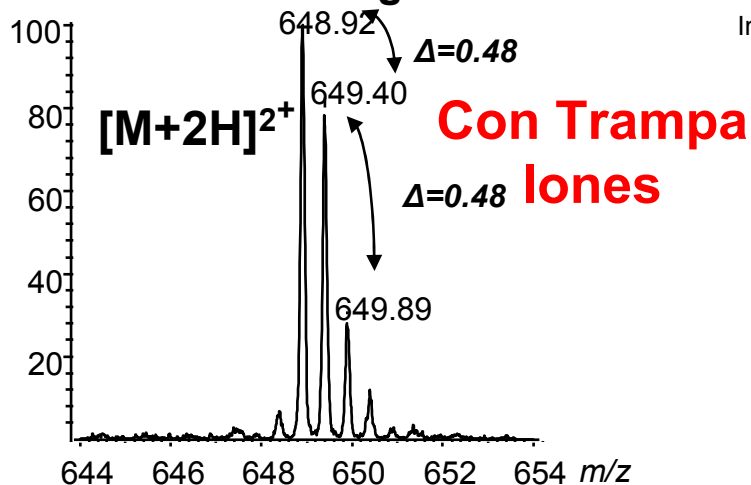
- En **iones con 1 sola carga** la diferencia entre las señales correspondientes a C^{12} y C^{13} es de $\Delta m/z = 1$.
- En **iones con múltiples cargas** la diferencias serán:

$$\Delta m/z = 1/z \text{ (nº cargas)}$$

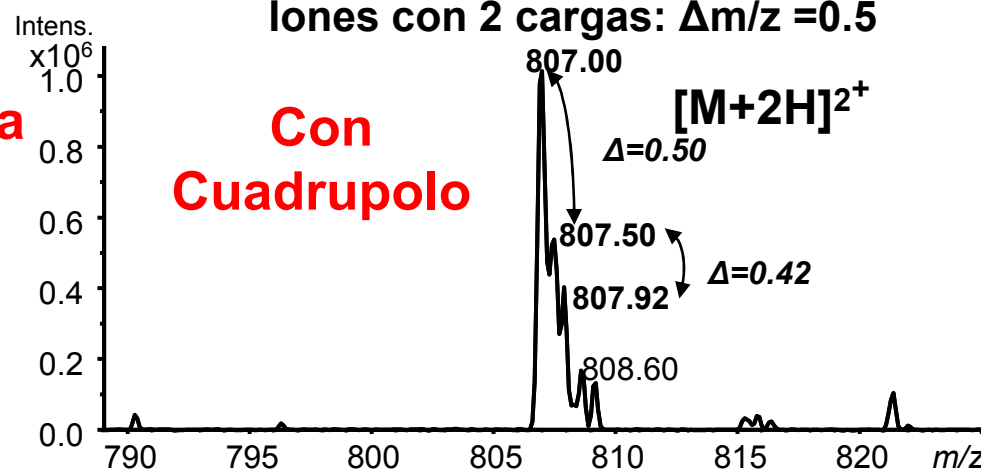
- Por consiguiente:

$\Delta m/z = 1.0 \Rightarrow 1$ carga	$\Delta m/z = 0.5 \Rightarrow 2$ cargas
$\Delta m/z = 0.33 \Rightarrow 3$ cargas	$\Delta m/z = 0.25 \Rightarrow 4$ cargas
- Para reconocimiento del nº de cargas se recomienda guardar el espectro de masas en modo completo

Iones con 2 cargas: $\Delta m/z = 0.5$



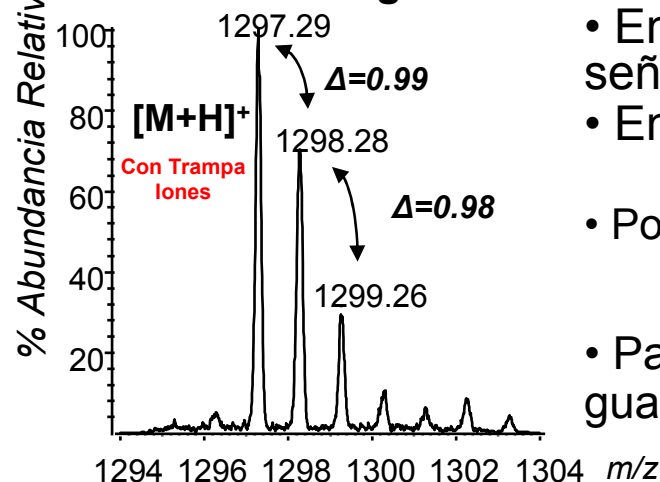
Iones con 2 cargas: $\Delta m/z = 0.5$



Comparación Resolución Espectral: Q vs TRAP

TRAP: Angiotensina I Humana: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu PM 1296

