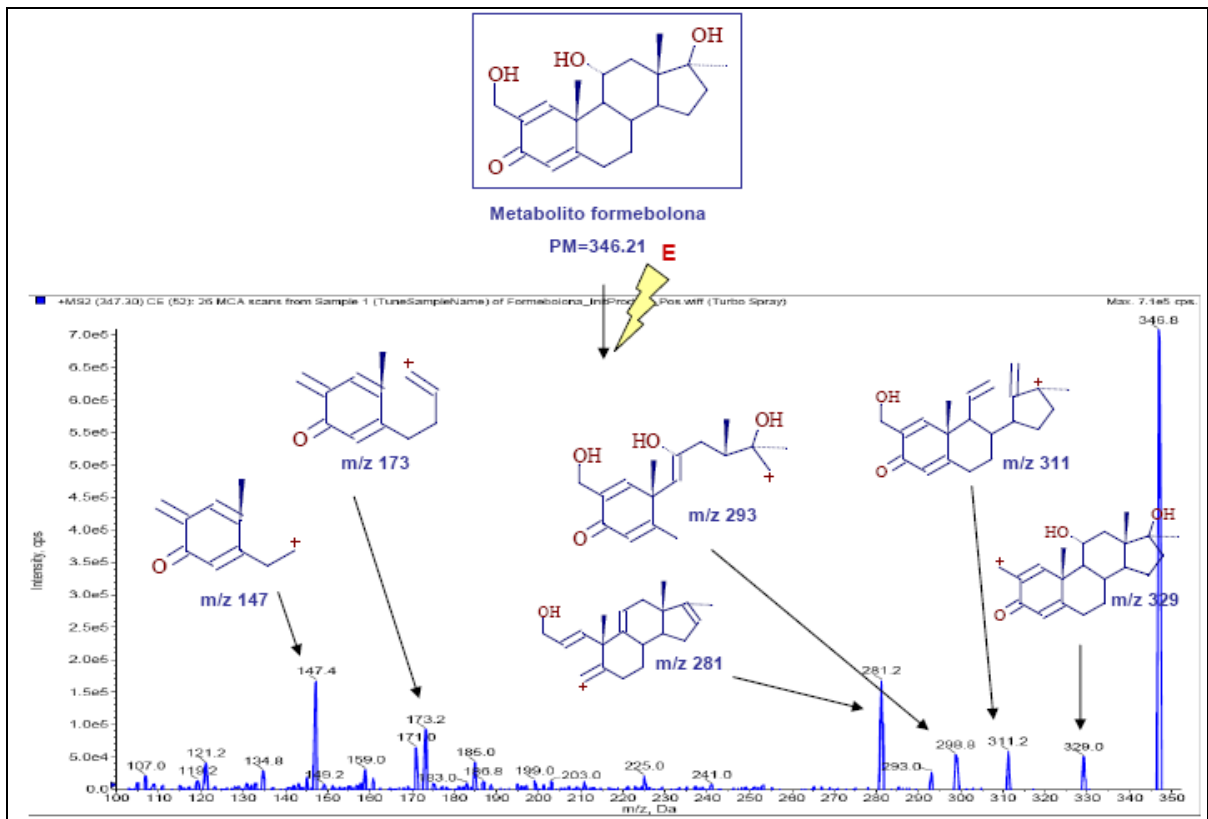


ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

La **espectrometría de masas** es una técnica instrumental universal y específica, altamente sensible y que permite la identificación inequívoca de una sustancia.

El principio de la espectrometría de masas es la producción de iones a partir de compuestos neutros y la observación de la subsiguiente descomposición de esos iones. Estos iones descompuestos (fragmentos que también poseen carga) se mueven rápidamente y son "clasificados" de acuerdo a su relación m/z (masa/nº de cargas del ión). El espectrómetro de masas no solo clasifica los fragmentos, sino que además mide la cantidad de ellos que se forman.

Cuando a una molécula se le suministra una determinada energía la molécula se descompone siguiendo un patrón concreto en el que se obtienen siempre los mismos fragmentos y en la misma relación de intensidad. Este patrón concreto se representa gráficamente en el espectro de masas, al que denomina por esta razón "huella digital de la sustancia". De esta forma, el espectro de masas permite la identificación inequívoca de las moléculas.



