



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
BASES Y APLICACIONES DE TÉCNICAS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Bases de la Espectrometría de Masas

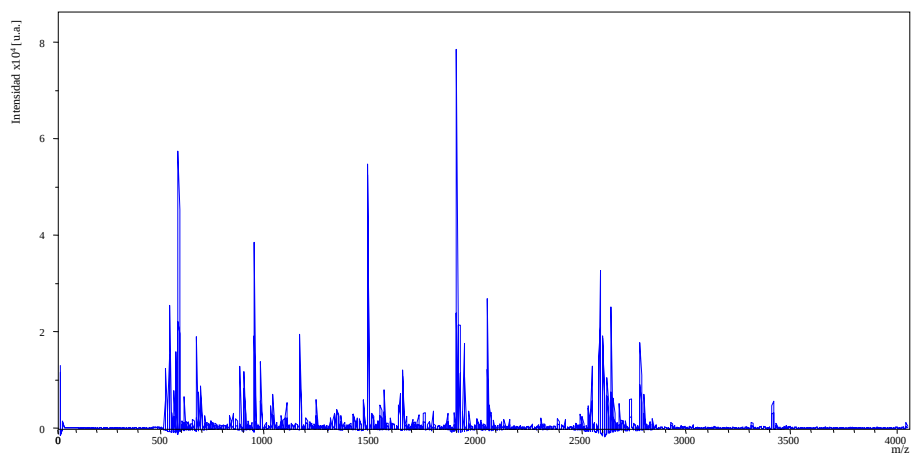
2007

Espectrometría de Masas

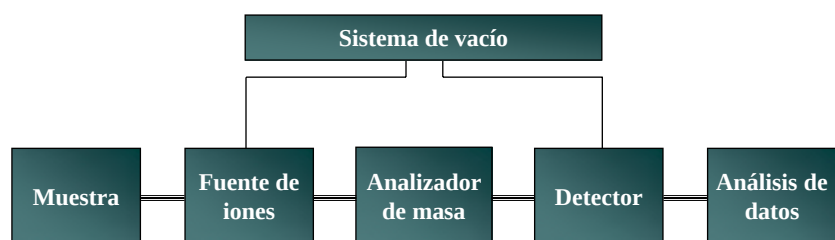
Es el arte de medir átomos y moléculas para determinar sus masas. Información que es suficiente, frecuentemente necesaria y siempre útil para determinar la identidad de un analito. Para practicar este arte se agregan cargas a las moléculas de interés y se mide entonces las trayectorias de los iones resultantes bajo vacío y diferentes combinaciones de campos magnéticos y eléctricos.

John B. Fenn, Premio Nobel de Química 2002

Muestra



Componentes de un Espectrómetro de Masas

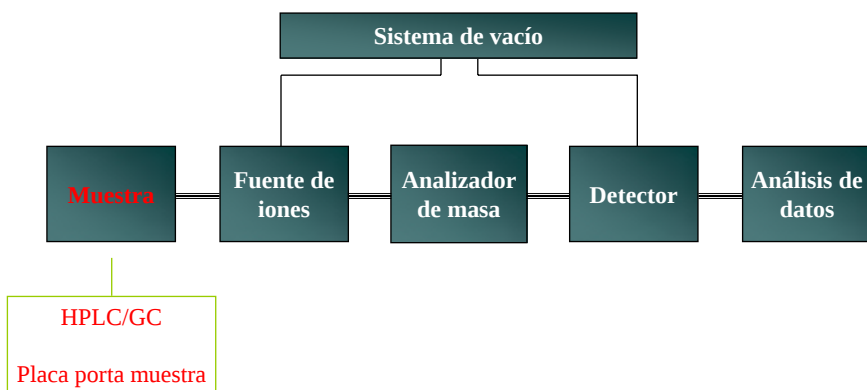


Sistema de vacío

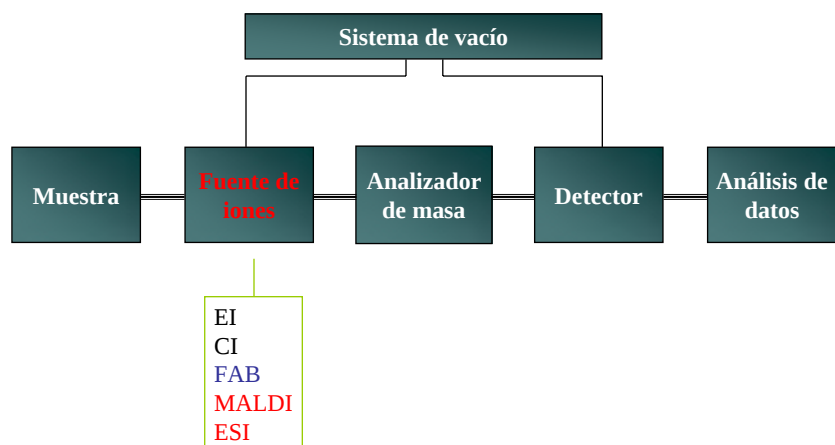


Necesidad de alto vacío para asegurar la ausencia de colisiones de los iones desde la fuente de ionización hasta el detector

Introducción de la muestra



Fuente de ionización



Fuente de ionización

Fuentes de fase gaseosa, donde la muestra es primero vaporizada y luego ionizada (EI, CI, FI).

Fuentes de desorción, donde la muestra en fase condensada es convertida directamente en iones gaseosos (FD, FAB, MALDI, ESI).

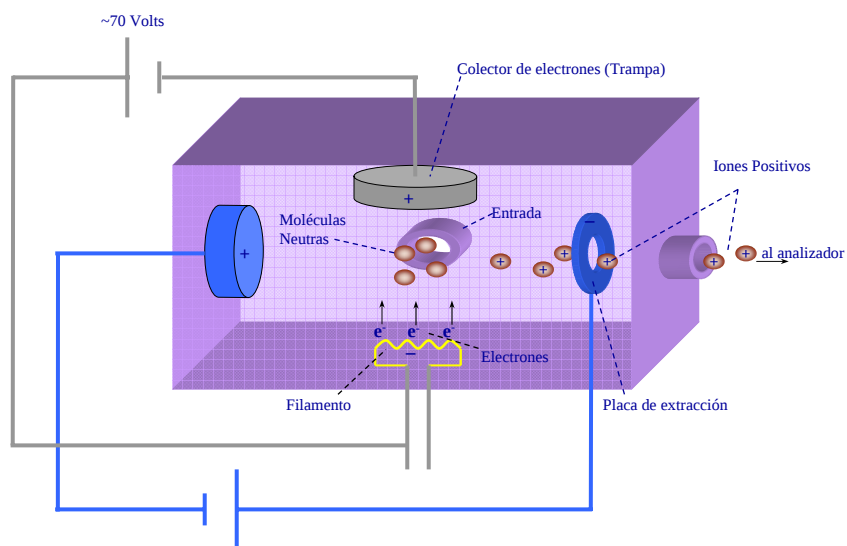
Fuentes de ionización fuertes imparte suficiente energía a las moléculas del analito para producir fragmentos iónicos. Puede destruir completamente el analito (átomos).