Iones con 1 carga: $\Delta m/z = 1.0$



- En **iones con 1 sola carga** la diferencia entre las señales correspondientes a C^{12} y C^{13} es de $\Delta m/z = 1$.
- En **iones con múltiples cargas** la diferencias serán:

$$\Delta m/z = 1 / z \text{ (nº cargas)}$$

- Por consiguiente:

$$\Delta m/z = 1.0 \Rightarrow 1 \text{ carga}$$

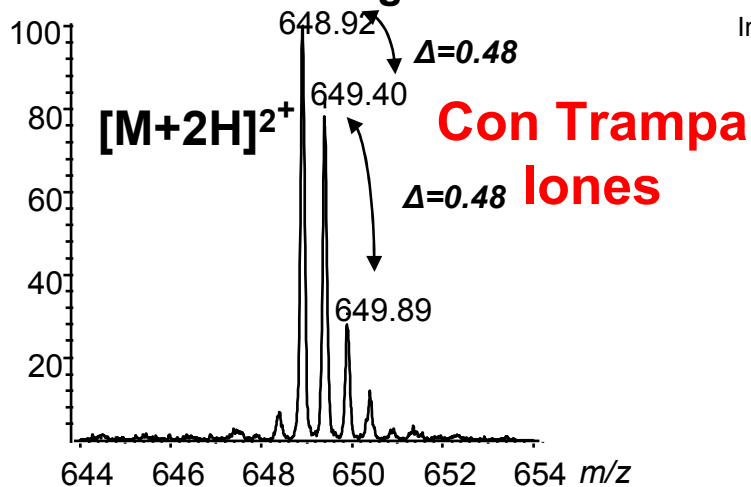
$$\Delta m/z = 0.5 \Rightarrow 2 \text{ cargas}$$

$$\Delta m/z = 0.33 \Rightarrow 3 \text{ cargas}$$

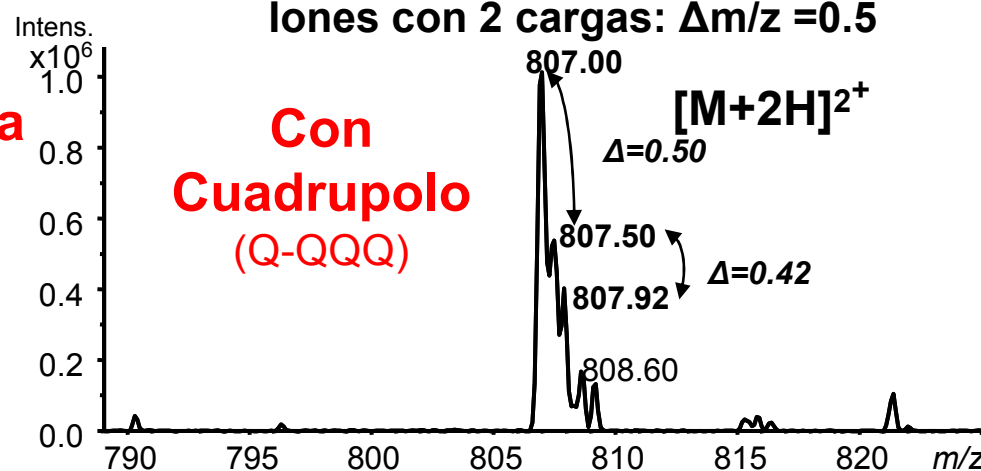
$$\Delta m/z = 0.25 \Rightarrow 4 \text{ cargas}$$

- Para reconocimiento del nº de cargas se recomienda guardar el espectro de masas en modo completo

Iones con 2 cargas: $\Delta m/z = 0.5$

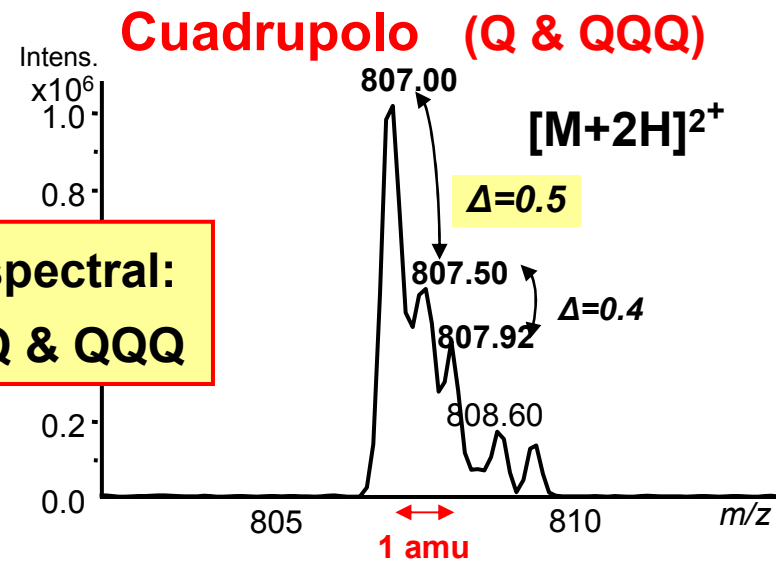
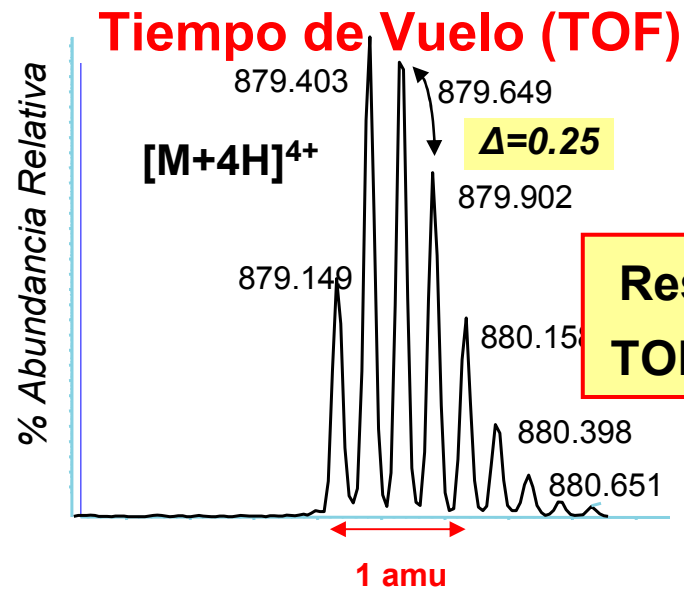


