

Tema 2:
Técnicas espectroscópicas

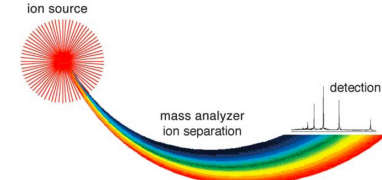


ESPECTROMETRIA DE MASAS (MS)

- Repaso: ¿Qué es la MS? Fundamentos. El espectrómetro de masa
- Métodos y fuentes de ionización. MALDI; ESI
- Aplicaciones en biotecnología

1

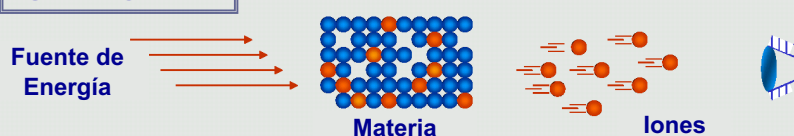
Repaso



¿Qué es la Espectrometría de Masas?

La **Espectrometría de Masas (MS)** es una técnica analítica que permite **determinar** el **Peso Molecular** y la **Estructura Molecular** de una molécula a partir de medir la **relación masa/carga (m/z)** de iones.

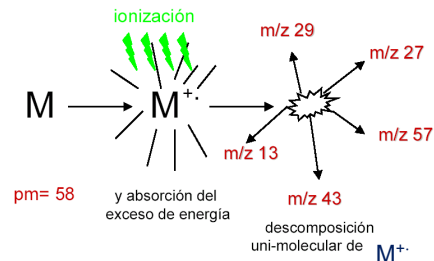
ESPECTROMETRÍA



Fuente de Energía → Materia → Iones → [Detector]

2

Repaso



Sólo se detectan los fragmentos con **CARGA** (+ o -).

Podemos ver la molécula "completa" → **ión molecular**. De este modo conocemos el **Peso Molecular**!

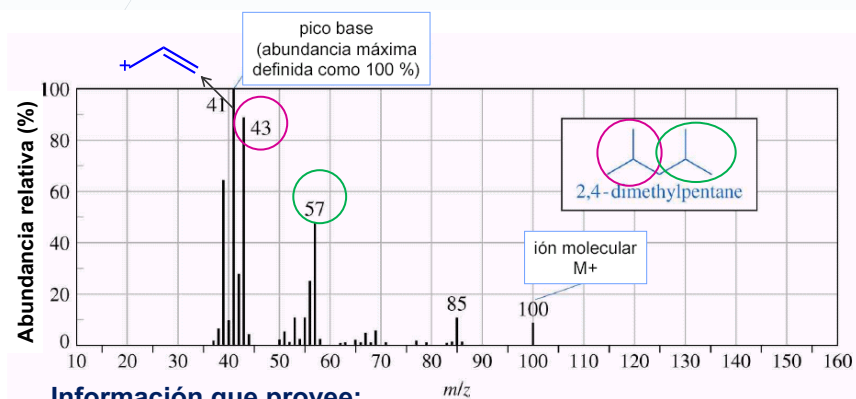
El Ión Molecular puede fragmentarse → Podemos ver los fragmentos de una molécula → **Patrón de ruptura característico de una molécula** → **Información estructural**.

Podemos ver el Ión Molecular y sus Fragmentos simultáneamente.

3

Repaso

El espectro de masas



Información que provee:

- Peso molecular
- Fórmula molecular (alta resolución)
- Estructura (patrón de fragmentación)

4

Repaso

El espectrómetro de masas

Características generales

- ❖ Capaz de vaporizar sustancias de volatilidades muy diferentes.
- ❖ Capaz de generar los iones a partir de las moléculas neutras en fase gaseosa.
- ❖ Capaz de separar los iones acorde a su relación m/z .
- ❖ Capaz de detectar los iones formados y registrar esta información apropiadamente.

http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/.../espectrometria_de_masas.pdf

5

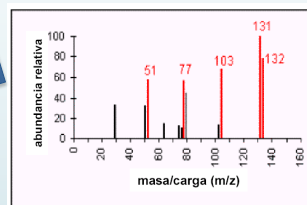
Repaso

El espectrómetro de masas

El sistema requiere alto vacío

10^{-5} - 10^{-8} torr para proporcionar a los iones un camino libre de colisiones