Fuentes de ionización suaves ionizan el analito sin causar fragmentación.

Fuente de ionización

Método de ionización	Tipo de muestra	Introducción de muestra	Intervalo de masa	Comentario
Ionización electrónica (EI)	Relativamente pequeña. Volátil.	GC o sonda líquida o sólida	Hasta 1000 Daltons	Ionización fuerte. Provee información estructural
Ionización química (CI)	Relativamente pequeña. Volátil.	GC o sonda líquida o sólida	Hasta 1000 Daltons	Ionización suave. Pico de ion molecular $[M+H]^+$
Electrospray (ESI)	Péptidos/proteínas. No volátiles.	Cromatografía líquida (HPLC)	Hasta 200.000 Daltons	Ionización suave. Múltiple carga de iones.
Desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI)	Péptidos/proteínas. No volátiles.	Muestra mezclada con matriz	Hasta 500.000 Daltons	Ionización suave. Amplio intervalo de masas.
Bombardeo con átomos rápidos (FAB)	Carbohidratos/péptidos. No volátiles.	Muestra mezclada con matriz viscosa	Hasta 6000 Daltons	Ionización suave, pero más fuerte que ESI o MALDI

Ionización electrónica/química



Ionización electrónica (picomol)

Advantages

- Well-Established
- Fragmentation Libraries
- No Supression
- Insoluble Samples
- Interface to GC
- Non-Polar Samples

Disadvantages

- Parent Identification
- Need Volatile Sample
- Need Thermal Stability
- No Interface to LC
- Low Mass Compounds (<1000 amu)
- Solids Probe Requires Skilled Operator

Ionización química (picomol)

Advantages

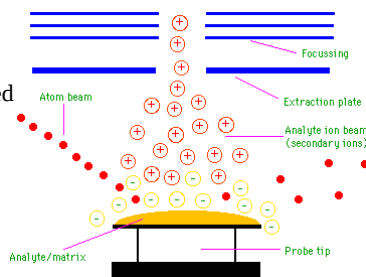
- Parent Ion
- Interface to GC
- Insoluble Samples

Disadvantages

- No Fragment Library
- Need Volatile Sample
- Need Thermal Stability
- Quantitation Difficult
- Low Mass Compounds (<1000 amu)
- Solids Probe Requires Skilled Operator

Ionización por Bombardeo con Átomos Rápidos (FAB)

In FAB ionization, the sample droplet is bombarded with energetic atoms (Ar, Xe) of 8-10 keV kinetic energy.



- The fast atom interacts with analyte on a “target” to produce ions by “sputtering” (i.e. transfer of energy from argon to analyte).
- The formation of protonated molecular ions ($M+H$)⁺ or other cationized species such as ($M+Na$)⁺ in the positive ion mode, and ($M-H$)⁻ in the negative ion mode, can be attributed to both gas phase reactions and solution chemistry.
- Analyte ions are accelerated into the MS by application of an electric field (ion extraction plate and lenses).
- FAB is soft ionization technique that performs well for polar and thermally labile compounds

Ionización por Bombardeo con Átomos Rápidos (FAB) (nanomol)

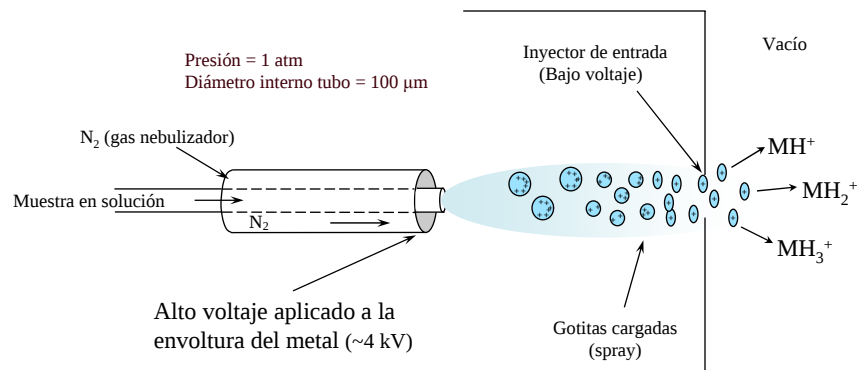
Advantages

- Advantages
- Parent Ion
- High Mass Compounds (10,000 amu)
- Thermally Labile Compounds

Disadvantages

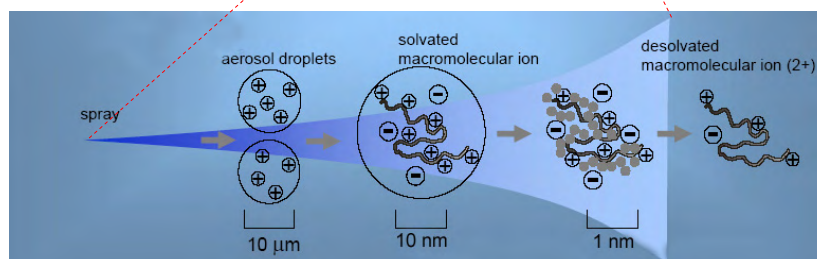
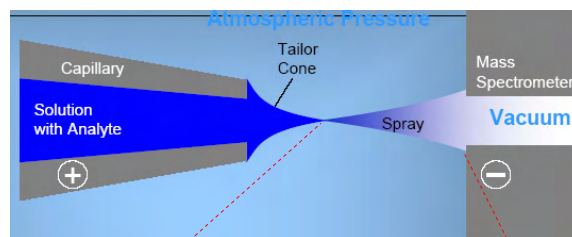
- No Fragment Library
- Solubility in Matrix (MNBA, Glycerol)
- Quantitation Difficult
- Needs Highly Skilled Operator
- Relatively Low Sensitivity

Ionización por Electrospray (ESI)



La muestra sale del capilar en forma de aerosol en pequeñas gotas con elevada carga eléctrica. Al avanzar las gotas por la cámara de desolvatación su tamaño se va reduciendo hasta que las fuerzas de repulsión entre los iones con múltiple carga generados en su interior son capaces de vencer la tensión superficial y los iones escapan a la fase gaseosa (evaporación iónica)

Ionización por Electrospray (ESI)



Ionización por Electrospray (ESI) (femtomol)