Iones con 2 cargas: $\Delta m/z = 0.5$



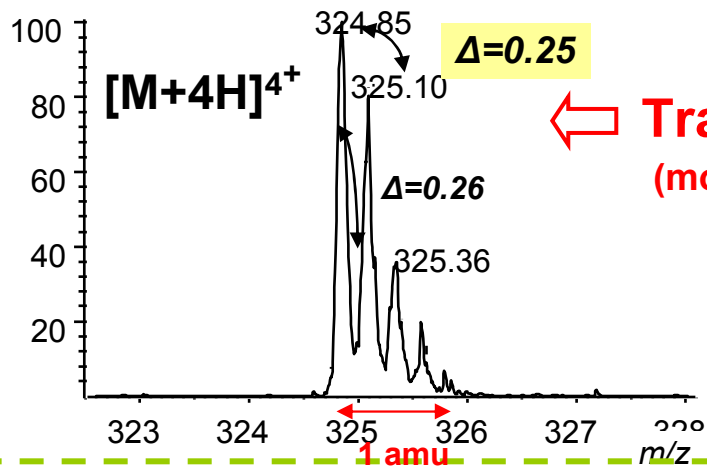
- La Trampa de Iones proporciona mas resolución y selectividad espectral que los cuadrupolos

Comparación Resolución Espectral: TOF vs Trap & Quads

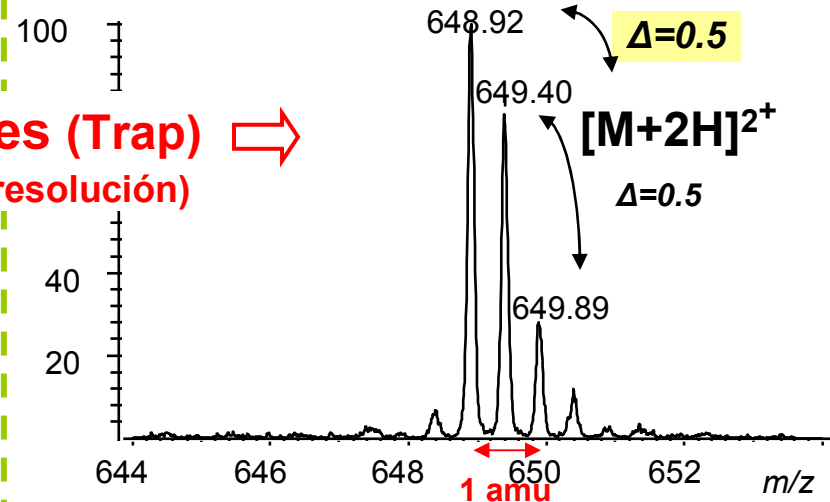


**Resolución Espectral:
TOF > Trap > Q & QQQ**

Iones con 4 cargas: $\Delta m/z = 0.25$