Bombas: turbomoleculares o difusoras



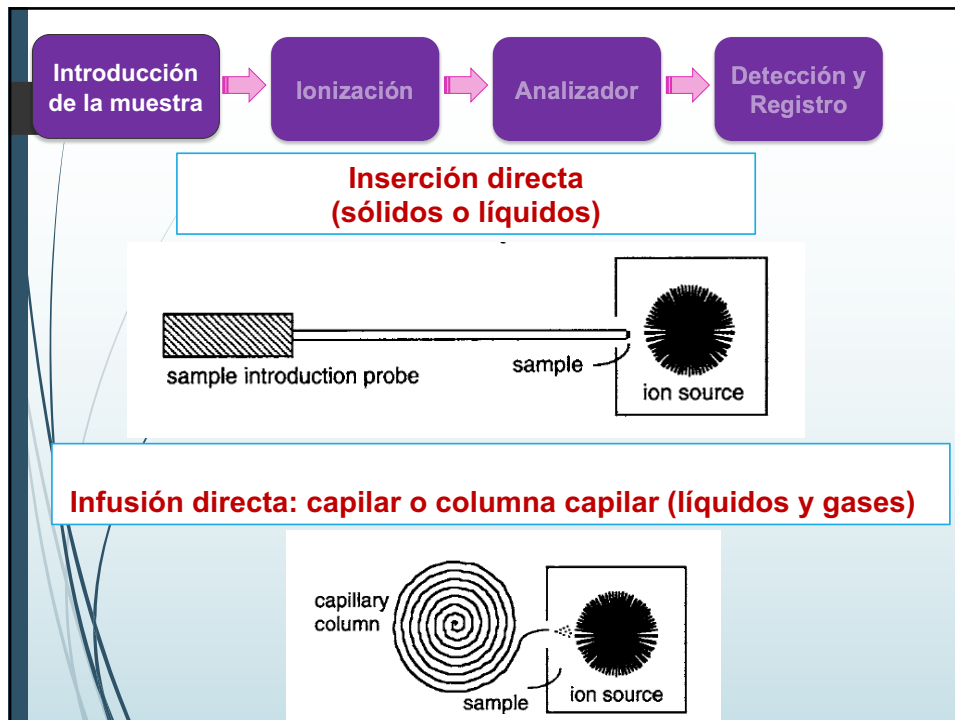
Introducción
de la
muestra

Ionización

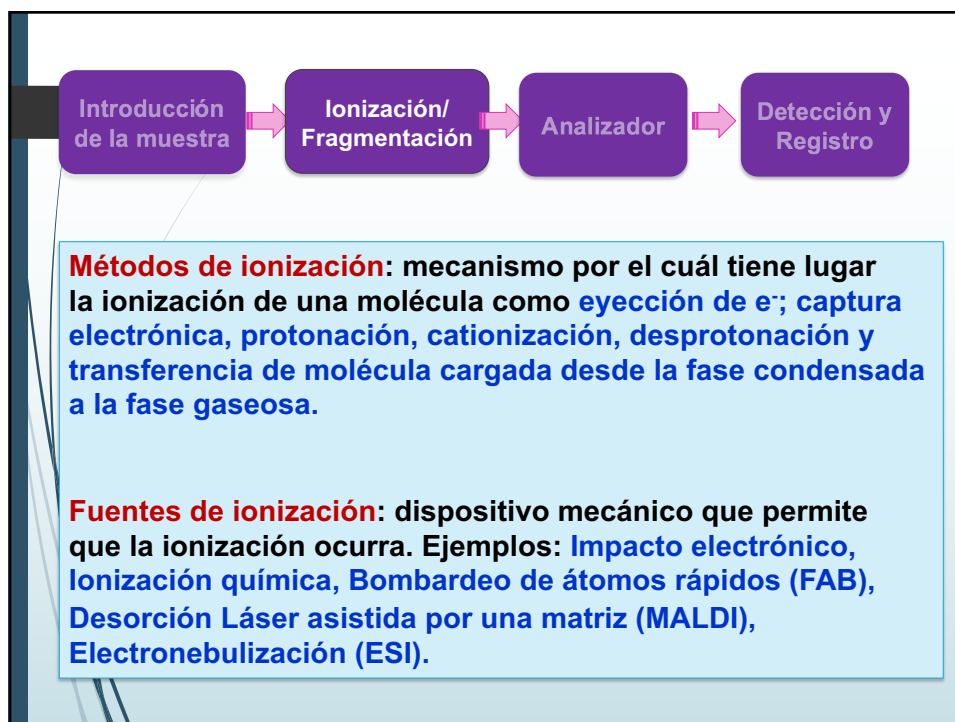
Analizador

Detección y
Registro

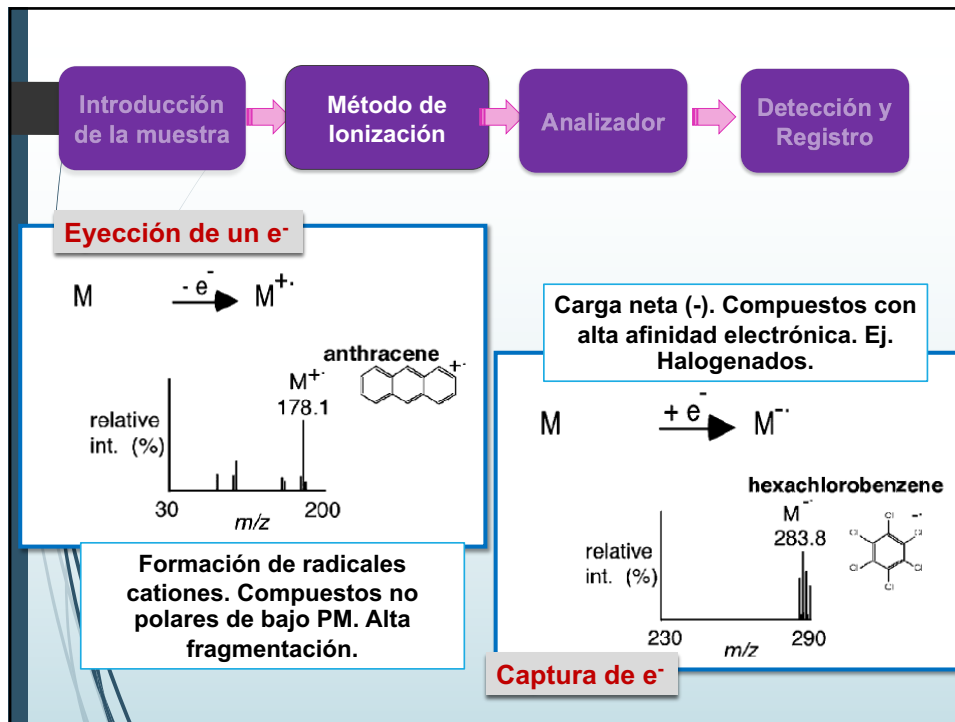
6



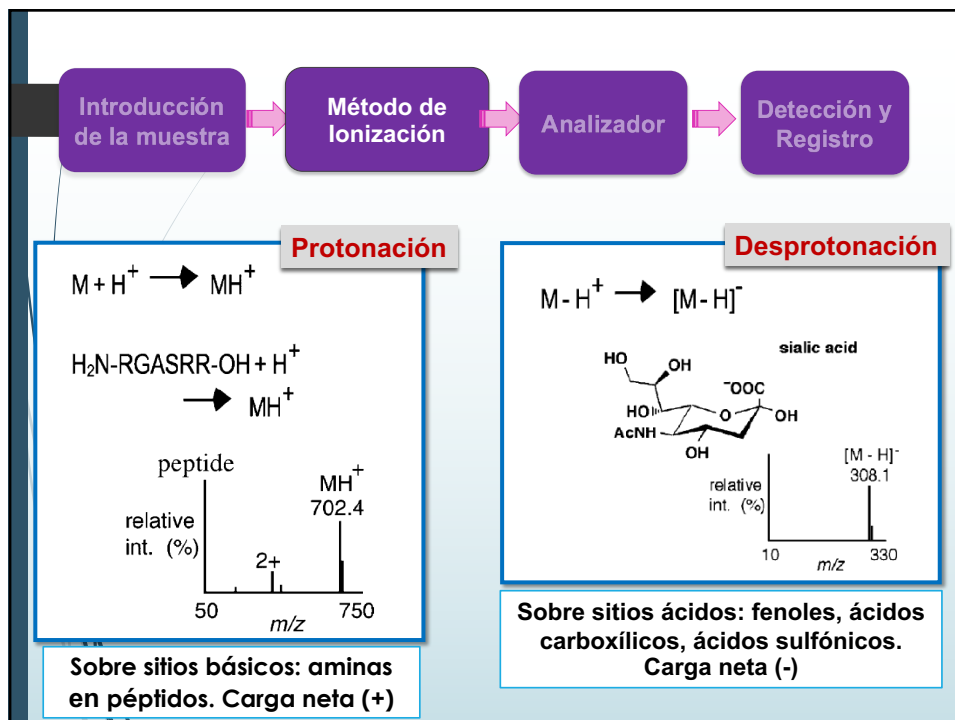
7



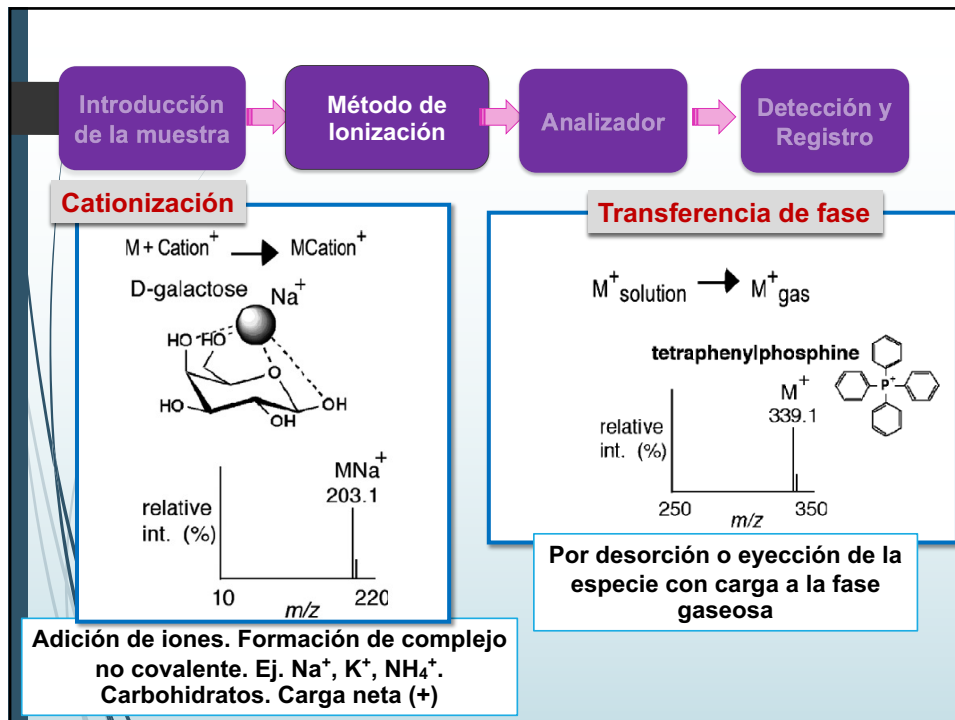
8



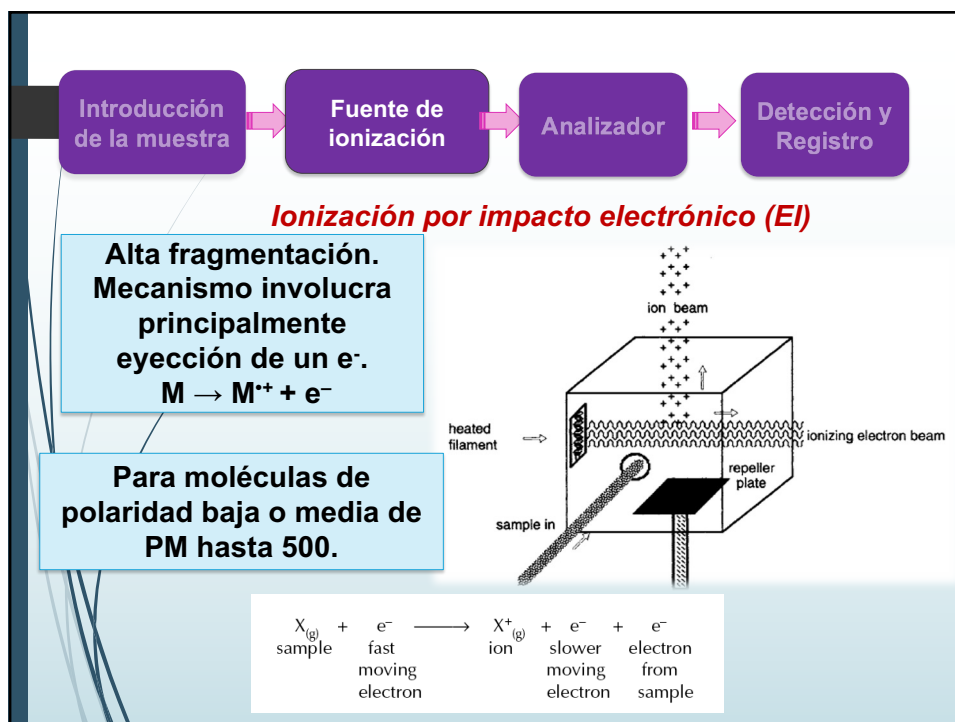
9



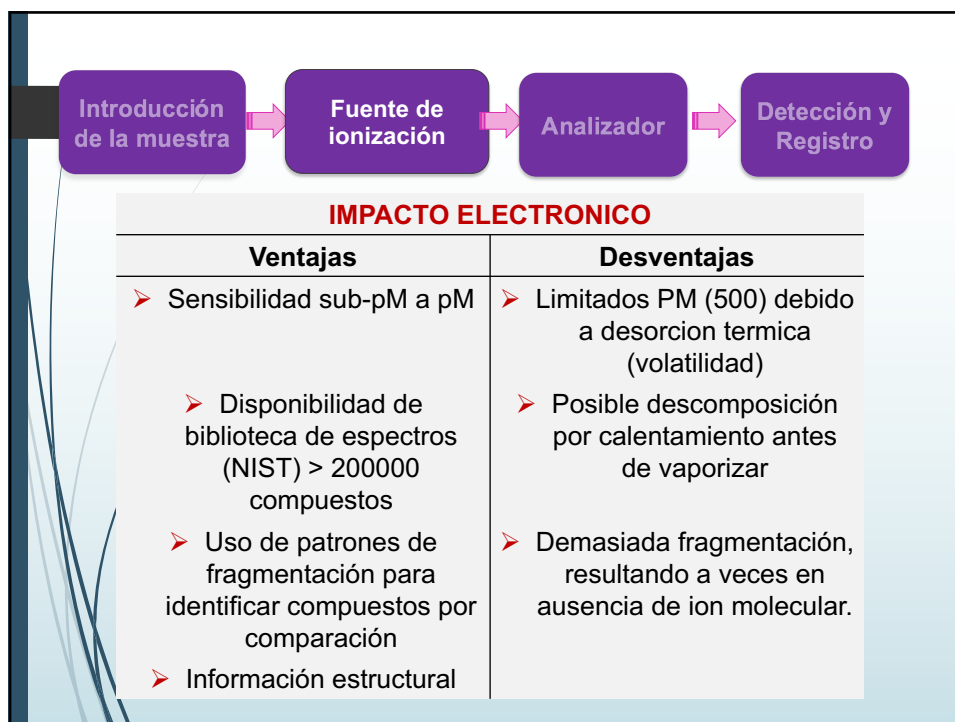
10



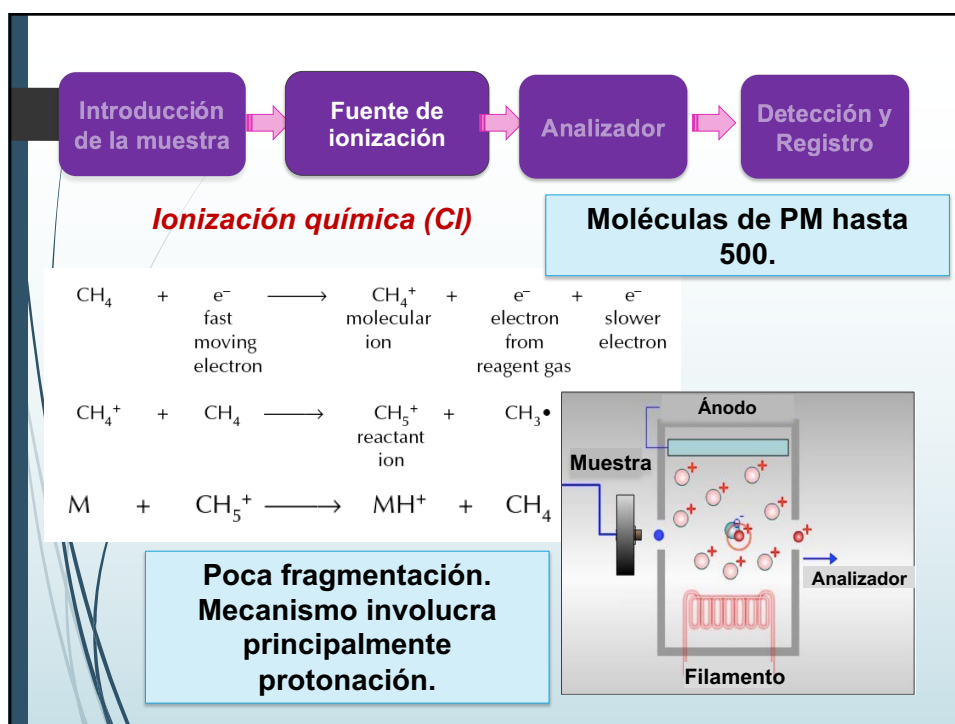
11



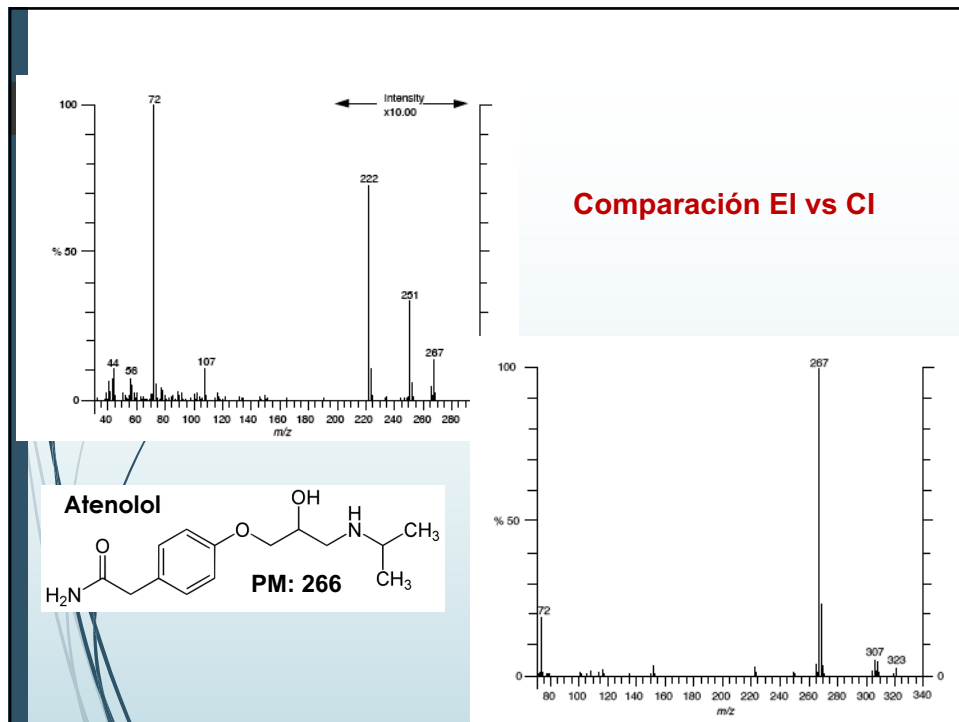
12



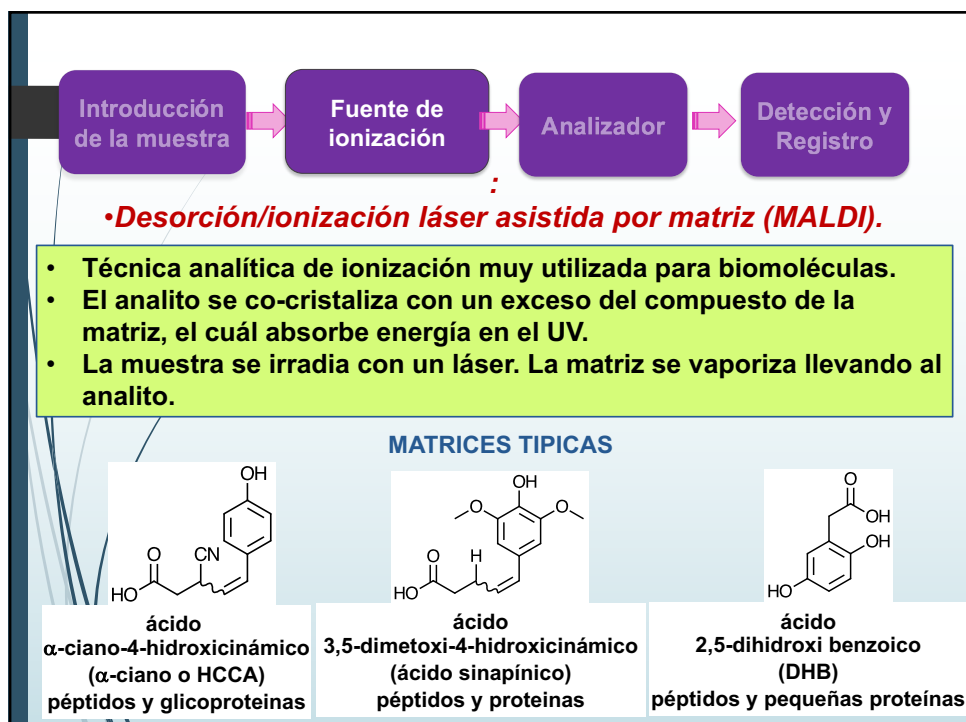
13



