

CURSO “ON LINE” DE CRIBADO NEONATAL

1ª edición



**SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA
Y PATOLOGÍA MOLECULAR**

MODULO 1

TEMA 2: Fundamento de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

José María Egea Mellado

Laboratorio de Metaboloopatías

Centro de Bioquímica y Genética Clínica

Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca

Ctra. Madrid-Cartagena s/n

30120 El Palmar (Murcia)

Teléfono: 968 88 98 60

1. INTRODUCCIÓN

La implantación de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en los programas de cribado neonatal a mediados de la década de los 90 del siglo pasado supuso un gran avance en el diagnóstico neonatal de los errores congénitos del metabolismo (ECM). Esta tecnología tiene una gran sensibilidad, permitiendo la detección de forma simultánea de un número considerable de alteraciones del metabolismo (hasta 40) mediante la cuantificación de aminoácidos y acilcarnitinas en muestras de sangre impregnada en papel procedente de la punción en el talón de un recién nacido. La MS/MS, además, ha permitido disminuir el número de falsos positivos a pesar del incremento del número de trastornos diagnosticados, mejorando el valor predictivo positivo (VPP) de la prueba del talón.

2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas (MS) es, probablemente de entre todas las herramientas analíticas al alcance del científico, la de aplicación más general en el sentido de que la técnica es capaz de suministrar información sobre:

- La composición cualitativa y cuantitativa tanto de analitos orgánicos como inorgánicos en muestras complejas;
- Las estructuras de una amplia variedad de especies moleculares complejas;
- Las relaciones isotópicas de los átomos de las muestras;
- La estructura y composición de superficies sólidas.

En primer lugar, debe señalarse que los pesos atómicos y moleculares utilizados en la bibliografía de espectrometría de masas difieren de los utilizados en la mayoría de otros métodos analíticos, ya que los espectrómetros de masas discriminan entre la masa de los isótopos, mientras que los otros métodos analíticos no lo hacen.

Los pesos atómicos y moleculares se expresan generalmente en términos de unidades atómicas de masa (amu) o dalton. La *unidad de masa atómica* se basa en una escala relativa en la que la referencia es el isótopo del carbono ${}^6\text{C}^{12}$, al cual se le asigna una masa exactamente de 12 amu:

$$1 \text{ amu} = 1/12 \text{ de la masa de un átomo neutro de } {}^6\text{C}^{12} = 1,660543 \cdot 10^{-27} \text{ Kg/atom C}^{12}$$

En espectrometría de masas interesa conocer la masa exacta de los isótopos de un elemento o la masa exacta de los compuestos que contienen un grupo particular de isótopos. Así, se puede tener la necesidad de distinguir entre las masas de compuestos tales como el ${}^{12}\text{C}^1\text{H}_4$ (16,031 uma), ${}^{13}\text{C}^1\text{H}_4$ (17,035 uma) y ${}^{12}\text{C}^1\text{H}_3^2\text{H}_1$ (17,037 uma).

TEMA 2: Fundamento de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

El *peso atómico* o el *peso atómico promedio* (A) de un elemento de la naturaleza viene dada por:

$$A = A_1p_1 + A_2p_2 + \dots + A_np_n$$

Donde A_1, A_2, \dots, A_n son las masas atómicas en *uma* de los n isótopos de un elemento y p_1, p_2, \dots, p_n son las abundancias de estos isótopos en la naturaleza.

El *peso molecular promedio o químico* de un compuesto es, por tanto, la suma de los pesos atómicos químicos para los átomos que aparecen en la fórmula del compuesto.