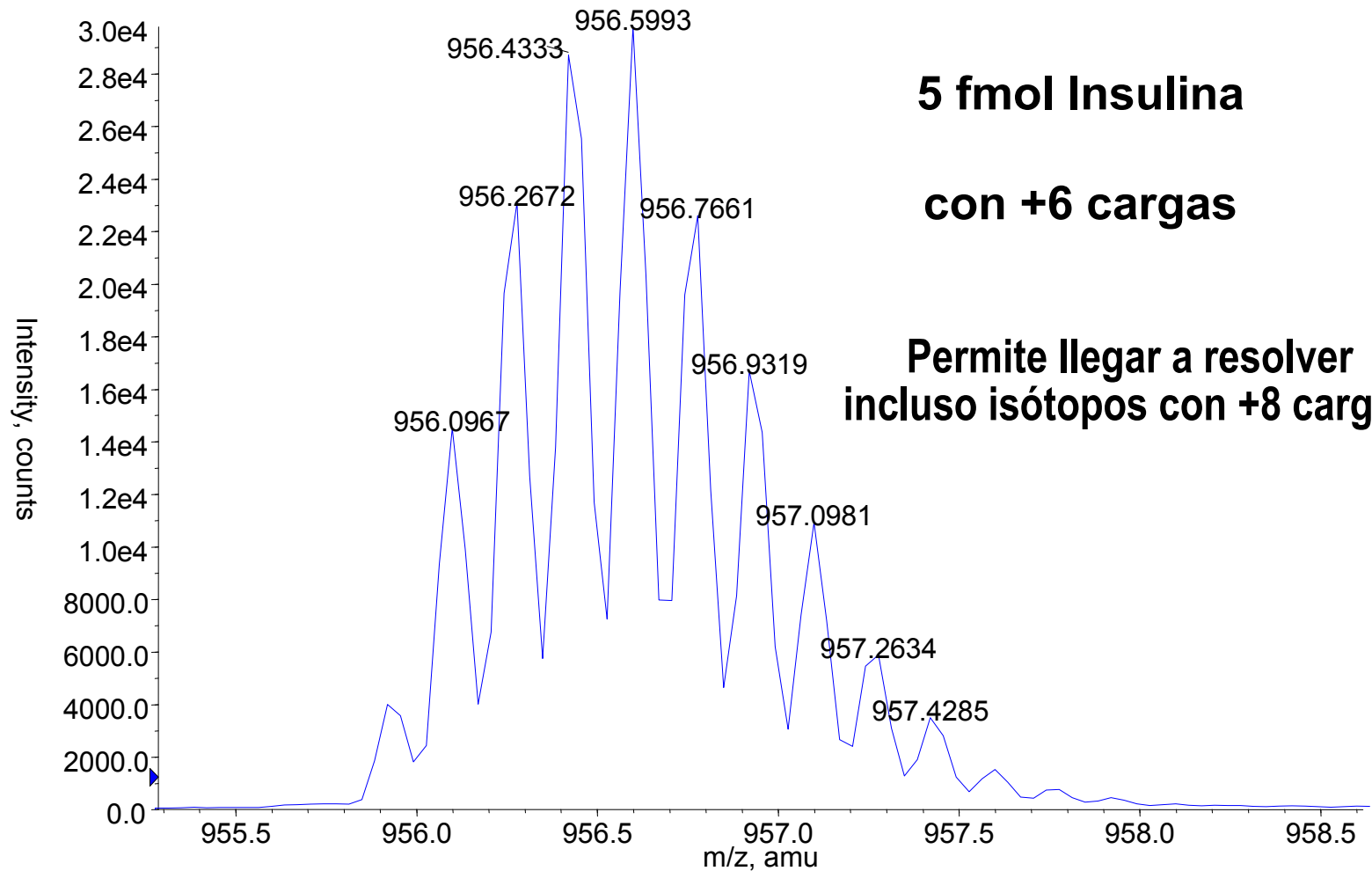
Iones con 2 cargas: $\Delta m/z = 0.5$



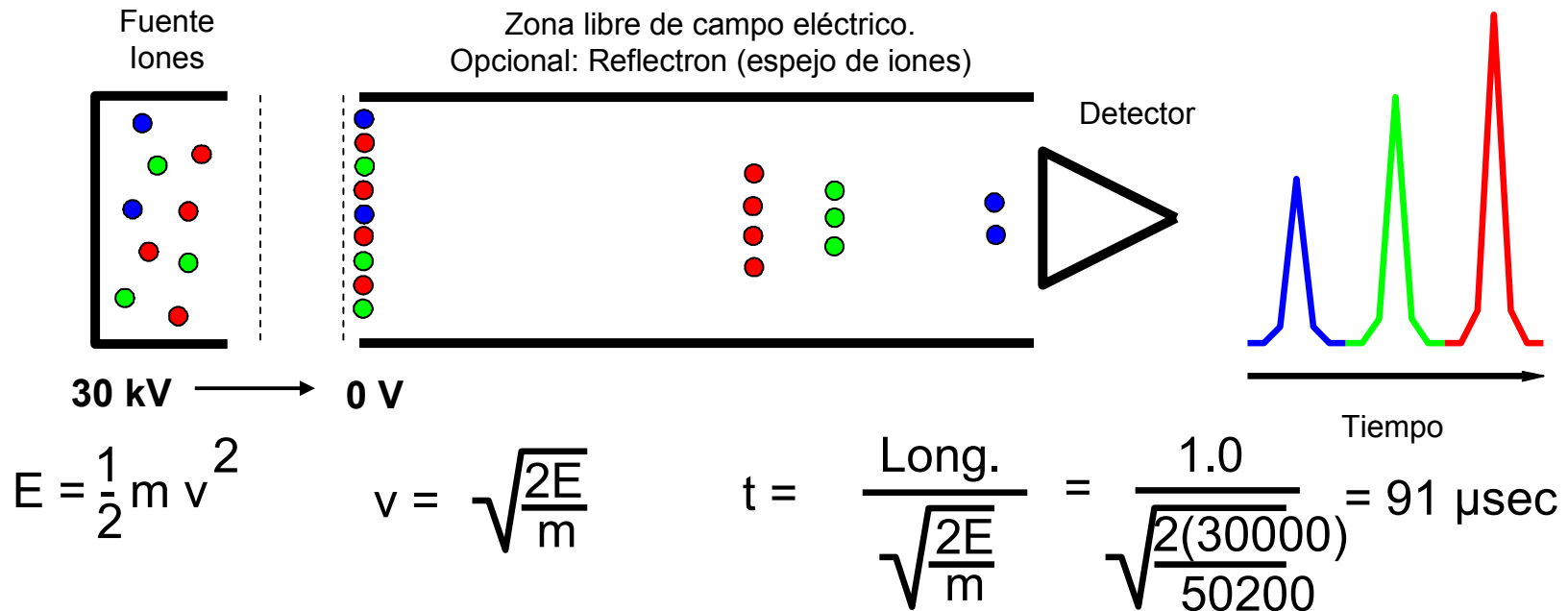
Trampa Iones (Trap)
(modo máxima resolución)

LC/MSD TOF

Excelente Resolución Espectral



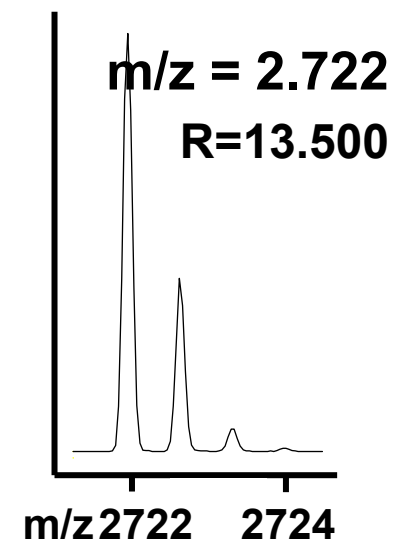
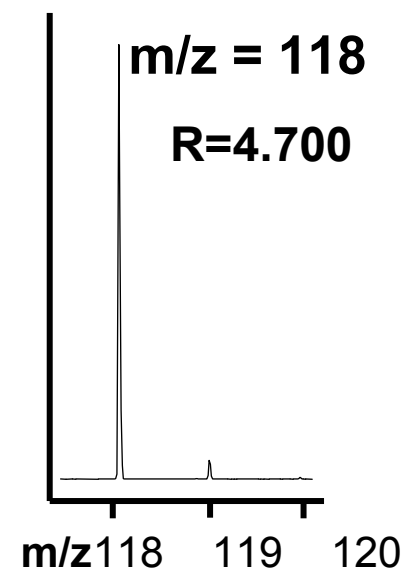
Fundamentos del TOF ó Tiempo de Vuelo (“Time-of-Flight”)