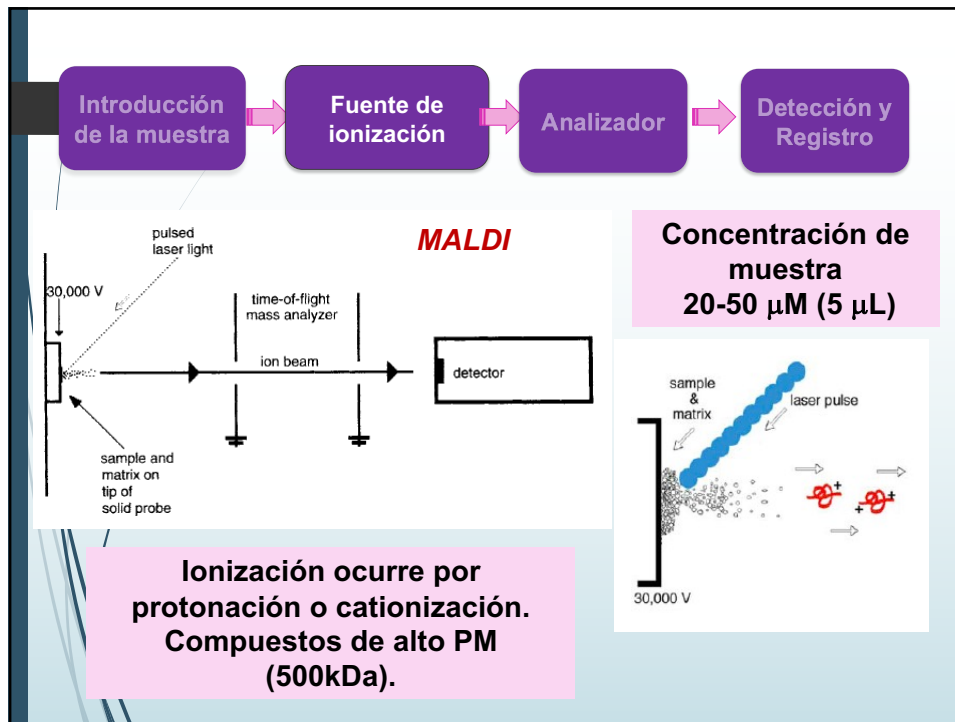
14



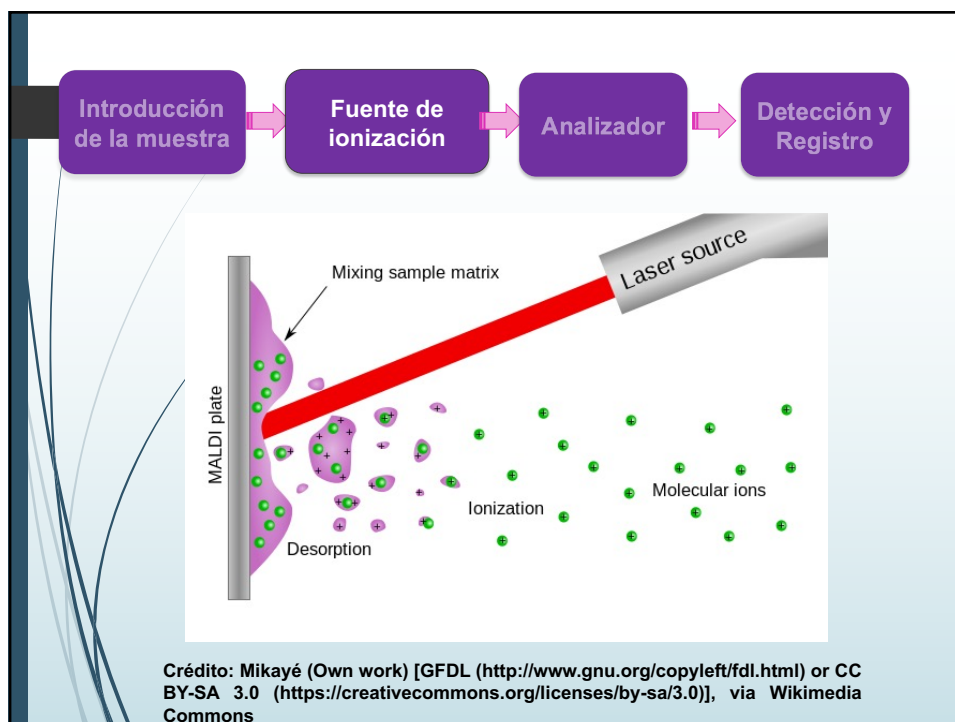
15



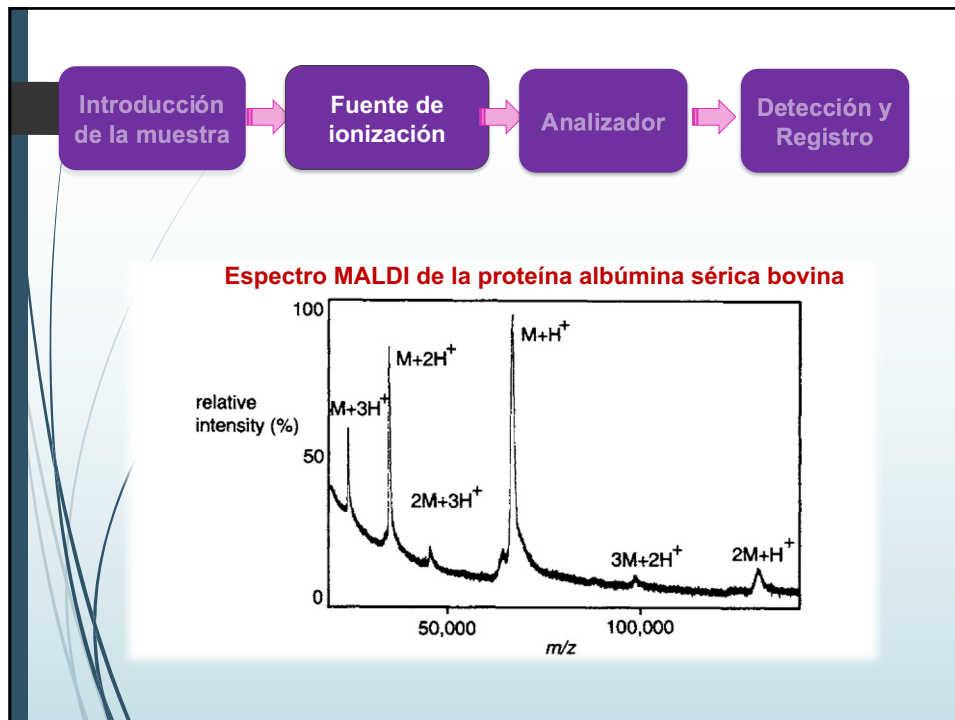
16



17



18

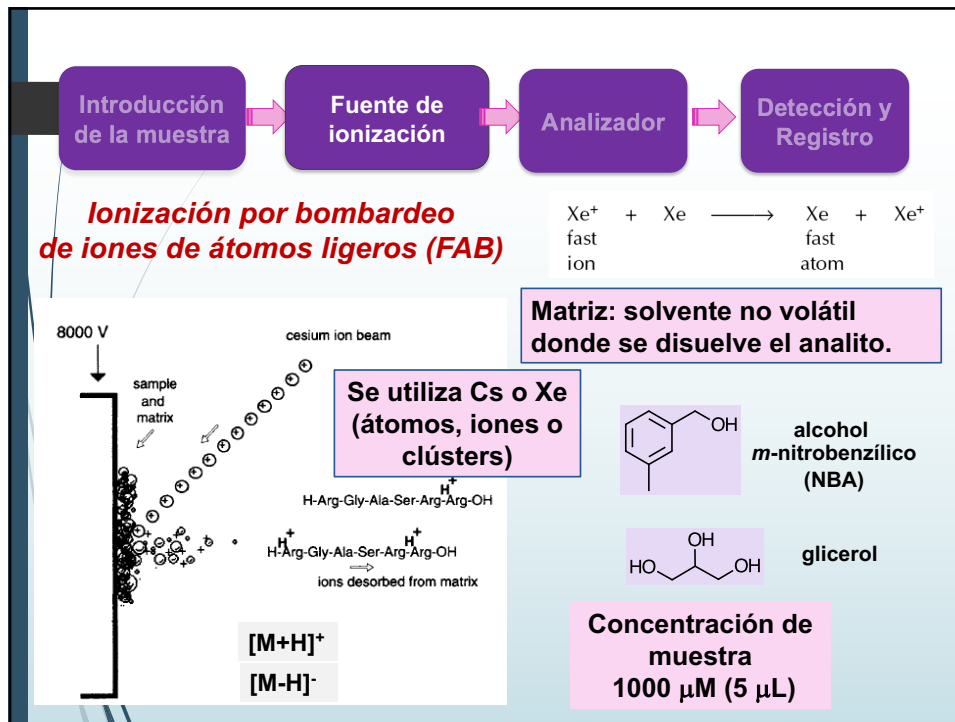


19

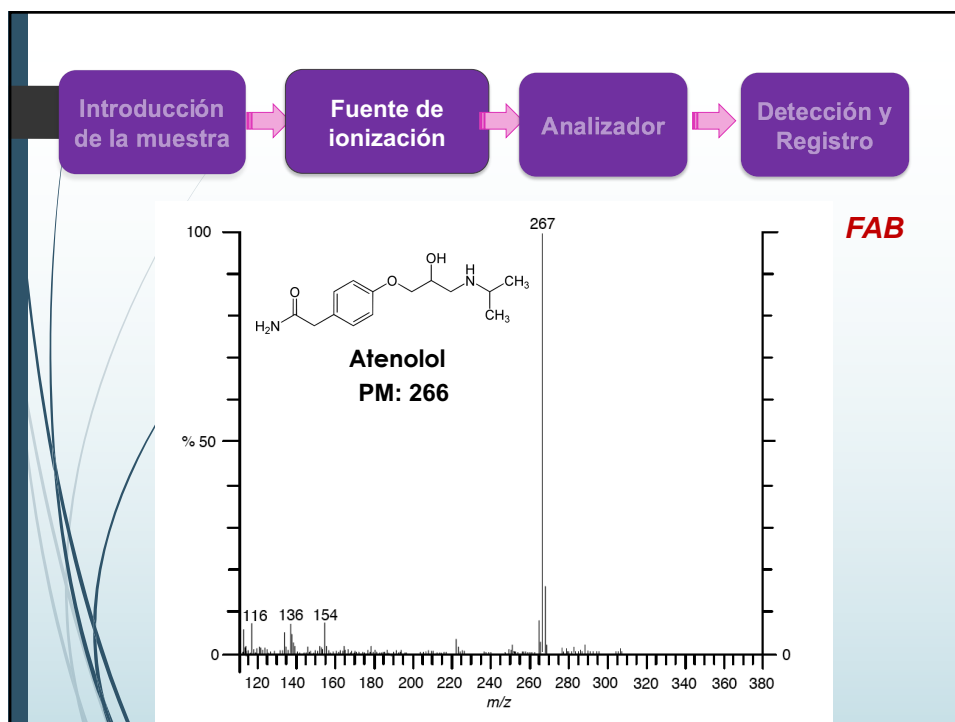
Introducción de la muestra → Fuente de ionización → Analizador → Detección y Registro

MALDI	
Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> ➤ PM al menos hasta 300 kDa. ➤ Sensibilidad en el orden de fmol a pmol. Atomol es posible. ➤ Ionización blanda con poca fragmentación. ➤ Tolerancia a sales hasta mM. ➤ Permite análisis de mezclas complejas. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Background</i> de la matriz. Interferencia por debajo de 700 Da. Depende de la matriz ➤ Posible fotodegradación por desorción laser/ionización. ➤ La matriz ácida puede causar degradación de algunos compuestos. ➤ Problemas de reproducibilidad para análisis cuantitativo.

20



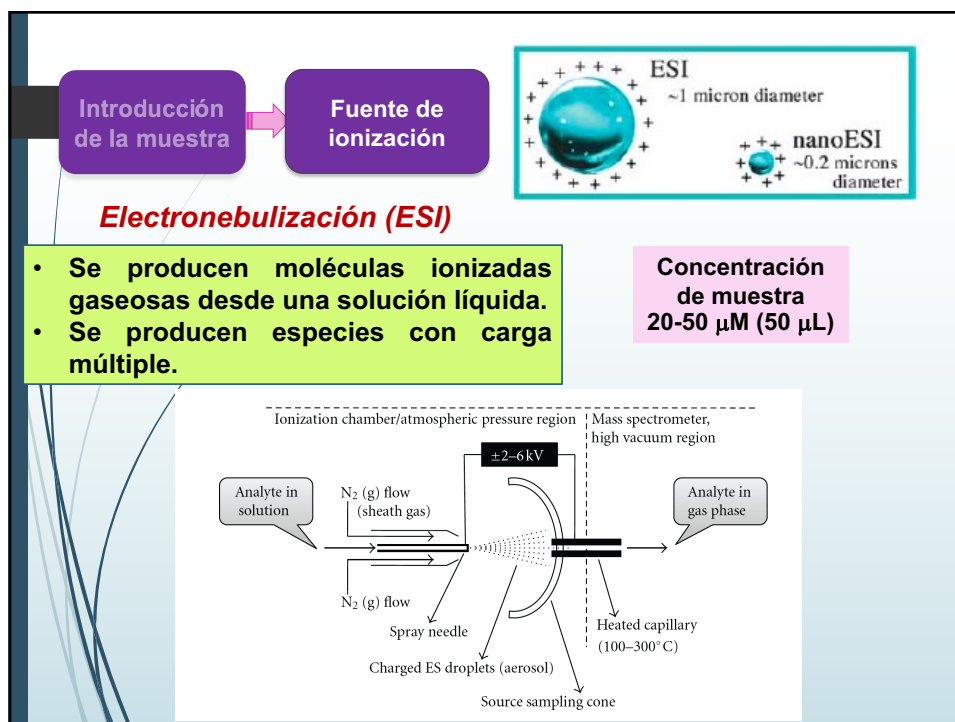
21



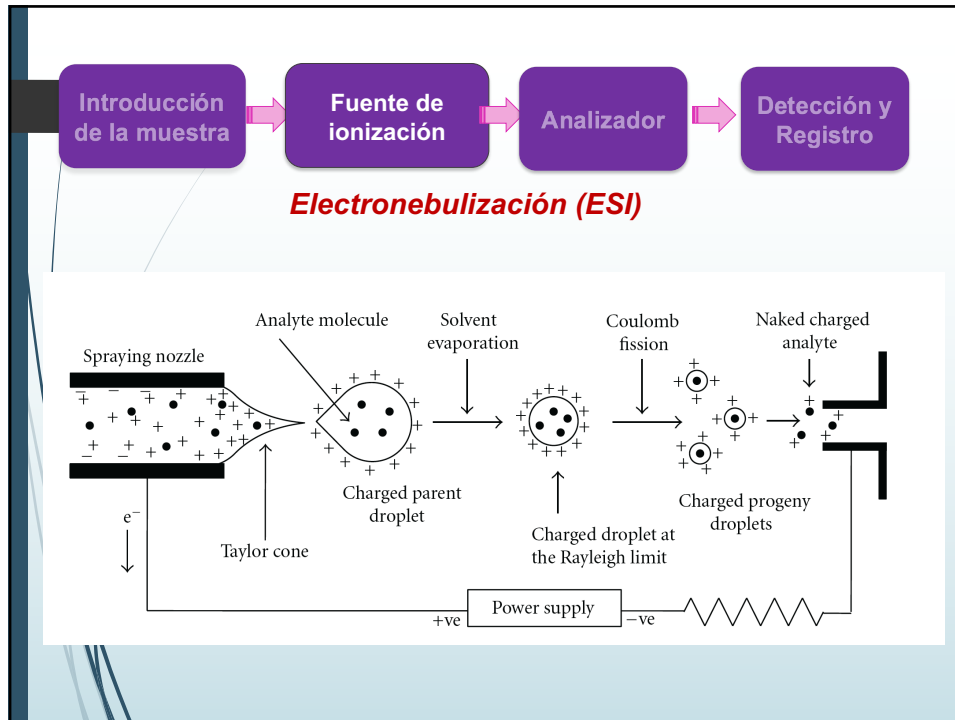
22

FAB	
Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> ➤ PM hasta 7 kDa. ➤ Análisis rápido. ➤ Ionización blanda con poca fragmentación. Obtención de ion molecular ➤ Tolerancia a sales mM ➤ Fácil adaptación para alta resolución (masas exactas). La matriz puede ser referencia para el análisis de masas exactas. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Caída de sensibilidad a valores de masa altos ➤ Comparada con MALDI o ESI es poco sensible. Requiere altos pmoles a nanomol de material. ➤ La matriz ácida puede causar degradación de algunos compuestos. ➤ Poca fragmentación, limitada información estructural. ➤ Alto <i>background</i> de picos de la matriz. ➤ Solubilidad del compuesto en la matriz ➤ Poca utilidad para especies no polares.