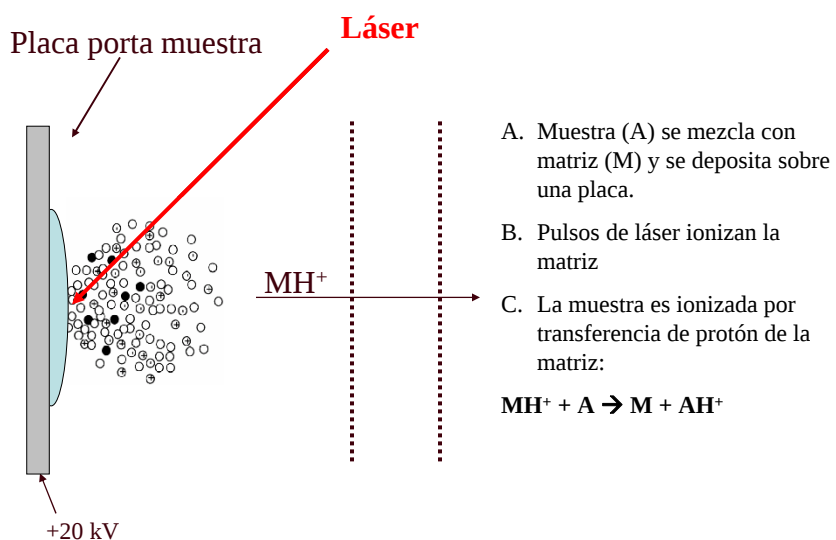
Advantages

- Parent Ion
- High Mass Compounds (>100,000 amu)
- Thermally Labile Compounds (<0° C)
- Easy to Operate
- Interface to HPLC
- Zeptomole sensitivity with nanospray

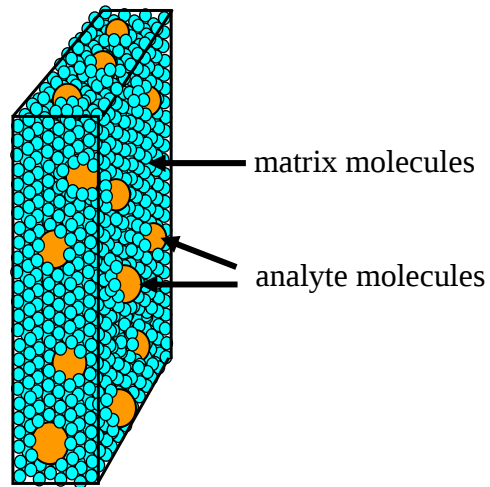
Disadvantages

- No Fragmentation
- Need Polar Sample
- Need Solubility in Polar Solvent (MeOH, ACN, H₂O, acetone are best)
- Sensitive to Salts
- Supression

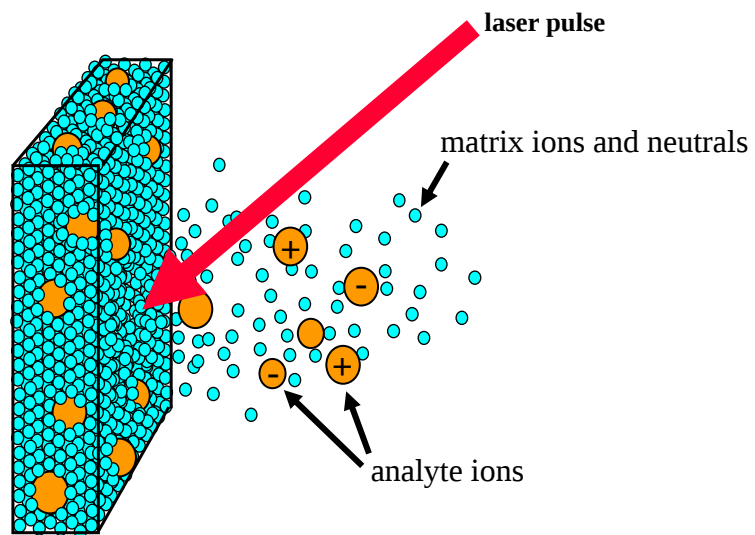
Desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI)



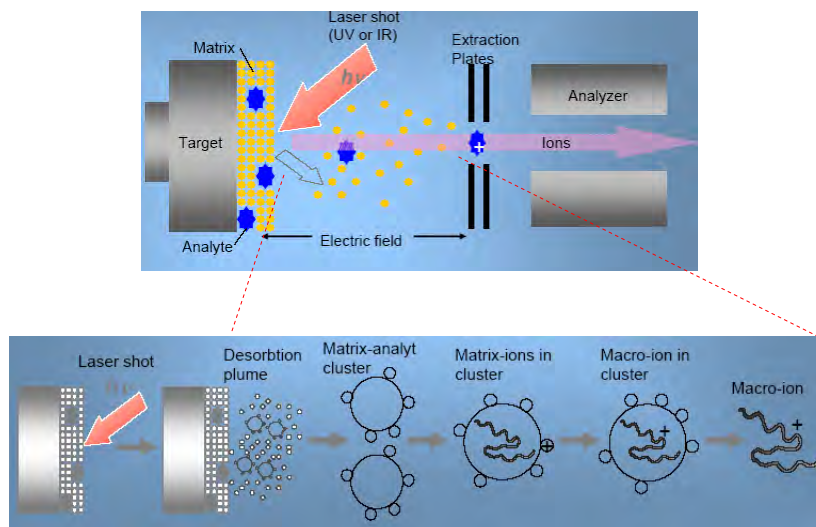
Desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI)



Desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI)



Desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI)



Desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI) (femtomol)

Advantages

- Parent Ion
- High Mass Compounds (>100,000 amu)
- Thermally Labile Compounds
- Easy to Operate

Disadvantages

- No Fragment Library
- Wide variety of matrices
- Quantitation Difficult

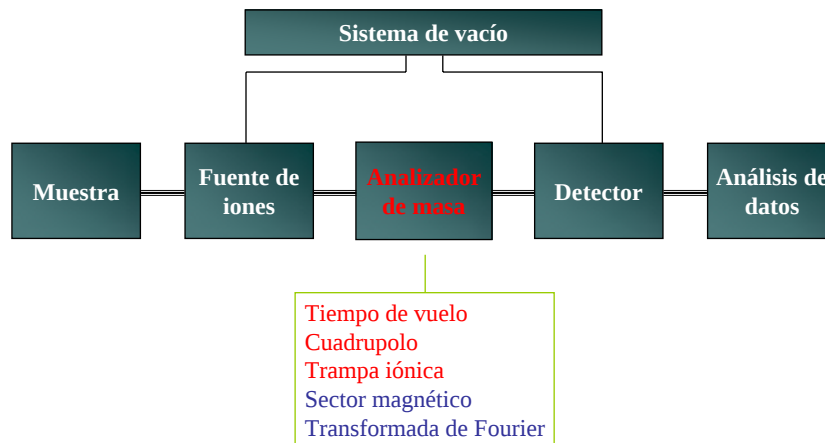
Mecanismos de Ionización

		modo	carga
Charged molecules:	no action	+/-	
Non-charged molecules:			
Electron Ejection	$M \rightarrow M^{•+} + e$	+	1
Electron Capture	$M + e^- \rightarrow M^{•-}$	-	1
Protonation	$M + H^+ \rightarrow MH^+$	+	≥ 1
Deprotonation	$MH \rightarrow M^- + H^+$	-	≥ 1
Cationization	$M + \text{Cation}^+ \rightarrow M(\text{Cation}^+)$	+	≥ 1