Acelerar con la misma energía a los iones procedentes de la fuente
→ Los iones de distinta masa adquieren distintas velocidades y
lleguen al detector con distintos “tiempos de vuelo”
 (menor masa → mayor velocidad)

- Técnica pulsante con un intervalo típico de generación de pulsos de 100 μseg. (10.000 pulsos/s)
- Tiempos Vuelo típicos (vuelo 2m): m/z - μseg.: 118 = 20μs. 622 = 46μs. 3000 = 100μs.
- Resoluciones en el rango de ppm’s requerirán la medición del tiempo de vuelo con una precisión mejor de 1 nanosegundo

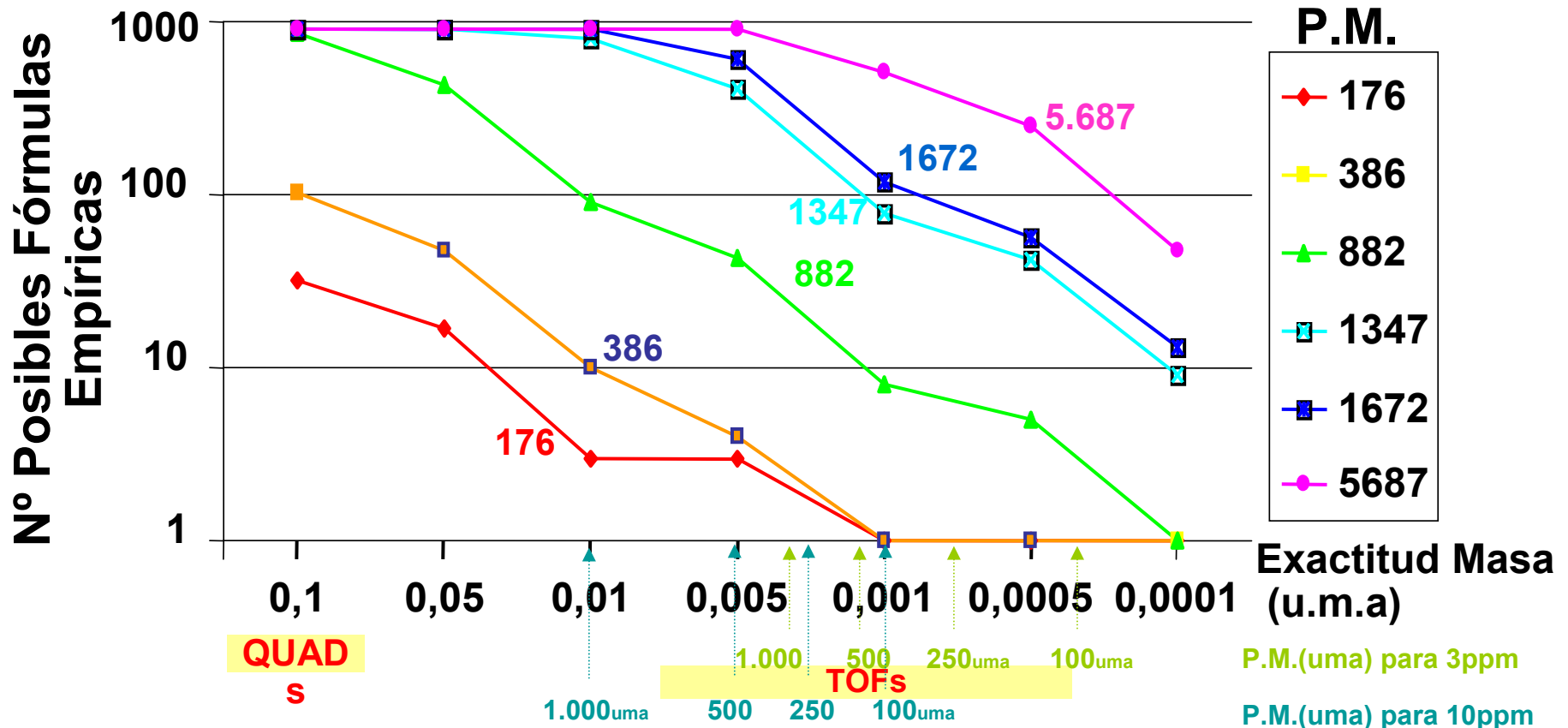
Masa Exacta Requiere una Elevada Resolución Espectral



La elevada resolución espectral proporcionada por los TOF's (superior a Trampas y Cuadrupolos) permitirá obtener "masa exacta" mediante la adición en continuo de algunos compuestos como referencia interna para m/z.