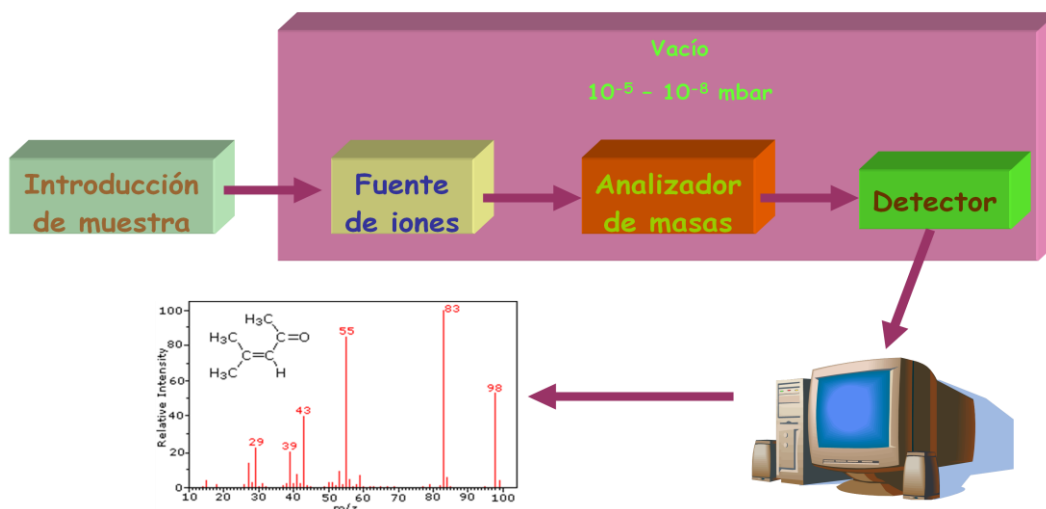
La *relación masa/carga* de un ion atómico o molecular (m/z) es la división de la masa atómica o molecular de un ion m por el número de cargas z que tiene el ion. Debido a que la mayoría de los iones en MS tienen $z=1$, el término m/z a menudo se reduce al término más adecuado de masa.

2.1. Fundamento de la espectrometría de masas (MS)

El análisis mediante espectrometría de masa implica las siguientes etapas (Fig. 1):

- Introducción de la muestra** en fase gaseosa (átomos o moléculas).
- Conversión de una fracción significativa de los átomos o moléculas en iones (carga positiva o negativa) mediante una **fuerza de ionización**.
- Separación de los iones formados según su relación de m/z mediante un **analizador de masas**.
- Recuento de los iones de cada tipo o medida de la corriente iónica producida cuando los iones inciden en un **detector** adecuado.
- Procesamiento de los datos** para obtener un espectro de masas del compuesto estudiado.

Figura 1: Esquema de un espectrómetro de masas

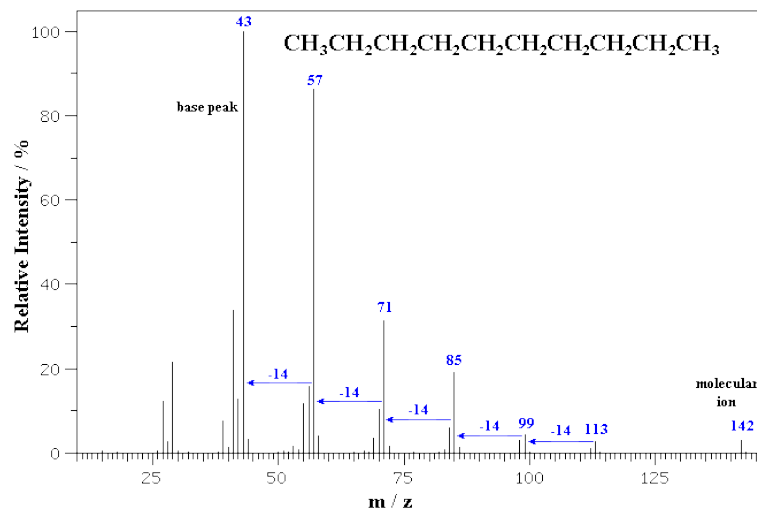


TEMA 2: Fundamento de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

Así, un *espectrómetro de masas* es un instrumento que separa los distintos iones gaseosos formados por un compuesto según su relación m/z . Dichos iones deben poder moverse rápidamente a través del sistema, para ello es necesario conseguir un alto vacío ($10^{-8} - 10^{-4}$ torr) mediante bombas de alto rendimiento.