Different Ionization Methods

- ❑ Electron Impact (**EI** - Hard method)
small molecules, 1-1000 Daltons, structure
- ❑ Fast Atom Bombardment (**FAB** - Semi-hard)
peptides, sugars, up to 6000 Daltons
- ❑ Electrospray Ionization (**ESI** - Soft)
peptides, proteins, up to 200,000 Daltons
- ❑ Matrix Assisted Laser Desorption (**MALDI** - Soft)
peptides, proteins, DNA, up to 500 kD

Analizador de masa



Los analizadores de masa separan los iones en función de su razón masa/carga (m/z)

- ❑ Opera a alto vacío (mantiene los iones sin colisionar)
- ❑ Mide la razón masa/carga de los iones (m/z)
- ❑ Parámetros claves son la resolución, exactitud y sensibilidad.
- ❑ Existen diferentes tipos: para bioanálisis se utiliza principalmente, cuadrupolo, tiempo de vuelo y trampas iónicas.

Resolución

Ability to a mass spectrometer to distinguish between ions of adjacent m/z values.

$$\frac{M}{\Delta M} = \frac{M_1}{M_2 - M_1}$$

M1 and M2 adjacent peaks, separated by a valley, with specified height above the baseline

Exactitud

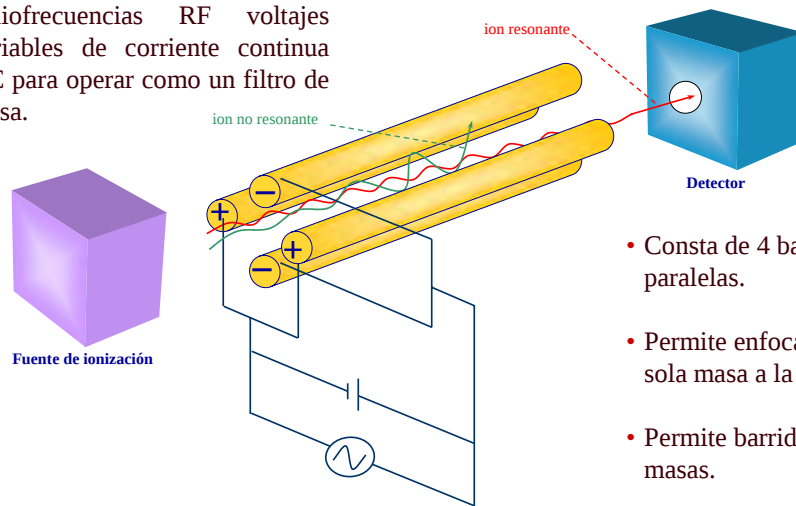
Difference between true (calculated) mass and the observed (measured) mass

Porcentaje (%):
$$\frac{M_C - M_m}{M_C} \times 100$$

Partes por millón (ppm):
$$\frac{M_C - M_m}{M_C} \times 10^6$$

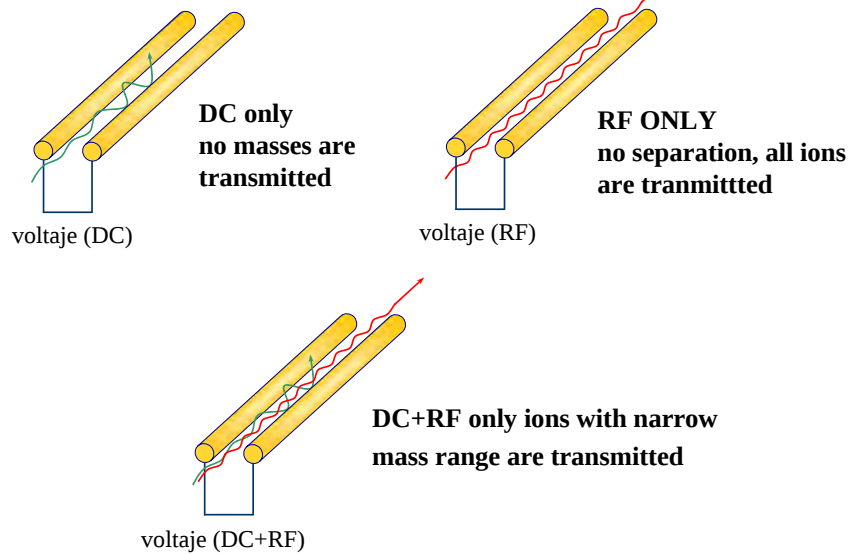
Analizador de masa de Cuadrupolo

Utiliza una combinación de radiofrecuencias RF voltajes variables de corriente continua DC para operar como un filtro de masa.

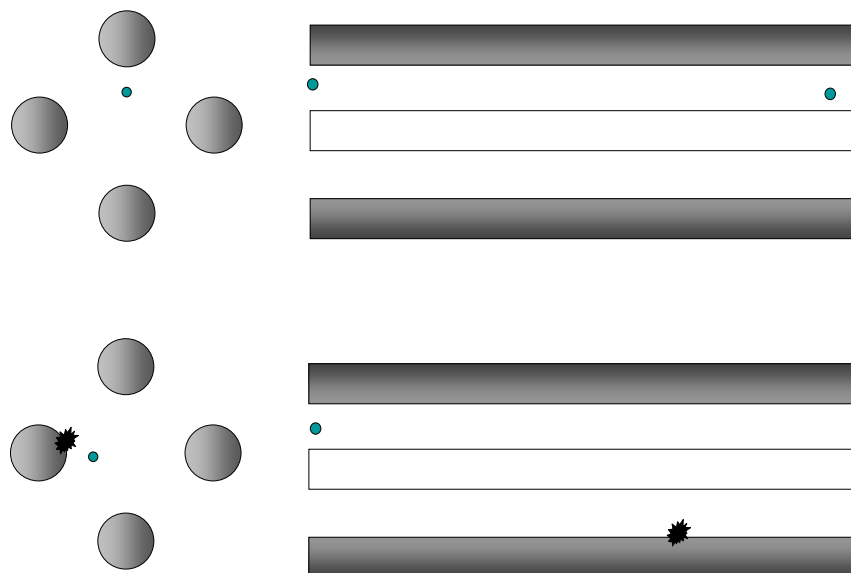


- Consta de 4 barras paralelas.
- Permite enfocar una sola masa a la vez.
- Permite barrido de masas.