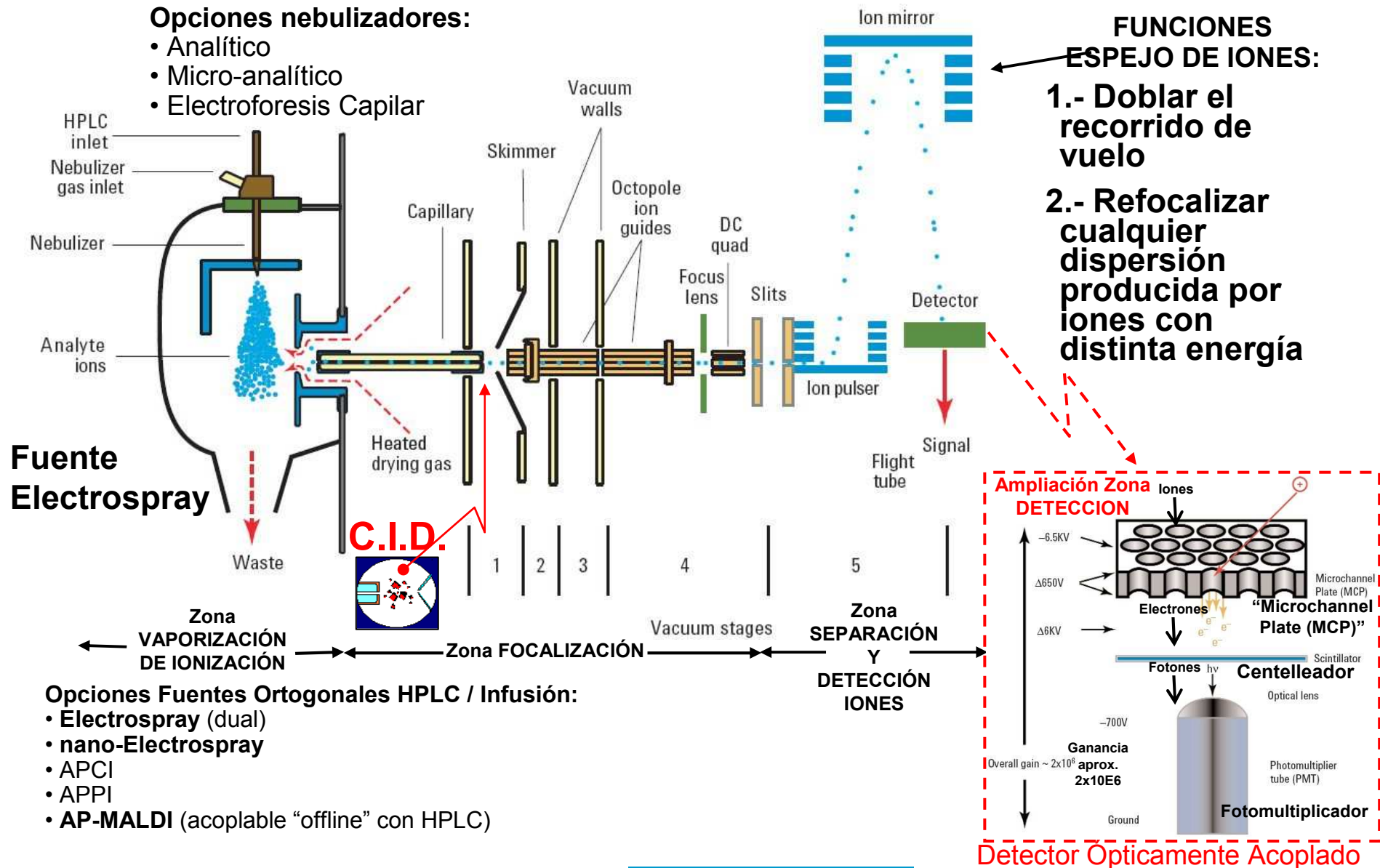
La Importancia de disponer de “Masa Exacta” para “centrar” la búsqueda:

- Al aumentar la Exactitud de la masa analizada se reducen muy considerablemente el nº de posibles composiciones elementales que pueden dar la masa en cuestión.



- En moléculas pequeñas el poder determinar el peso molecular con la tercera cifra decimal permite típicamente definir una fórmula empírica inequívoca.

Esquema LC/MS-TOF



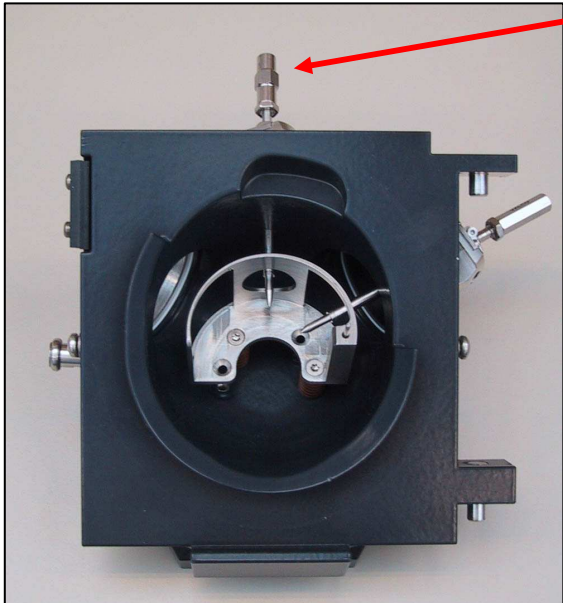
**José Rodríguez
SUIC. UMU**



LC/MSD TOF: Fuente Electrospray

Para obtener “masa exacta” -además de elevada resolución espectral- se requiere la adición en continuo de unas masas/compuestos de referencia interna