El *espectro de masas* de un compuesto se obtiene mediante la representación mediante un gráfico de barras de los distintos iones en que se fragmenta dicho compuesto en función de su m/z y en el que la altura de las mismas corresponde a la intensidad relativa de los iones detectados (Fig. 2). Así, se denomina *pico base* al ión que da la señal más intensa (100%), siendo el *ion molecular* (M^+) aquel que resulta de la pérdida de un electrón por parte de la molécula.

Figura 2. Espectro de masas



El espectro de masas se puede utilizar con *fines identificativos*. Además, eligiendo los iones adecuados de un compuesto determinado, se puede llegar a su *cuantificación*.

2.2. Análisis de mezclas complejas mediante MS

Aunque la espectrometría de masas es una poderosa herramienta para la identificación de compuestos puros, es insuficiente para el análisis de mezclas, ya que la interpretación de los espectros de masas obtenidos sería muy complejo o incluso imposible debido al elevado número de iones formados. Así, se han desarrollado métodos en los que el MS se acopla a un sistema de separación eficaz, dando lugar a los denominados métodos acoplados. Los más importantes utilizados en clínica son:

- ✓ La *espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (GC/MS)*: poderosa herramienta para el análisis de mezclas complejas de compuestos orgánicos volátiles
- ✓ La *espectrometría de masas acoplada a la cromatografía líquida (LC/MS)*: más adecuado para el análisis de mezclas de compuestos poco volátiles solubles en disolventes orgánicos.

TEMA 2: Fundamento de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

- ✓ La *espectrometría de masas acoplada a electroforesis capilar (CE/MS)*: importante herramienta para el análisis de grandes biopolímeros como proteínas, polipéptidos y especies de DNA.
- ✓ La *espectrometría de masas en tándem (MS/MS)*: herramienta muy versátil que permite el análisis de mezclas complejas en un tiempo muy corto. También se puede acoplar a sistema cromatográfico generalmente *LC/MS/MS*.

3. COMPONENTES DE UN SISTEMA MS

Para los fines del presente curso veremos los distintos componentes de un sistema de espectrometría de masas centrándonos con más detalle a los propios de un sistema MS/MS.

3.1. Introducción de la muestra

El objetivo del sistema de entrada es introducir una pequeña cantidad de muestra representativa en la fuente de ionización, con una mínima pérdida de vacío. Existen varios sistemas de entrada:

- ✓ *Sistemas indirectos de entrada*: es el más simple de todos en el que la muestra se volatiliza externamente y se introduce en la fuente de ionización que está a baja presión. Es aplicable a muestras gaseosas o líquidas con puntos de ebullición de hasta 500 °C y que son estables a estas temperaturas.
- ✓ *Entrada por sonda directa*: indicado para el análisis de muestras líquidas o sólidas no volátiles las cuales son introducidas directamente en la fuente de ionización mediante un soporte para la muestra o sonda También es utilizada cuando la cantidad de muestra es limitada.
- ✓ *Sistemas de entrada cromatográficos*:
 - *GC/MS* → el caudal de las columnas capilares generalmente es suficientemente bajo como para que la salida de la columna se pueda introducir directamente en cámara de ionización de un MS.
 - *LC/MS* → se han desarrollado varios sistemas de interfase pero el sistema de *electrospray* es el más utilizado ya que permite la introducción directa de todo el efluente de una columna con caudales de hasta 2 mL/min. Así, el líquido se vaporiza al pasar por un tubo capilar de acero inoxidable calentado, formándose un aerosol al salir del mismo. En el aerosol, el analito se ioniza por un mecanismo de intercambio de carga, por tanto, este sistema es también un sistema de ionización (véase los sistemas *API* en siguiente apartado)

3.2. Fuentes de ionización

El aspecto de los espectros de masas para las distintas especies moleculares depende en gran medida del proceso de ionización utilizado. Las fuentes de ionización se pueden clasificar en dos grandes grupos:

TEMA 2: Fundamento de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

a) **Fuentes de ionización duras:** comunican energía suficiente a las moléculas para que se fragmenten en varios iones con una m/z menor que el ión molecular. Los espectros de masas obtenidos nos dan información acerca de la estructura de la molécula y son muy útiles para fines identificativos ya que cada compuesto produce su propio espectro de masas. Sólo aquellos compuestos con igual peso molecular y estructura (p.ej. estereoisómeros) no serían distinguible entre sí por MS.