Analizador de masa de Cuadrupolo



Analizador de masa de Cuadrupolo



Analizador de masa de Cuadrupolo

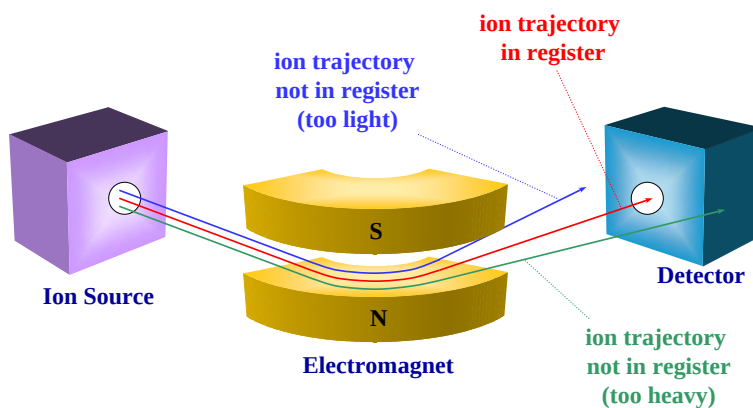
Advantages

- Inexpensive
- Easily Interfaced to Many Ionization Methods

Disadvantages

- Low Resolution (<4000)
- Low Accuracy (>100ppm)
- MS/MS requires multiple analyzers
- Low Mass Range (<4000)
- Slow Scanning

Analizador de masa de Sector Magnético



Analizador de masa de Sector Magnético de doble Enfoque

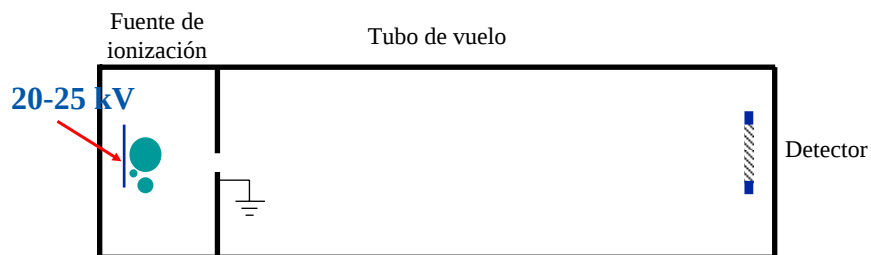
Advantages

- Very High Resolution (60,000)
- High Accuracy (<5 ppm)
- 10,000 Mass Range

Disadvantages

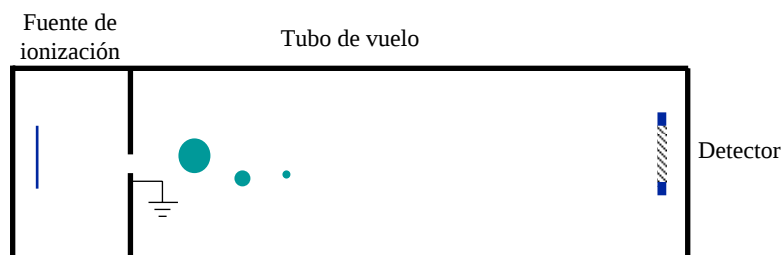
- Very Expensive
- Requires Skilled Operator
- Difficult to Interface to ESI
- Low resolution MS/MS without multiple analyzers

Analizador de masa de Tiempo de Vuelo



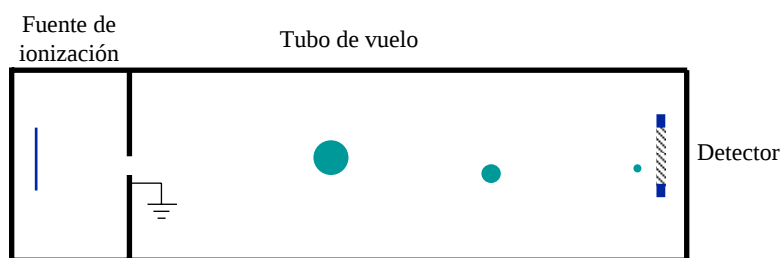
Principio: si los iones se aceleran con el mismo potencial en un punto fijo y en un tiempo inicial fijo, los iones se separarán según su razón masa/carga.

Analizador de masa de Tiempo de Vuelo



Los iones entran al tubo de vuelo y se observa que los iones más livianos viajan más rápido que los iones más pesados hacia el detector.

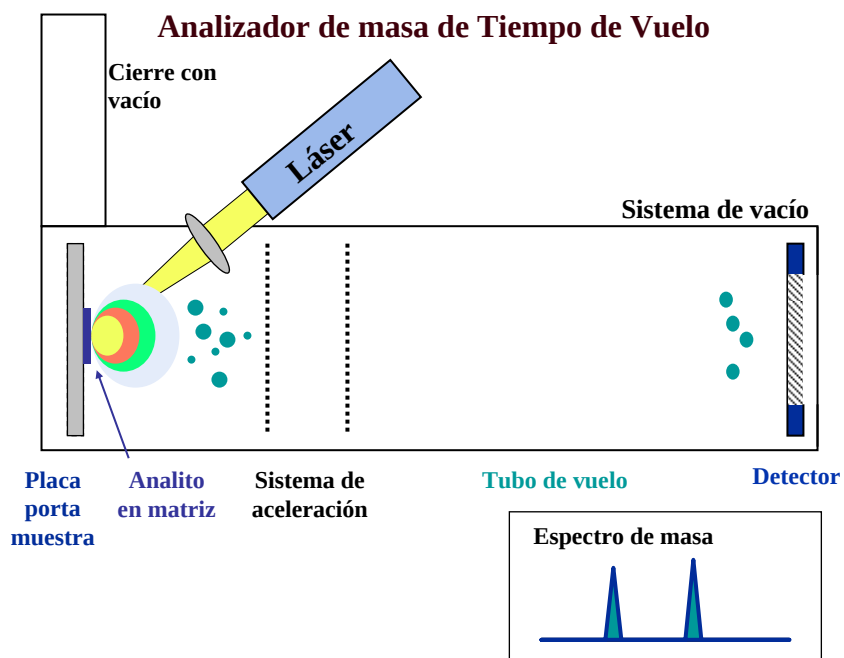
Analizador de masa de Tiempo de Vuelo



Los iones más livianos alcanzan el detector antes que los iones más pesados.

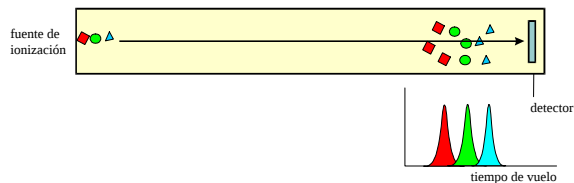
Este tiempo de vuelo (TOF) se puede convertir en masa.