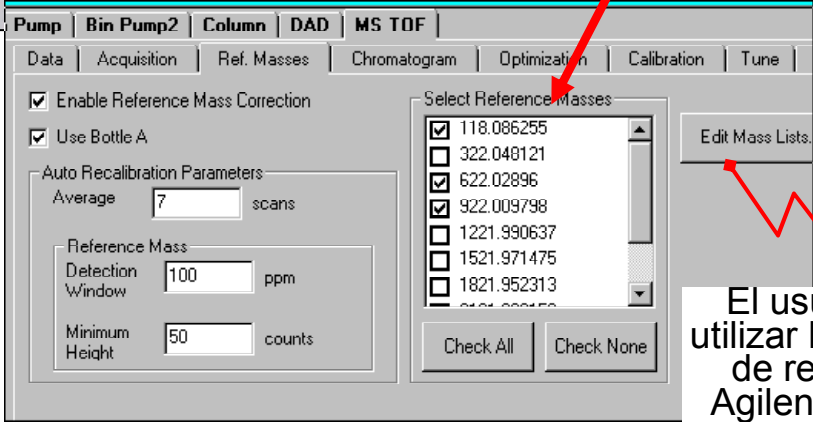
- Incorpora sistema de suministro en continuo de una Solución de Referencia
- Fuente Agilent TOF Series 1100: **MASA EXACTA EN RUTINA** gracias al Diseño con Doble Nebulizador ortogonal para Ionización Independiente de Muestra y Masas de Referencia



Nebulizador Analítico
Nebulizador de Referencia

Fuente compatible con el resto de LC/MS Agilent Series 1100 (Quad's y TRAP's)

Selección Compuestos de Referencia utilizados

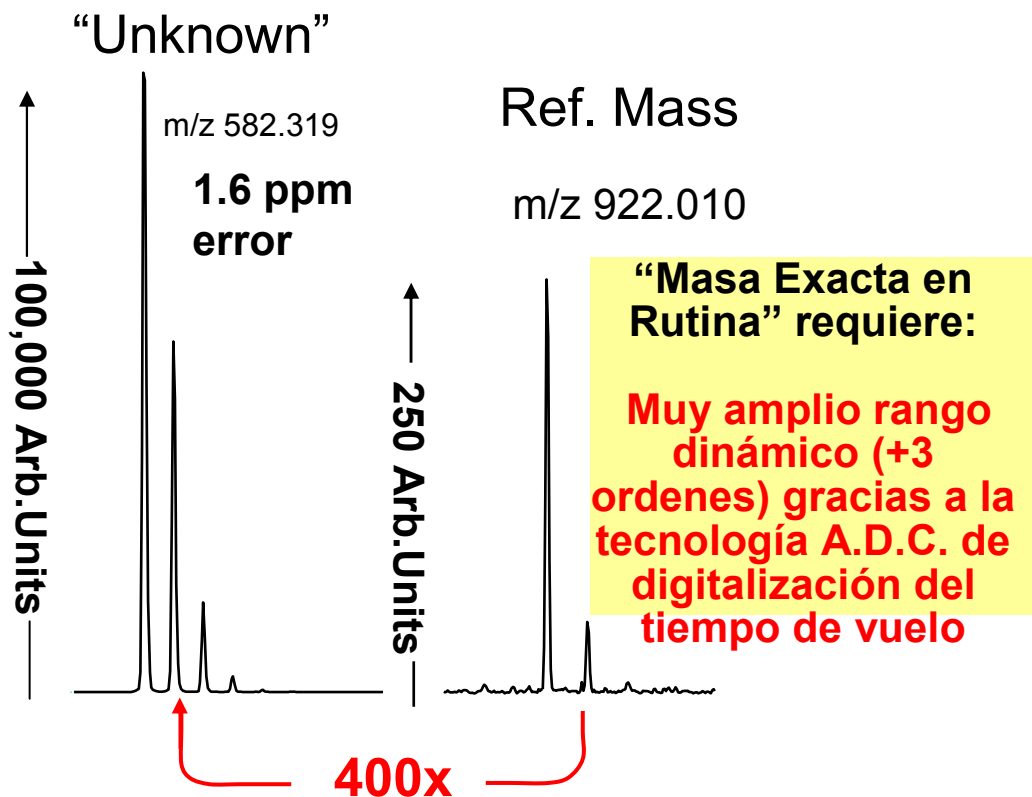


El usuario puede utilizar las soluciones de referencia de Agilent o las suyas propias

The software interface shows the following settings:

- Enable Reference Mass Correction:
- Use Bottle A:
- Auto Recalibration Parameters: Average 7 scans
- Reference Mass: Detection Window 100 ppm, Minimum Height 50 counts
- Select Reference Masses list:
 - 118.086255
 - 322.048121
 - 622.02896
 - 922.009798
 - 1221.990637
 - 1521.971475
 - 1821.952313
- Buttons: Check All, Check None, Edit Mass Lists.

Agilent 1100 LC/MSD TOF: Amplio Rango Dinámico para Corrección Automática con Masas de Referencia para “Masa Exacta” en Operación de Rutina (p.e. m/z 118 y 922)