➤ **Fuente de impacto de electrones:** los electrones son emitidos por un filamento caliente de wolframio o renio y son acelerados como consecuencia de la aplicación de un potencial entre el filamento y el ánodo. Sus trayectorias son perpendiculares a las del analito, colisionando ambos y produciéndose la ionización y posterior fragmentación de la molécula. Este tipo de fuente es muy eficaz, llegando incluso a desaparecer el ion molecular.

b) **Fuentes de ionización blanda:** apenas provocan fragmentación de la molécula y por tanto el espectro de masas consiste principalmente en el ion molecular lo que nos proporciona información sobre el peso molecular exacto de un compuesto determinado. Además es muy útil con fines cuantitativos ya que proporciona una gran sensibilidad. Existen varios tipos de fuente de ionización blanda, siendo los más importantes:

b.1. Fuentes de desorción: se prescinde de la vaporización de la muestra, permitiendo el análisis de moléculas no volátiles y térmicamente inestables.

➤ Ionización por bombardeo de átomos rápidos (**FAB**)

➤ Ionización/desorción de la matriz asistida por láser (**MALDI**)

b.2. Ionización química (CI): los átomos gaseosos de la muestra se ionizan al colisionar con los iones producidos al bombardear con electrones un exceso de gas reactivo (p.ej. metano, amoníaco, etc)

b.3. Ionización a presión atmosférica (API): al actuar a presión atmosférica tiene un altísimo rendimiento. Se trata un sistema de interfase en la LC/MS y las más comúnmente utilizadas son:

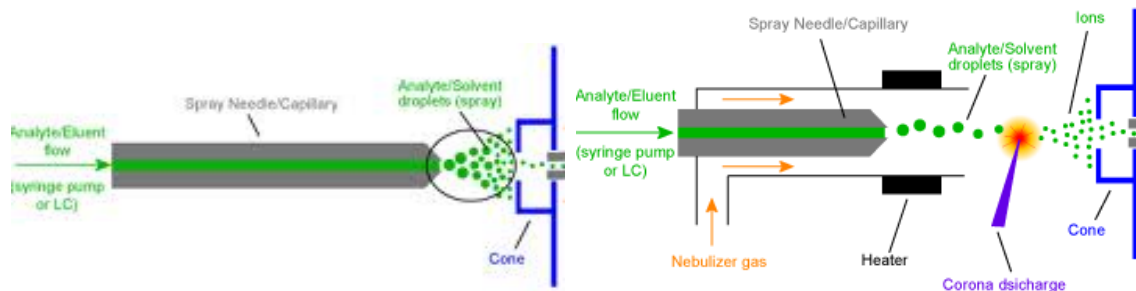
➤ **ionización por electrospray (ESI):** se aplica una tensión de 3-6 KV entre el capilar de entrada de la muestra y el electrodo cilíndrico que rodea al capilar, lo que provoca que la muestra, al salir del capilar, forme un aerosol de pequeñas gotas, las cuales adquieren una elevada carga eléctrica en su superficie (Fig. 3a). En la cámara de desolvatación, la gota adquiere un tamaño cada vez más pequeño como consecuencia de la evaporación del disolvente, de forma que cuando las fuerzas coulombianas de repulsión de las cargas superficiales vencen la tensión superficial de las gotas, éstas literalmente "explotan" y se produce una transferencia de dichas cargas hacia los analitos capaces de adquirirlas. Este tipo de ionización se utiliza para el análisis de compuestos polares, termolábiles o con peso moleculares > 1000 uma.