Los espectrómetros de masas son instrumentos sofisticados que en general constan de:

- A) Un **sistema de introducción de muestra**, que puede ser entre otros un cromatógrafo de líquidos o un cromatógrafo de gases.
- B) Una **fente de ionización**, que es donde se produce la fragmentación molecular característica de cada compuesto,
- C) Un **analizador** o filtro de masas que separa los fragmentos iónicos generados en función de su relación masa/carga
- D) Un **detector** que recoge y caracteriza los fragmentos iónicos que salen del analizador.

Además todo el sistema se encuentra sometido a alto vacío (1×10^{-4} - 1×10^{-5} torr.) para evitar colisiones entre los fragmentos iónicos generados.

Existen diferentes tipos de espectrómetros de masas en función del analizador que posean. Los analizadores más comunes son: cuadrupolo (Q), triple cuadrupolo (QqQ), sector magnético, trampa de iones (IQ), tiempo de vuelo (TOF).

La elección del **sistema de introducción de muestra** en el espectrómetro de masas dependerá de las propiedades físico-químicas de los compuestos a detectar. El acoplamiento de la cromatografía tanto líquida (LC) como gaseosa (GC) como sistema de introducción de muestra, incrementa la capacidad de identificación de la técnica, proporcionando una herramienta de identificación y confirmación única.

La **fente de ionización** es el lugar del espectrómetro de masas en el que se introduce la muestra y en el que se produce la ionización.

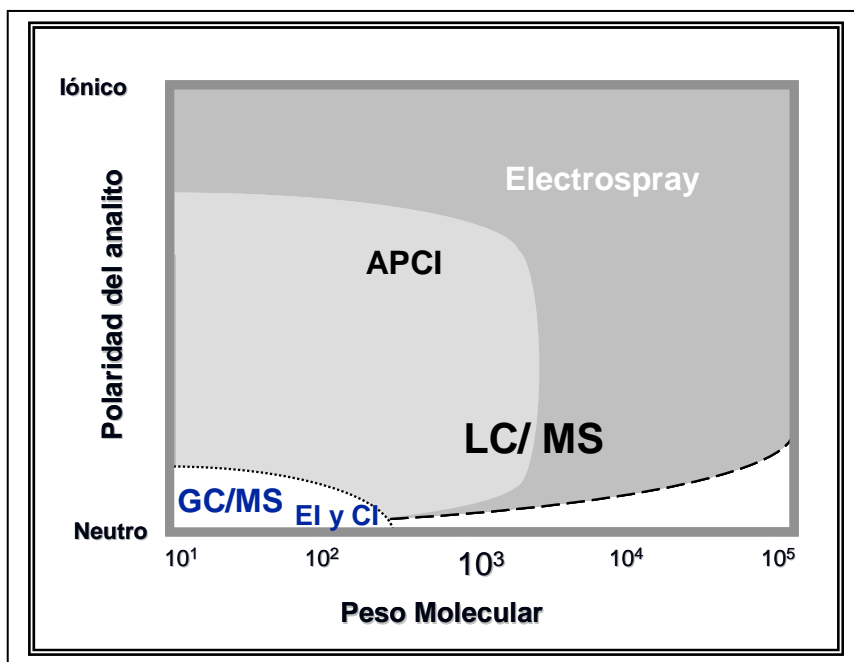
Cuando el sistema de introducción de muestra es un acoplamiento GC, la muestra se encuentra en estado vaporizado y la única función de la fuente de ionización es ionizar las moléculas neutras (conferirles carga) por aplicación de una determinada energía. En este tipo de acoplamientos la ionización se produce en estado de vacío.

En el caso de los acoplamientos LC, las fuentes de ionización son interfases más sofisticadas que han tardado casi más de 30 años en ser desarrolladas. Este lento desarrollo se ha debido a que en el acoplamiento LC la muestra se encuentra disuelta en el efluente procedente del sistema LC. Esto resulta incompatible con el alto vacío requerido en la espectrometría de masas. Por esta razón, las interfases o fuentes de ionización desarrolladas han tenido la doble función de eliminar el disolvente (normalmente presente en ordenes de 0.5-0.5 ml/min), y vaporizar la muestra e ionizarla. En este acoplamiento, la ionización se produce a presión atmosférica.

En la tabla siguiente se pueden observar las técnicas de ionización más habitualmente empleadas en los acoplamientos GC y LC.