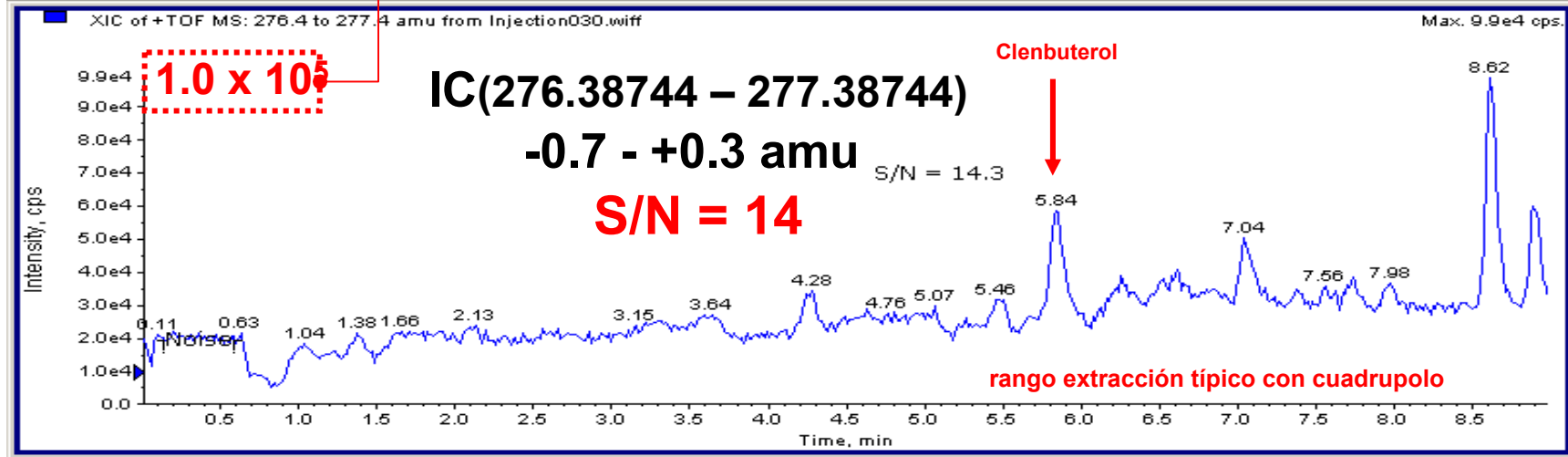
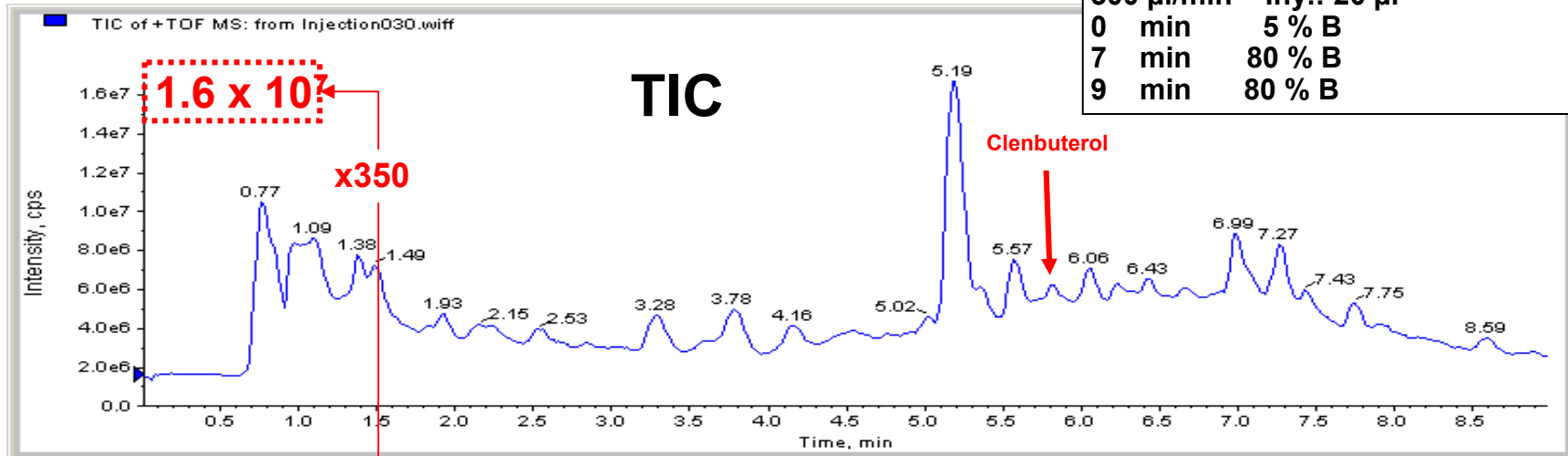
- El amplio rango dinámico espectral permite utilizar como referencia masas a concentraciones mucho más diluidas que el analito (y así pasen desapercibidas en el espectro del analito) .
- Evita tener que efectuar diluciones (el analito puede estar 1000 veces más -concentrado o diluido- que la solución de referencia) .

Theoretical Mass	Abundance Arb. Units	Error (ppm)
487.73253	1316	0.61
450.2364	5304	1.59
722.81666	6611	0.64
417.21191	6910	2.66
512.25457	8978	1.66
464.25036	12534	0.73
519.21717	575	0.06
653.3617	21881	1.38
435.91023	555	-0.28
501.79513	10141	-0.04
820.47251	842	0.25
526.58871	3100	0.35
674.32258	1881	-1.4
480.60877	23885	-2.52
582.31897	49027	1.57
710.84248	3863	-1.16
627.97323	13881	0.55
474.23075	24508	1.13
507.81333	11016	0.68
740.40136	9671	-0.12
784.37501	643	-3.49

Promedio error absoluto masa:
1.0ppm

Selectividad con Extracción 1amu (típica con Q's) Orina añadida con 2ng/ml Clenbuterol (2ppb)

Zorbax XDB-C18 2.1x50mm x3,5µm
 A 5mM NH4OAC/0.1% Acético
 B Acetonitrilo
 300 µl/min Iny.: 20 µl
 0 min 5 % B
 7 min 80 % B
 9 min 80 % B



Selectividad con Extracción +/- 30ppm m/z Orina añadida con 2ng/ml Clenbuterol (2ppb)