➤ **Ionización química a presión atmosférica (APCI):** la formación de spray es igual que en ESI pero la ionización se realiza mediante una fuerte descarga (Fig. 3b) que produce un plasma de iones reactivos del disolvente que origina un

TEMA 2: Fundamento de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

mecanismo de ionización de la muestra por ionización química, normalmente por adición o cesión de un protón ($M+H^+$ ó $M-H^-$). Este tipo de fuente es utilizada para el análisis de compuestos poco polares.

Figura 3. a) Fuente de ionización APCI b) Fuente de ionización APCI



3.3. Analizadores de masas

Los analizadores de masa son los encargados de separar los distintos iones que pasan por ellos en función de su relación m/z . Lo ideal es que fuera capaz de discriminar entre diferencias de masa muy pequeñas y además dejar pasar suficiente número de iones para que el detector de una señal fácilmente medible. La capacidad de un espectrómetro de masas para distinguir entre diferentes masas se mide en términos de **resolución (R)**:

$$R = m/\Delta m$$

- m es la **masa nominal**, masa sin decimales, del primer pico.
- Δm es la diferencia entre dos picos adyacentes que están resueltos (la altura del valle entre ellos es $< 10\%$ de su altura).

Así, con una resolución de 4000 podrían diferenciarse masas como 400.0 y 400.1

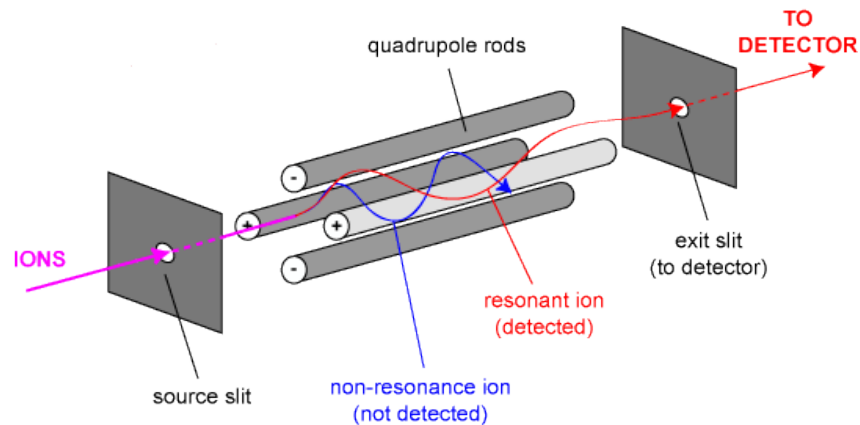
Los analizadores de masas más utilizados son:

- Analizador de sector magnético:** utilizan un imán permanente o un electroimán para hacer que un haz de iones procedente de una fuente de iones se desplace con una trayectoria circular de 180° , 90° o 60° . Las resoluciones que aportan no son muy elevadas ($R < 2000$). Estas resoluciones se pueden mejorar con analizadores de doble enfoque en el que combinan campos magnéticos y electrostáticos.
- Analizadores de tiempo de vuelo (TOF):** los iones son acelerados mediante un pulso de campo eléctrico de 10^3 a 10^4 V. Los iones acelerados pasan a un tubo analizador de aproximadamente un metro de longitud que no está sometido a ningún campo. Idealmente, todos los iones tienen inicialmente la misma energía cinética, pero sus velocidades dentro del tubo deben variar inversamente a sus masas, así, las masas más pequeñas llegan antes que las más pesadas. No presentan buenas resoluciones ($R \approx 10^4$) pero son robustos respecto a otros analizadores además de poder aplicarse a un intervalo de masa casi ilimitado.

TEMA 2: Fundamento de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

- c) **Analizadores de trampa de iones:** los iones quedan confinados en un anillo durante largos periodos de tiempo por la acción de campo eléctricos y/o magnéticos. Los iones con un valor m/z adecuado circulan en una órbita estable dentro del anillo, el resto tienen órbitas inestables y terminan colisionando con las paredes del anillo. Un ejemplo es la **trampa de resonancia iónica ciclotrónica (CIR)**.
- d) **Analizadores cuadrupolo:** consta de cuatro barras cilíndricas paralelas que actúan como electrodos. Las barras opuestas se conectan eléctricamente, un par está unido al polo positivo de una fuente variable de corriente continua y el otro par se une al terminal negativo (Fig 4). Además, se aplican a cada par de barras potenciales variables de corriente alterna de radiofrecuencia, que están desfasados 180° . Los iones son acelerados a través del cuadrupolo. Las tensiones de corriente continua y alterna se incrementa simultáneamente manteniendo constante su relación, sólo aquellos iones que tienen una adecuada relación m/z consiguen tener una trayectoria estable y pasan al detector, el resto termina colisionando con las barras.