	TIPO	CARACTERISTICAS	LIMITACIONES
ACOPPLAMIENTO GC	IONIZACIÓN POR IMPACTO ELECTRONICO (EI)	<ul style="list-style-type: none"> • Universal (ioniza gran variedad de moléculas). • Muy reproducible (permite creación de librerías espectrales). • Moléculas se ionizan por bombardeo de un haz de electrones con carga de 70eV (generalmente). 	<ul style="list-style-type: none"> • En algunos casos, excesiva fragmentación de moléculas. • Moléculas termolábiles se degradan al vaporizarse. • Solo EM de iones positivos. • Poco selectivo.
	IONIZACIÓN QUÍMICA (CI)	<ul style="list-style-type: none"> • Es más suave y más controlable. (Menor descomposición de moléculas). • Obtención de iones quasimoleculares. Permiten determinar peso molecular. • Moléculas se ionizan por colisión con un gas reactivo. (metano, amoniaco). • En función gas seleccionado, la ionización puede ser universal o selectiva. 	<ul style="list-style-type: none"> • Poco reproducible. Las abundancias relativas de los iones presentan mayor variabilidad. Dificulta creación librerías espectrales. • Ionización en estado gaseoso: Moléculas termolábiles se degradan.
ACOPPLAMIENTO LC	IONIZACIÓN POR ELECTROSPRAY (ESI)	<ul style="list-style-type: none"> • Permite obtener iones multicargados (posibilidad análisis péptidos y proteínas) • Funciona bien con ácidos y bases preformados en disolución y con compuestos a los que se les pueda inducir carga (analitos polares o con heteroátomos). • No utiliza temperaturas elevadas (permite análisis moléculas lábiles). • Se pueden obtener espectro de masas de iones positivos y negativos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Es una ionización muy suave. Genera pocos fragmentos (poca información estructural). • Suelen formarse aductos con los tampones utilizados en la fase móvil de LC. • La sensibilidad es muy dependiente del flujo de fase móvil del LC y del pH de esta.
	IONIZACIÓN QUÍMICA A PRESIÓN ATMOSFÉRICA (APCI)	<ul style="list-style-type: none"> • Es una ionización química mediante reacciones ión-molécula a presión atmosférica. • Permite análisis de moléculas con bajo peso molecular no volátiles. • Su sensibilidad no depende el pH ni del flujo de fase móvil. • Más sensible que ESI. • Permite obtener EM de iones positivos y negativos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Es una ionización muy suave. Genera pocos fragmentos (poca información estructural). • Ionización se produce en fase gaseosa: algunas moléculas lábiles pueden descomponerse por la temperatura.

En el gráfico siguiente se observa el rango de aplicación de las diferentes técnicas de ionización de acuerdo al tamaño y a la polaridad de las sustancias.



El **analizador** es la parte del espectrómetro de masa donde tiene lugar la separación (o clasificación) de los fragmentos iónicos generados en función de su relación masa/carga. Esta separación se produce por aplicación de diferentes campos eléctricos y magnéticos.

Existen diferentes tipos de analizadores que poseen unas características diferentes en lo que se refiere a sensibilidad, rango de masas que se puede separar y capacidad de separar masas que se diferencian solo en decimales (resolución).

Los tipos de analizadores más utilizados son:

El analizador de masas tipo **cuadrupolo (MS)** está formado por cuatro barras conductoras de sección hiperbólica alineadas paralelamente entre sí y equidistantes de un eje central imaginario situado sobre el eje Z, donde los segmentos opuestos están conectados y los segmentos adyacentes están eléctricamente aislados. Se aplica una combinación de corriente continua (DC) y voltajes de radiofrecuencia (RF) sobre los pares de segmentos. La magnitud del voltaje de radiofrecuencia determina la relación masa/carga que es capaz de describir una trayectoria tal que atraviesa el analizador y alcanza el detector. De modo que variando dicha magnitud se podrán detectar los fragmentos iónicos cargados positivamente que se generaron en la fuente de ionización y que son característicos de cada compuesto.

Este tipo de analizador es robusto y muy reproducible. Es muy utilizado en el modo SIM (Selected Ion Monitoring) en el que solo filtra los iones de unas relaciones m/z concretas. Esto permite obtener espectros de masas muy simples (con muy pocos iones) pero que son muy sensibles. Además la respuesta lineal a la concentración es muy buena, por lo que son muy utilizados para llevar a cabo análisis de cuantificación.