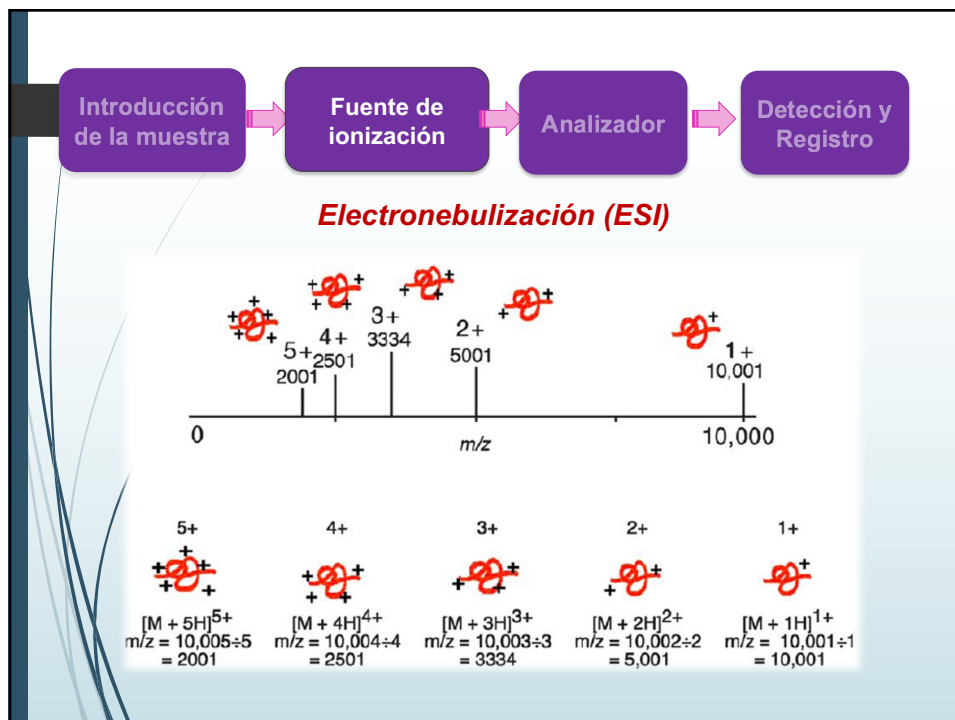
23



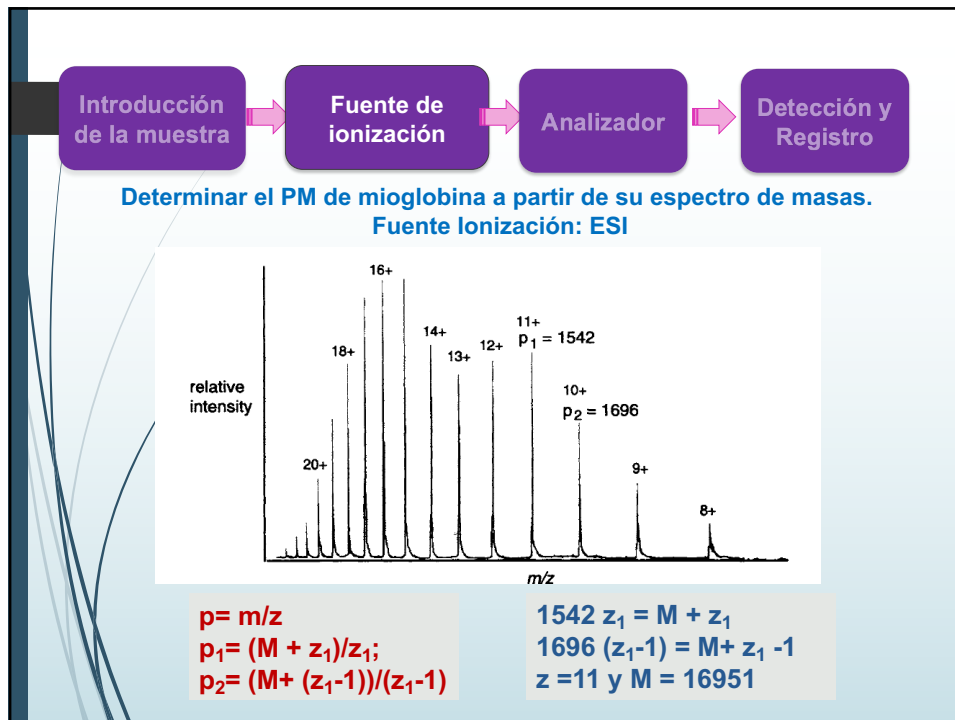
24



25



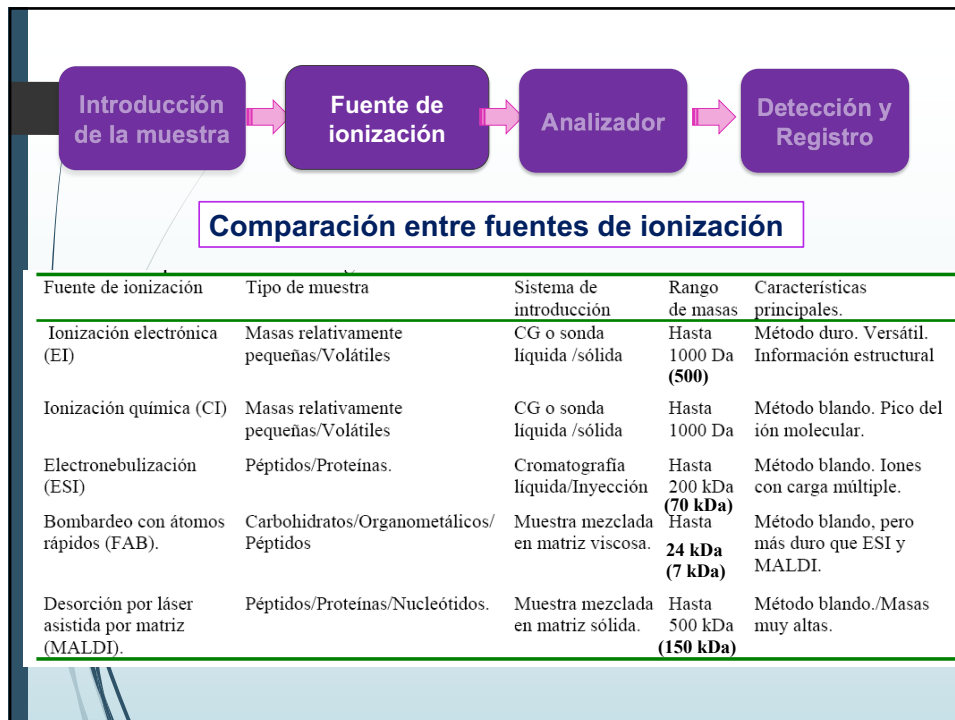
26



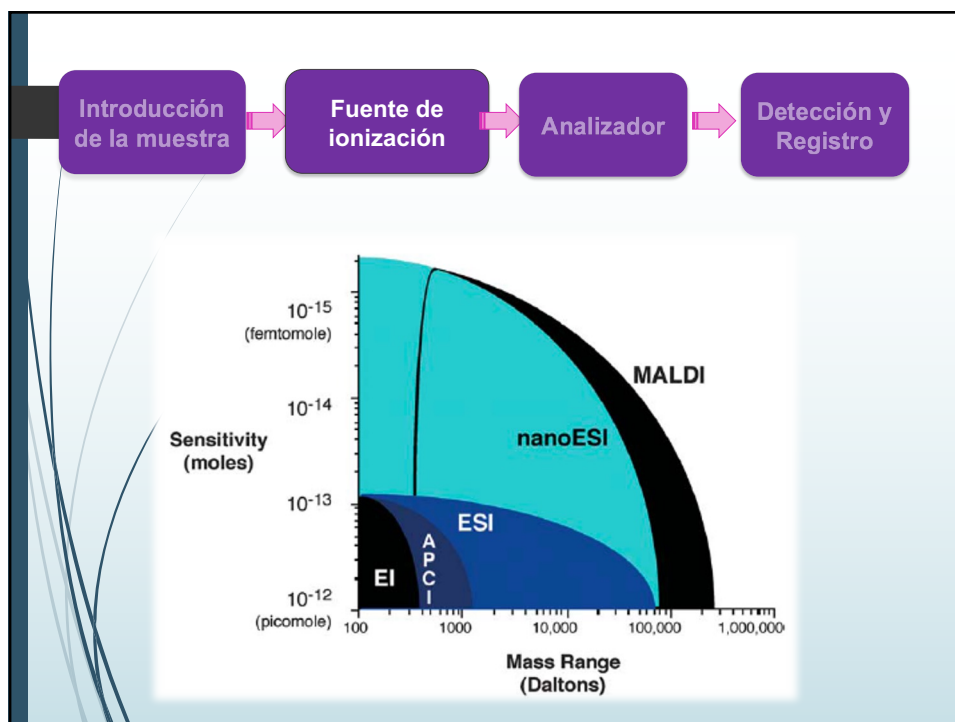
27

ESI	
Ventajas	Desventajas
PM hasta 70 kDa. Sensibilidad en el orden de fmol a pmol. Ionización blanda. Generación de complejos en fase gaseosa. Adaptable fácilmente a LC. Adaptable a analizadores de masa en tándem. Múltiples cargas permite análisis de iones de alta masa con instrumentos de bajo intervalo de m/z . No hay interferencia por matriz.	Presencia de sales reduce la sensibilidad. Mezclas complejas reducen sensibilidad. Análisis simultáneo en mezclas puede ser pobre. Cargas múltiples puede ser confuso en el análisis de mezclas. Pureza de la muestra es muy importante.