Figura 4. Esquema de un analizador cuadrupolo

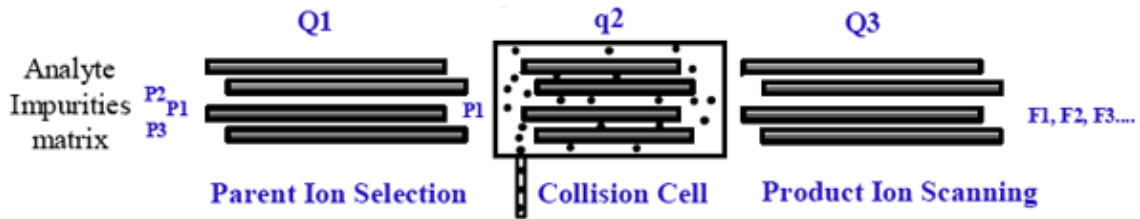


Actualmente, son los analizadores más utilizados (son baratos y robustos) y presentan una elevada velocidad de barrido. Pueden trabajar en dos modos:

- **Modo (SIM):** se fijan las condiciones para que sólo pase un ion con una determinada m/z
 - **Modo SCAN:** se hace un barrido de masas entre un determinado intervalo de m/z
- e) **Analizador de triple cuadrupolo (MS/MS):** se trata de una configuración de tres cuadrupolos situados de forma secuencial, de forma que el primero y último (Q1 y Q3) actúan como cuadrupolos normales, mientras que el segundo tiene unas características especiales y se denomina **celda de colisión** (Fig 5). En esta celda se introduce una pequeña cantidad de gas (He, Ar), de forma que los iones que entran, colisionan con los mismos fragmentándose. Los iones formados pasan al Q3 para finalmente ser analizados.

TEMA 2: Fundamento de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

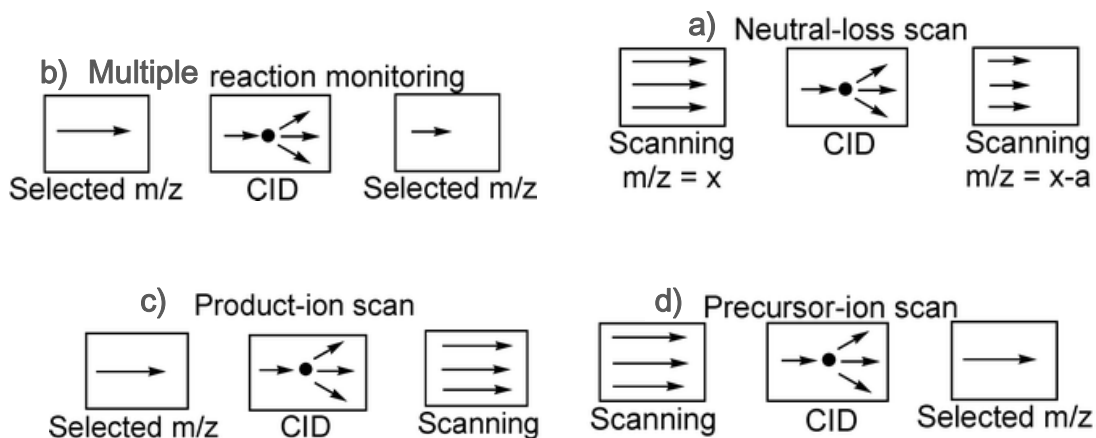
Figura 5. Espectrómetro de triple cuadrupolo