El analizador de masas tipo **trampa de iones (MS^n)**, se caracteriza porque tanto la ionización, como la separación y la detección de los iones tiene lugar en el mismo espacio, produciéndose de forma secuencial en el tiempo. La trampa de iones está formada por tres electrodos hiperbólicos: un electrodo con forma de anillo y dos electrodos por encima y por debajo del anillo. Una vez que las moléculas del compuesto de interés llegan a la trampa, son ionizadas y fragmentadas. Los iones son retenidos o expulsados de la trampa en función de su relación masa/carga, ya que, para unos voltajes de RF y DC dados, sólo determinadas relaciones m/z describirán trayectorias tales que permitan que el ion se encuentre confinado en la trampa. Una vez que los iones son expulsados de la trampa pasan al detector.

Este tipo de analizador es muy útil para obtener espectros de masas en modo Scan en los que se filtran todos los iones comprendidos en un rango m/z determinado. Este tipo de espectros son muy ricos en iones y muy informativos. A diferencia de los analizadores de tipo cuadrupolar, en los analizadores de tipo trampa de iones estos espectros pueden ser obtenidos sin que se produzca una considerable pérdida de sensibilidad.

Otra característica de estos analizadores es que permiten obtener espectros de masas de iones productos (MS^n) lo que tiene mucho interés en la elucidación estructural.

El analizador de masas tipo **sector magnético (HRMS)**, opera según el principio de la dispersión del haz de iones cuando se le somete a un campo magnético intenso. Son equipos voluminosos y que requieren un alto vacío ($10E-7$ torr). Para iones de una sola carga y considerando un campo magnético y un voltaje de aceleración constantes la masa es directamente proporcional al radio del arco descrito por los iones, de modo que éstos se pueden separar en función de su masa. Variando el campo magnético aplicado se van seleccionando todos los fragmentos iónicos generados. Además el campo magnético produce un enfoque direccional del haz de iones. Los campos electrostáticos permiten corregir la dispersión del haz de iones que conduce a una pérdida de resolución.

La característica principal de este tipo de analizadores es que permiten trabajar a alta resolución (diferenciar relaciones m/z que solo difieren a partir del cuarto decimal) con gran sensibilidad.

El analizador **triple cuadrupolo (QqQ)**, consiste en tres cuadrupolos conectados en serie. El cuadrupolo 1 (Q1) y el cuadrupolo 3 (Q3) funcionan como dos analizadores de tipo cuadrupolo conectados en serie. El cuadrupolo 2 (q2), o celda de colisión, se sitúa entre medias de Q1 y Q3. Es un cuadrupolo especial en el que se aplica una energía, energía de colisión (CE), que permite fragmentar los iones obtenidos en la fuente de ionización. Esta energía puede tomar diferentes valores, lo que permite obtener espectros de masas en los que aparecen diferentes fragmentos y/o diferentes relaciones de intensidad entre ellos.

El modo de adquisición más utilizado en los triple cuadrupolos es el MRM (Multiple Reaction Monitoring). Este modo permite obtener EM altamente selectivos, con gran sensibilidad, pero con pocos iones (poca información). Es muy útil en los procesos en los que se requiere analizar unas sustancias muy concretas, de las que se conoce el peso molecular y el patrón de fragmentación.

Permiten también la obtención de espectros de masas de iones precursores y pérdida de neutros. Este tipo de espectros son poco sensibles pero muy útiles en el análisis de sustancias desconocidas que presentan estructura similar a alguna sustancia conocida, bien porque pertenezcan a la misma familia farmacológica o porque sea metabolito de esta.

Finalmente, el analizador de tipo **triple cuadrupolo-trampa lineal (Qtrap)**, consiste en un sistema similar al triple cuadrupolo (QqQ) en el que el Q3 es modificado para poder "atrapar" iones. Sobre Q3 se aplica un campo eléctrico axial que permite el flujo de los iones a través de Q3. Al final de este se aplica un elevado voltaje que bloquea la salida de los iones. También se aplica una radiofrecuencia que mantiene los iones suspendidos en el interior de Q3. De esta manera se consigue tener los iones confinados en Q3 durante un tiempo (tiempo de llenado) antes de ser expulsados hacia el detector. Esto conduce a que una mayor densidad de iones de un mismo analito llegue al detector al mismo tiempo, lo que se traduce en una mayor sensibilidad en el análisis.

Otra característica de este tipo de analizador es que se puede regular la velocidad de selección o filtro de los iones con diferentes m/z . Esto permite regular la resolución y la sensibilidad del análisis (a menor velocidad se obtiene mejor resolución, aunque peor sensibilidad).

Además, en estos analizadores los iones precursores obtenidos en la fuente de ionización y fragmentados en q2, pueden volver a ser fragmentados por la RF aplicada en Q3. Lo que posibilita la obtención de espectros de masa MS^n .