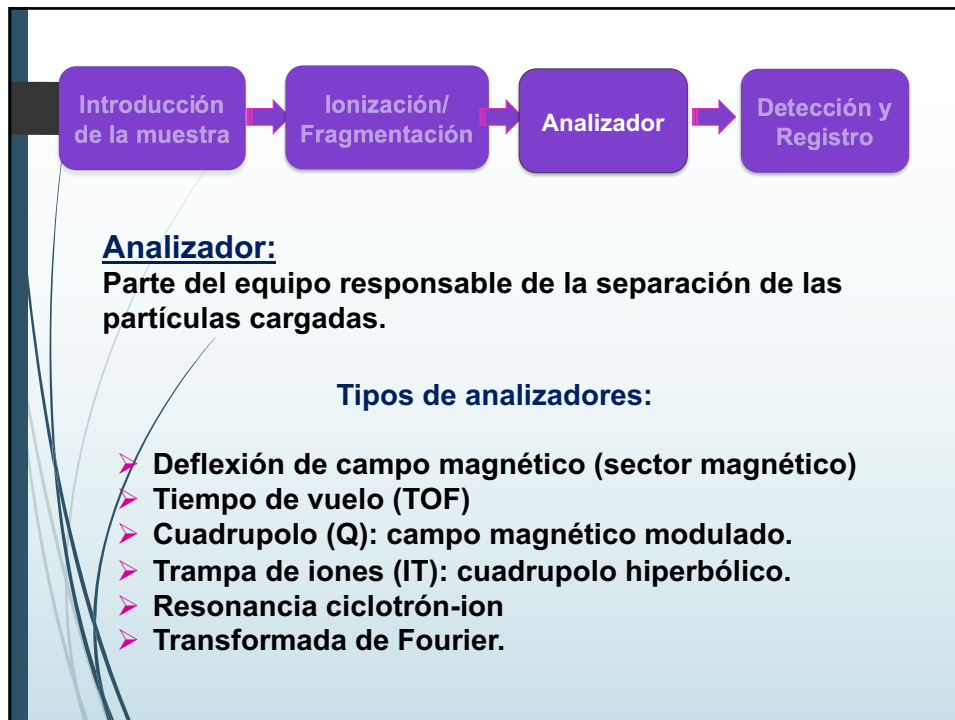
28



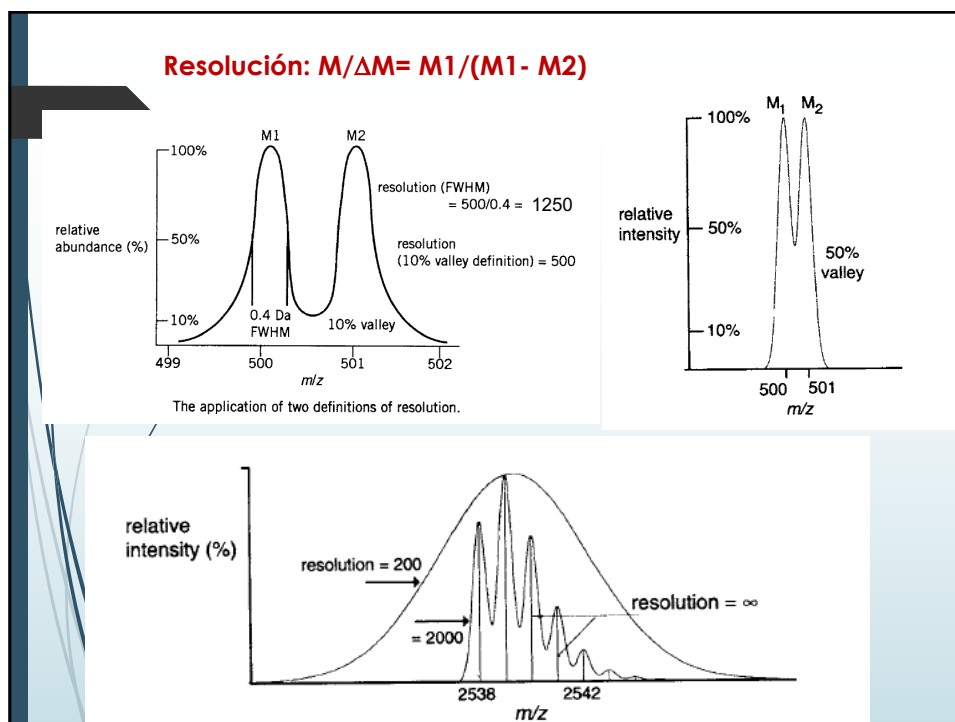
29



30



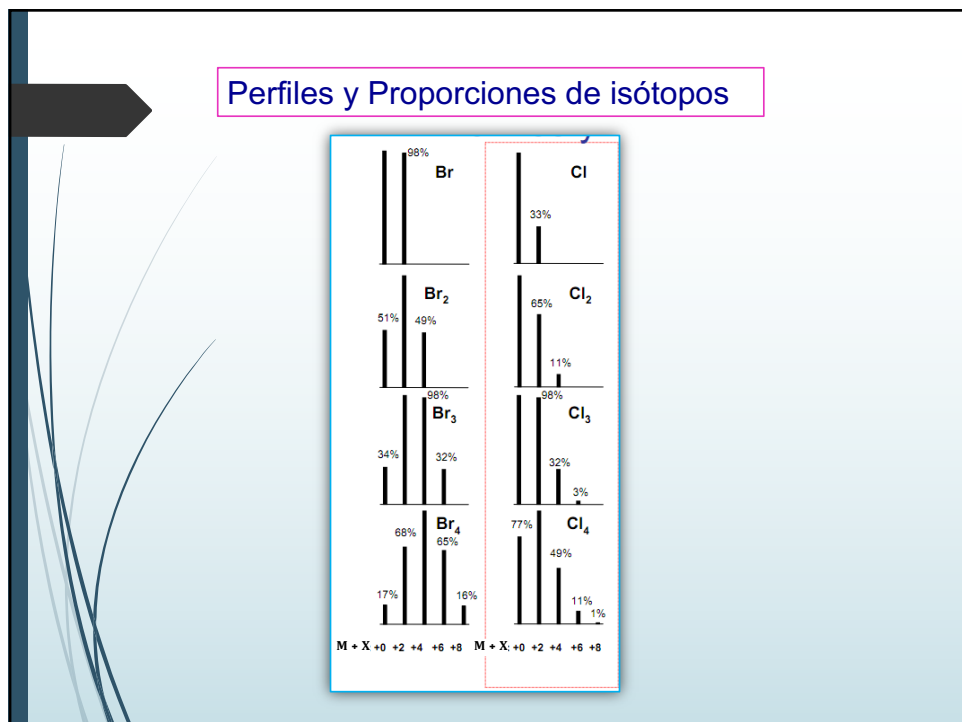
31



32

<div> <div>Introducción de la muestra</div> <div>Ionización/ Fragmentación</div> <div>Analizador</div> <div>Detección y Registro</div> </div>			
General Comparison of Mass Analyzers			
Mass analyzer	Typical mass range and resolution	Advantages	Disadvantages
Quadrupole	Range m/z 3000 Resolution 2000	Tolerant of high pressures Well-suited for electrospray Ease of switching between positive/negative ions Small size Relatively low cost	Mass range limited to about 3000 m/z Poor adaptability to MALDI
Ion trap	Range m/z 2000 Resolution 1500	Small size Medium resolution Simple design, low cost Well-suited for tandem mass spectrometry (MS^n , $n \leq 4$) Easy for positive/negative ions	Limited mass range of current commercial versions; however, progress is being made in their development
Magnetic sector	Range m/z 20,000 Resolution 10,000	Capable of high resolution Capable of exact mass Medium mass range Can be very reliable, manufacturer dependent	Not tolerant of high pressures Expensive Instrumentation is massive Relatively slow scanning
Time-of-flight (TOF)	Range m/z ∞ Resolution 350	Highest mass range Very fast scan speed Simple design, low cost Ease of adaptation to MALDI	Low resolution Difficulty of adaptation to electrospray
Time-of-flight reflectron	Range m/z ∞ Resolution 1500	Good resolution Very fast scan speed Simple design, low cost	Good resolving power has limited m/z range Lower sensitivity than TOF
Fourier transform-mass spectrometry (FT-MS)	Range m/z 10,000 Resolution 30,000	High resolution Well-suited for tandem mass spectrometry (MS^n , $n \leq 4$)	High vacuum ($<10^{-7}$ Torr) required Superconducting magnet required, expensive Instrumentation massive