Así, mientras que la celda de colisión no se utiliza como filtro de masas, los cuadrupolos Q1 y Q3 si funcionan como tales y pueden trabajar en modo SIM o SCAN de forma independiente. La combinación de Q1 y Q3 permite trabajar en cuatro modos diferentes:

- **Multiple Reaction Monitoring (MRM):** los dos cuadrupolos trabajan en modo SIM. Con este modo se detectan de forma específica cada uno de los compuestos que nos interesan eligiendo correctamente el ion en Q1 y en Q3. (Fig. 6a)
- **Neutral Lost Scan (NLS):** los dos cuadrupolos trabajan en modo SCAN. Con este modo se detectan compuestos que en la fragmentación en la celda de colisión se generan una o más moléculas neutras, las cuales se quedan en dicha celda y no pasan al Q3. (Fig. 6b)
- **Precursor Ion Scan (PIS):** en el que el Q1 está en modo SCAN y el Q3 en modo SIM. Con este modo se detectan productos que rinden un mismo fragmento tras su paso por la celda de colisión. (Fig. 6c)
- **Product Ion Scan:** en el que el Q1 está en modo SIM y el Q3 en modo Scan. Esta modalidad es utilizada principalmente para la puesta a punto de los métodos para la determinación los analitos que nos interesan. (Fig. 6d)

Figura 6. Modos de trabajo de un MS/MS



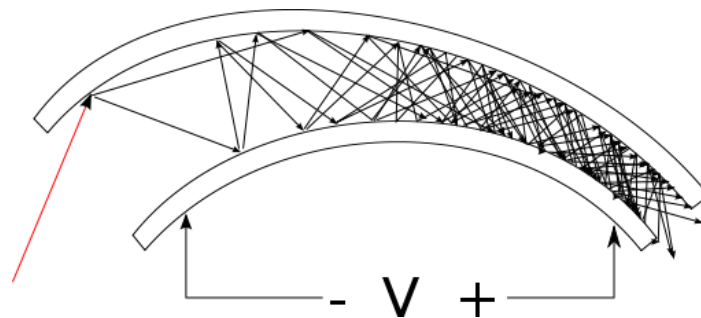
3.4. Detectores

Los detectores deben ser capaces de generar una corriente eléctrica proporcional al número de iones que llegan al mismo. La detección de los iones está basado en su carga, en su masa o en su velocidad. La eficiencia de un detector disminuye con la masa del ion, así los detectores están limitados a iones de m/z no muy grandes.

TEMA 2: Fundamento de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

- a) **Copa de Faraday:** se basa en la carga del ion y la corriente que se genera cuando impacta en la superficie del detector y es neutralizado. Tiene una baja sensibilidad y respuesta lenta.
- b) **Canales electromultiplicadores:** se basa en la energía cinética de los iones que impactan en la superficie del detector. Consta de una serie de dínodos de forma que cada dínodo se mantiene a un potencial más alto que el anterior. Cuando la superficie de un dínodo es alcanzado por un ión se produce la emisión de varios electrones, los cuales son acelerados hacia el siguiente dínodo de forma que cada electrón es capaz de provocar la emisión de varios electrones en dicho dínodo, y así sucesivamente, consiguiéndose ganancia de corriente de hasta 10^8 .

Figura 7. Esquema de un electromultiplicador de dínodo continuo



- c) **Detector de iones electro-óptico:** convierte el impacto de los iones en electrones y éstos en fotones mediante un material fosforescente que finalmente mediante un fotomultiplicador da la señal a medir. Tienen una vida operativa más larga que los electromultiplicadores, tienen una respuesta muy rápida y una sensibilidad similar.