Analizador de masa de Tiempo de Vuelo

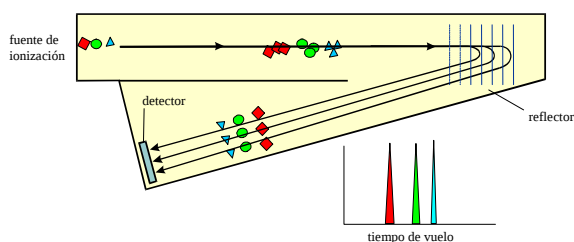


Analizador de masa de Tiempo de Vuelo

Tiempo de vuelo modo lineal



Tiempo de vuelo modo reflector



Analizador de masa de Tiempo de Vuelo

Tiempo de vuelo modo lineal

Advantages

- Extremely High Mass Range (>1 MDa)
- Fast Scanning

Disadvantages

- Low Resolution (4000)
- Low Accuracy (>200ppm)
- MS/MS not possible

Tiempo de vuelo modo reflector

Advantages

- High Resolution (>20,000 in some models)
- High Accuracy (<5ppm)
- 10,000 Mass Range
- Fast Scanning

Disadvantages

- Low Resolution for MS/MS (PSD)

Extracción retardada (Delayed Extraction) de iones

Los primeros instrumentos utilizaban la extracción continua de iones, para lo cual un voltaje de aceleración era aplicado durante y después del pulso del láser.

Actualmente los iones son generados en un ambiente libre de campos. Y algunos centenares de nanosegundos después que el pulso del láser ha terminado, se aplica un rápido voltaje de extracción de iones. O alternatively un voltaje de aceleración en dos fases puede ser aplicado con el fin de disminuir la distribución de energía.

Additional benefits of DE:

- Lower level of chemical noise arising from fragmentation in the ion source
- Reduction of matrix background
- Significant reduction of the dependence of ion flight times on laser intensity

Mass resolution is affected by factors creating a distribution in flight times among ions with the same m/z ratio

The initial time and velocity distribution

The ion production time and their initial velocity

The initial spatial distribution

Size of the volume where the ions are formed

} Delayed extraction

The ion energy distribution

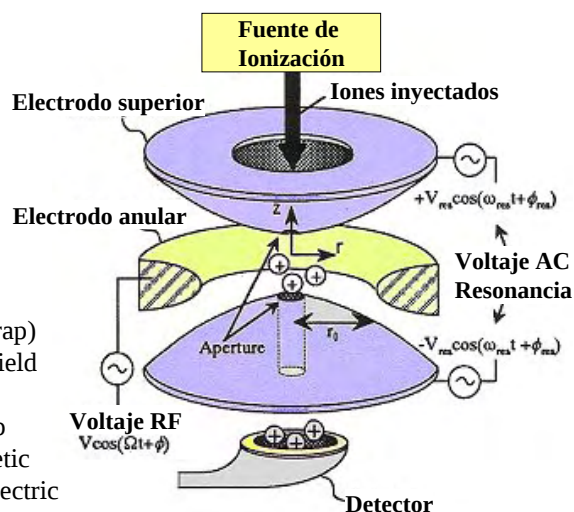
Variation in kinetic energy of the ion species

} Reflectron

Analizador de masa de Trampa iónica

Ion trap is a device which collects and stores ions, and manipulates ions in time, rather than in space

- Quadrupole ion trap (Paul trap) uses an oscillating electric field
- Ion cyclotron resonance trap (Penning trap) uses a magnetic field and a small constant electric field



Analizador de masa de Trampa iónica

Advantages

- Inexpensive
- Easily Interfaced to Many Ionization Methods
- MS/MS in one analyzer

Disadvantages

- Low Resolution (<4000)
- Low Accuracy (>100ppm)
- Space Charging Causes Mass Shifts
- Low Mass Range (<4000)
- Slow Scanning

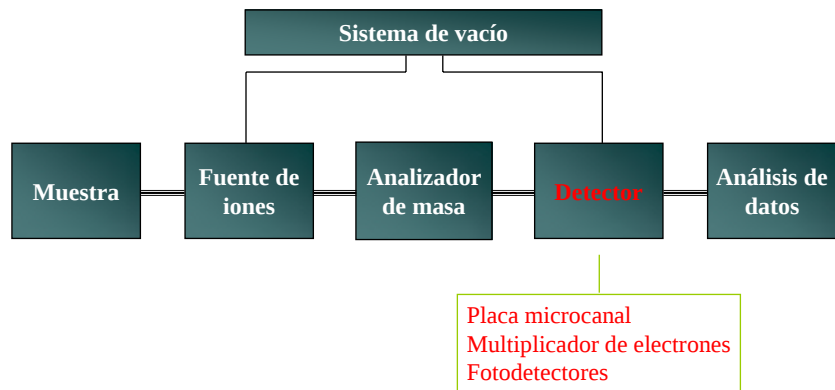
Different Mass Analyzers

- ❑ Magnetic Sector Analyzer (**MSA**)
High resolution, exact mass, original MA
- ❑ Quadrupole Analyzer (**Q**)
Low (1 amu) resolution, fast, cheap
- ❑ Time-of-Flight Analyzer (**TOF**)
No upper m/z limit, high throughput
- ❑ Ion Trap Mass Analyzer (**QSTAR**)
Good resolution, all-in-one mass analyzer
- ❑ Ion Cyclotron Resonance (**FT-ICR**)
Highest resolution, exact mass, costly

Analizador de masa

- ❑ **Cuadrupolo (incluyendo múltiples Cuadrupolos):**
Capacidad de resolución en base a la separación de iones por medio de frecuencia. Baja exactitud y resolución de masa. Limitado intervalo de masa.
- ❑ **Tiempo de vuelo (incluyendo múltiples TOF):**
Alta resolución y precisión de las masas en base a la separación por tiempo y distancia de los iones. Intervalo de masa ilimitado.
- ❑ **Trampa iónica:**
Alta capacidad de resolución en base a la separación de iones por medio de frecuencia. Moderada exactitud de masa. Limitado intervalo de masa.
- ❑ **Transformada de Fourier (FT):**
Alta resolución y precisión de las masas en base a la separación de iones por medio de frecuencia.
- ❑ **Sistemas híbridos:**
Combinación de diferentes tipos de analizadores.

Detector

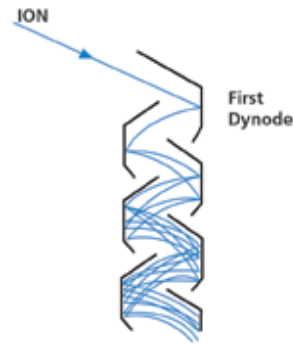


Detector

Los detectores traducen la llegada de los iones en una señal eléctrica que es medida por el sistema electrónico del espectrómetro de masa

Multiplicador de electrones

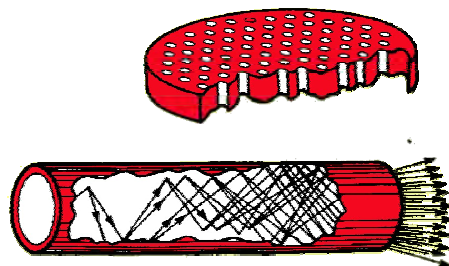
impact of an ion on conversion dynode results in emission of secondary electrons in direct proportion to the number of incident ions (amplification up to 10^7).