33



34

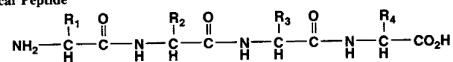
Formas de fragmentación en los compuestos orgánicos

1. Ruptura de un enlace simple
2. Eliminación de una molécula neutra
3. Formación de carbocationes estabilizados por resonancia

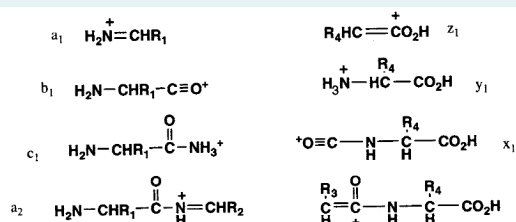
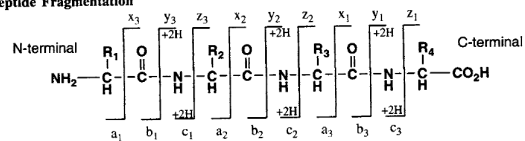
35

FRAGMENTACION DE PEPTIDOS

Typical Peptide



Peptide Fragmentation



36

MS aplicada a la Biotecnología

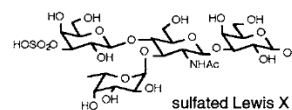
- **Identificación y análisis estructural** de proteínas.
- **Análisis** de carbohidratos y oligonucleótidos.
- **Monitorear procesos de fermentación** en la industria biotecnológica.

H-(Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-
Ala-Ser-Gly-Glu)-OH
delta sleep-inducing peptide (DSIP)

peptides



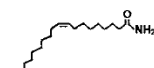
proteins



carbohydrates

3'-CTCGATACTAC-5'

oligonucleotides



small biomolecules

Scheme 3.1

37

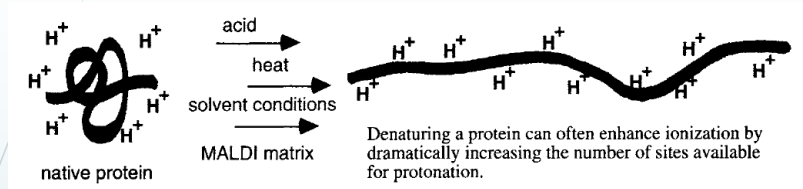
Typical Ionization Properties and Techniques for Biomolecules

Compound	Ionization mechanism	Ionization techniques	Ionization mode
Peptides	Protonation	FAB, MALDI, and ESI	Positive
	Deprotonation	FAB, MALDI, and ESI	Negative
Proteins	Protonation	MALDI and ESI	Positive
Membrane proteins	Protonation	MALDI and ESI	Positive
Glycoproteins	Protonation	MALDI and ESI	Positive
Carbohydrates	Protonation	FAB, MALDI, and ESI	Positive
	Cationization	FAB, MALDI, and ESI	Positive
	Deprotonation	FAB, MALDI, and ESI	Negative
Protected carbohydrates	Protonation	FAB, MALDI, and ESI	Positive
	Cationization	FAB, MALDI, and ESI	Positive
	Deprotonation	FAB, MALDI, and ESI	Negative
Oligonucleotides	Deprotonation	MALDI and ESI	Negative
Protected oligonucleotides	Deprotonation	MALDI and ESI	Negative
	Protonation	MALDI and ESI	Positive
	Cationization	MALDI and ESI	Positive
Small biomolecules	Protonation	FAB, MALDI, and ESI	Positive
	Cationization	FAB, MALDI, and ESI	Positive
	Deprotonation	FAB, MALDI, and ESI	Negative
	Electron ejection	Electron ionization	Positive
	Electron capture	Electron ionization	Negative

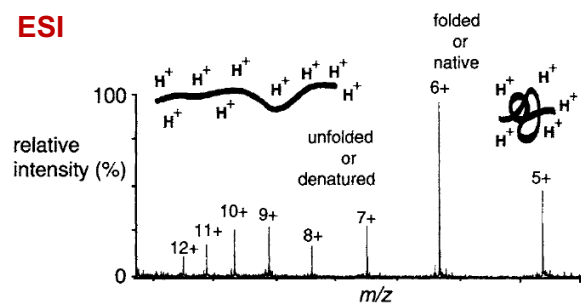
38

MS aplicada a las biomoléculas

Conformación de proteínas



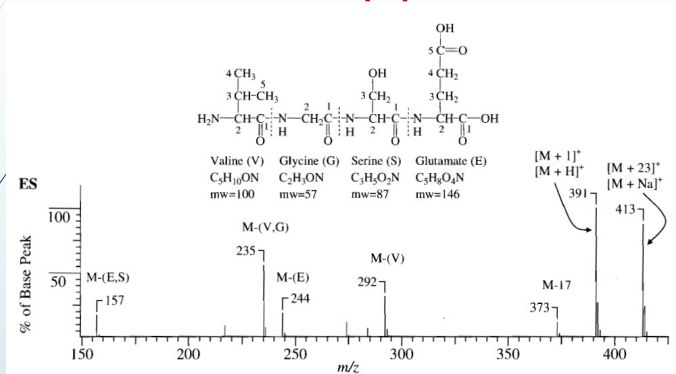
ESI



39

MS aplicada a las biomoléculas

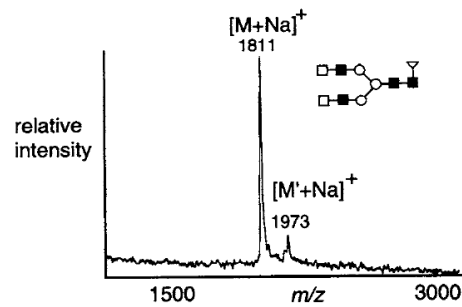
Estructura de péptidos



40

MS aplicada a las biomoléculas

Análisis de carbohidratos

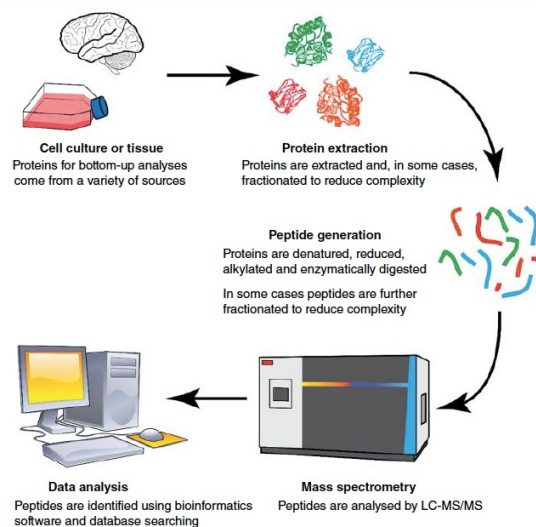


MALDI-MS de un oligosacárido. Matriz: DHB. El pico a m/z 1973 representa un segundo azúcar que contiene un residuo extra de hexosa. ○ manosa, □ galactosa, N-acetilglucosamina; ▽ fucosa.

41

MS aplicada a las biomoléculas

Identificación de proteínas



42

BIBLIOGRAFÍA

- Principios de análisis instrumental, 5ta ed. Skoog, Holler, Nieman, McGraw Hill, 2001. 7ma ed. Skoog, Holler, Crouch (2018)
- Mass Spectrometry for biotechnology, G. Siuzdak, Academic Press, 1996.
- The Expanding Role of Mass Spectrometry for biotechnology, G. Siuzdak, MCC Press, 2006.
- Modern Chemical Techniques, B. Faust, RSC, 1997.
- Spectrometric Identification of Organic Compounds, 7th Ed. R. M. Silverstein, F. X. Webster, D.J. Kiemle, John Wiley & Sons, 2005.
- Biomolecular and Bioanalytical Techniques. Theory, Methodology and Applications V. Ramesh, Wiley, 2019