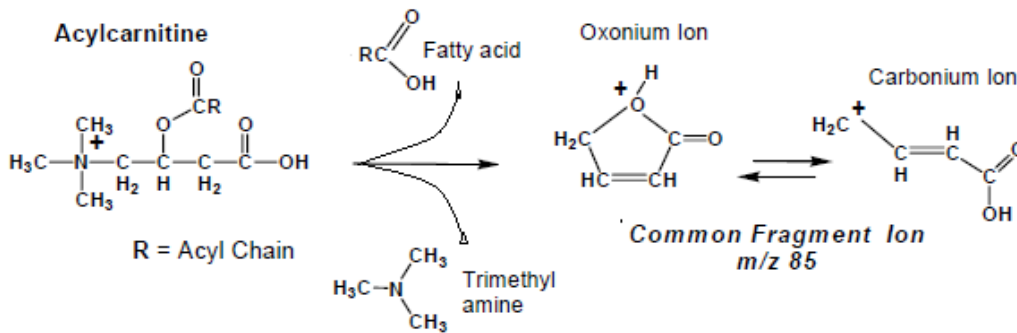
4. CASO PRÁCTICO: DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS Y ACILCARNITINAS EN SANGRE IMPREGNADA EN PAPEL.

En los programas de cribado neonatal se recoge sangre capilar mediante punción en el talón del recién nacido y se impregna en papel cromatográfico, el cual se envía a los laboratorios de cribado para su análisis. Debido a que la cantidad de muestra disponible es muy pequeña, necesitamos un método con gran sensibilidad y además, como el número de muestras que hay que analizar al día es elevado (>150 muestras), necesitamos un método rápido y fiable. Todas estas prestaciones nos la ofrece la MS/MS, la cual nos va a permitir la cuantificación de aminoácidos y acilcarnitinas con la suficiente exactitud y reproducibilidad en muestras de sangre impregnada en papel. Tras una extracción de los analitos mediante una solución de metanol, el extracto se infundona en el sistema MS/MS mediante una bomba LC y la ionización se realiza mediante electrospray (LC/ESI/MS/MS)

La detección de acilcarnitinas se va a realizar trabajando en modo PIS ajustando el Q3 para que sólo llegue al detector los iones de $m/z = 85$ amu, que es el fragmento común que se van a formar las acilcarnitinas en la celda de colisión (Fig. 8)

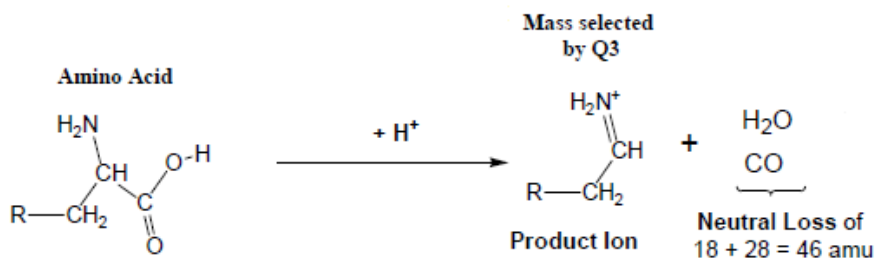
TEMA 2: Fundamento de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

Figura 8. Fragmentación de las acilcarnitinas en la celda de colisión



La detección de los aminoácidos se va a realizar trabajando en modo NLS ya que los aminoácidos se fragmentan en la celda de colisión rindiendo dos moléculas neutras cuya masa suma 46 amu (Fig. 10)

Figura 10. Fragmentación de los aminoácidos en la celda de colisión



Tanto la detección de aminoácidos como de acilcarnitinas se puede realizar también mediante el modo MRM.

5. BIBLIOGRAFIA

Hoffmann, E and Stroobant, V. "Mass Spectrometry. Principles and Applications". 2007 Third Revised Edition. Ed. John Wiley & Sons, Ltd

Skoog, DA; Holler, FJ y Nieman, TA. "Principios de Análisis Instrumental". 2001 Quinta edición. Cap 11: "Espectrometría de masas atómica". Pag: 281-302. McGraw Hill Interamericana de España SL.

Skoog, DA; Holler, FJ y Nieman, TA. "Principios de Análisis Instrumental". 2001 Quinta edición. Cap 20: "Espectrometría de masas molecular". Pag: 537-575. McGraw Hill Interamericana de España SL.

Van Bramer, SE. "An Introduction to Mass Spectrometry". 1998. <http://science.widener.edu/svb/massspec/massspec.pdf>