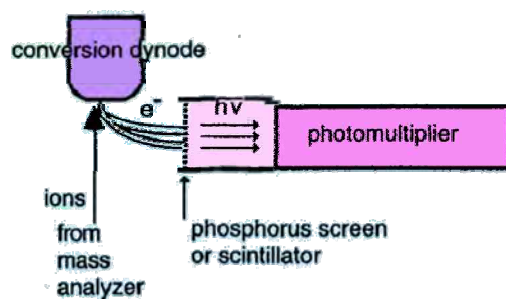
Placa microcanal

Bundle of multiple individual cylindrical channels

- An electrical potential is placed across the plate
- Each individual channel functions as an electron multiplier.
- Each channel is within covered with a semiconductor substances producing the secondary electrons.
- Two or three plates can be placed one after the other

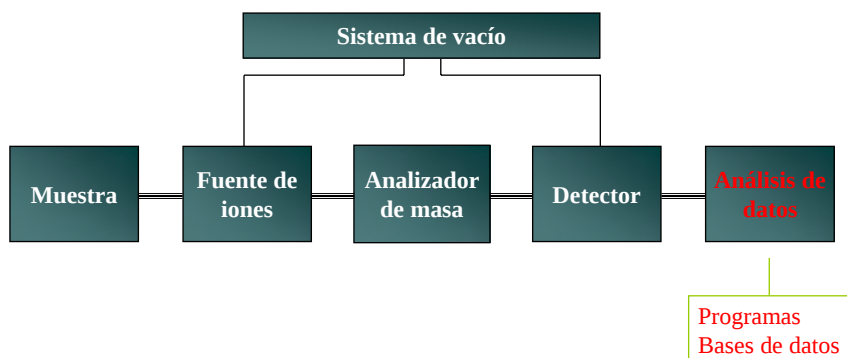


Fotomultiplicador



The ion beam is converted into a photon beam, which is then multiplied

Análisis de datos



Análisis de datos

- ❑ Programas que utilizan la huella peptídica (Mass Peptide Fingerprint, PMF) para la identificación de proteínas (**Mascot**, **ProFound**, **MS-Fit**).
- ❑ Programas que adicionalmente operan con espectros MS/MS (**PepSea**, **MASCOT**, **MS-Fit**, **MOWSE**).
- ❑ Programas que utilizan información MS/MS (**SEQUEST**, **PepFrag**, **MS-Tag**, **Sherpa**).

Análisis de datos

The screenshot shows the Mascot search interface on the Matrix Science website. The browser address bar displays http://www.matrixscience.com/search_form_select.html. The website header includes the Matrix Science logo, navigation links (HOME | WHAT'S NEW | MASCOT | HELP | PRODUCTS | SUPPORT | CONTACT), and a search bar. The main content area is titled "Mascot Search" and features a sidebar with a "Mascot Help" menu containing links to Mascot Overview, Search parameter reference, Sequence databases, Data file format, Scoring algorithm, Results format, Error tolerant search, FAQ's, User Meeting Presentations, 2005, More Help, Help Topic Index, and Useful Links. The main text area lists three search methods:

- Peptide Mass Fingerprint:** The experimental data are a list of peptide mass values from an enzymatic digest of a protein. Links: [Example of results report](#), [More information](#).
- Sequence Query:** One or more peptide mass values associated with information such as partial or ambiguous sequence strings, amino acid composition information, MS/MS fragment ion masses, etc. A super-set of a sequence tag query. Links: [Example of results report](#), [More information](#).
- MS/MS Ion Search:** Identification based on raw MS/MS data from one or more peptides. Links: [Example of results report](#), [More information](#).

Below this list is a link for **Search Form Defaults:** Follow this link to save your preferred search form defaults as a browser cookie. The footer contains the copyright notice: Copyright © 2005 Matrix Science Ltd. All Rights Reserved. Last Updated Wed, 15 Jun 2005 11:19:04 GMT.

De donde vienen los nombres de los espectrómetros de masa?

Tipos de fuentes de ionización:

- Electrospray (ESI)
- Desorción/ionización por láser asistida por matriz (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI)

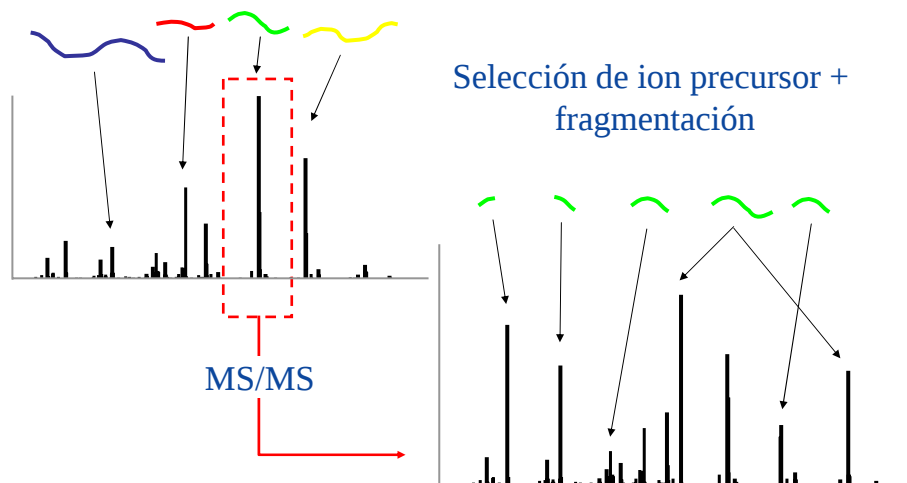
Tipos de analizadores de masa:

- Cuadrupolo (Quadrupolo, Q)
- Trampa iónica (Trap)
- Tiempo de vuelo (Time-of-Flight, TOF)
- Cualquier tipo de fuente puede trabajar con cualquier tipo de analizador: “MALDI-TOF,” “ESI-Q”
- Los analizadores se pueden combinar para crear instrumentos híbridos: ESI-QqQ, MALDI-QQ-TOF, Q-Trap

Qué es MS/MS?

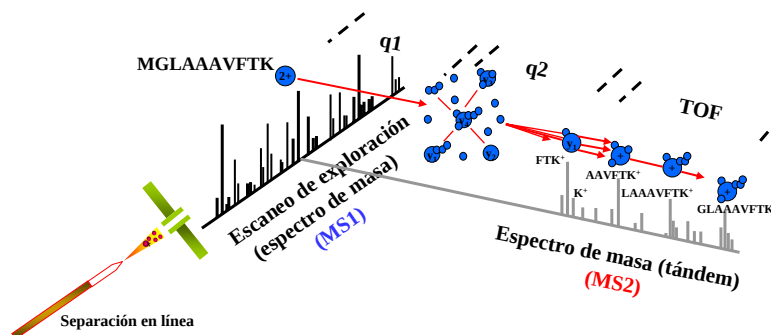
MS/MS (tandem MS) es la fragmentación de un ion seleccionado con el fin de obtener información estructural de la molécula

Espectrometría de masa en tándem (MS/MS)

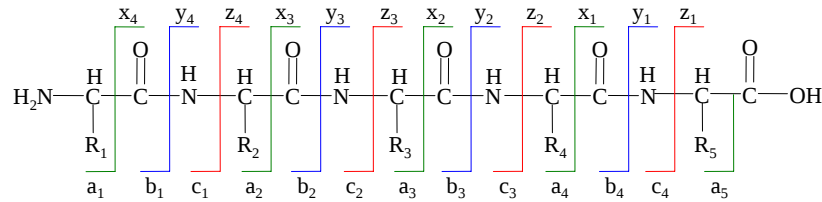


Espectrometría de masa en tándem (MS/MS)

Secuenciación de péptidos



La fragmentación ocurre principalmente a nivel del enlace peptídico

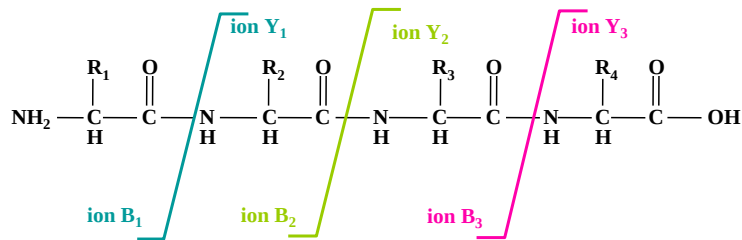


Nomenclatura estándar para la fragmentación peptídica

Se puede obtener muchos iones

Iones B e Y

Los iones Y van desde el extremo C al N-terminal



Los iones B van desde el extremo N al C-terminal

Idealmente se obtiene una serie completa de iones b e y (raro)

Fragmentation **pattern** is related to **how the peptide is fragmented**

- ❑ **High-energy collision-induced dissociation (CID)**
- ❑ **Low-energy collision-induced dissociation (CID)**
- ❑ **Meta-stable decay**
- ❑ **Other techniques: photo-induced dissociation, electron capture/transfer/detachment dissociation**

Fragmentations techniques

Fragmentation	Mode	Fragments
CID/CAD collisionally induced dissociation	Collisions with neutrals (Ar, Xe) IT; Q; QTOF; TOF²	<i>b, y, a</i> <i>Weakest bonds first</i>
ECD Electron capture dissociation	Electron capture, ICR	<i>c, z, a</i> <i>Any bond, except next to P</i>
ETD Electron transfer dissociation	Electron transfer, ICR; IT	<i>c, z, a</i> <i>Any bond, except next to P</i>
IRMPD IR multiphoton dissociation	Collisions with IR photons, ICR Cell	<i>b, y, a</i> <i>Weakest bonds first</i>

La fragmentación depende:

A. Energía de colisión:

Demasiada energía genera una extensa fragmentación, generando espacios (gaps) en la secuencia.
Muy poca energía genera pocos fragmentos.

B. Número de cargas del ion (simple, doble, triple)

C. Secuencia

Longitud y composición

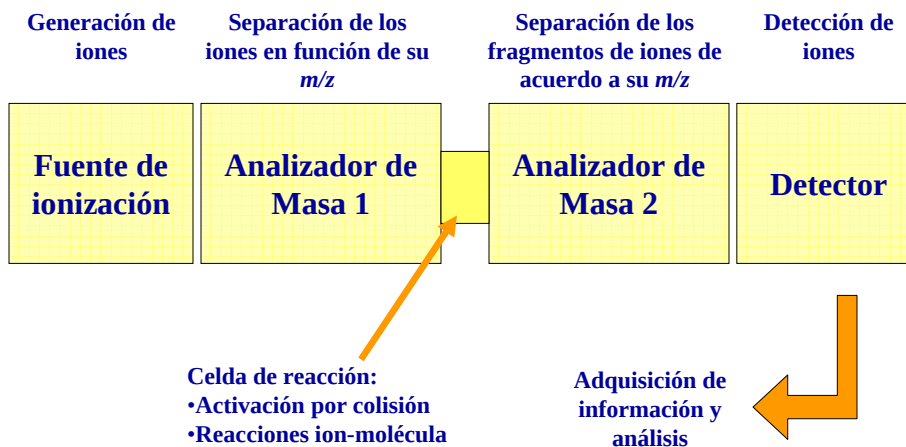
D. Presencia de determinados aminoácidos

Pro, Asp, His

E. Tipo de instrumento

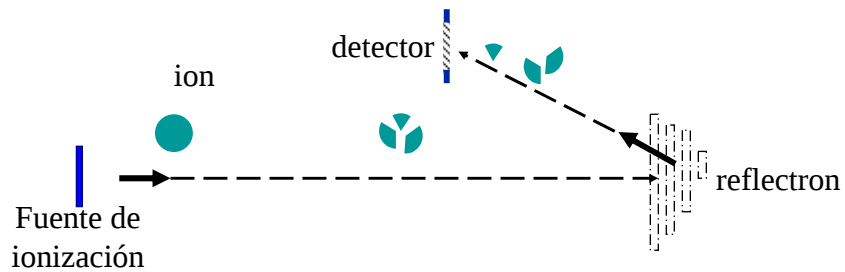
Trampa iónica predominantemente selecciona iones b.
Triple Q, Q-TOF proporciona iones y.

Espectrometría de masa en tandem (MS/MS)



Decaimiento post-fuente (Post Source Decay, PSD)

La utilización del sistema “reflectron” permite la obtención de información estructural

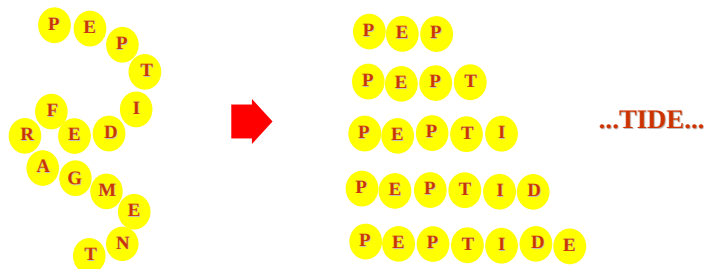


Un ion con una alta energía interna puede fragmentarse después de dejar la fuente de ionización (“ion metaestable”). Los fragmentos producidos tienen la misma velocidad, y por lo tanto en modo lineal alcanzarán el detector al mismo tiempo. En cambio con reflectron estos fragmentos son separados y detectados a diferentes tiempos. El espectro obtenido provee información estructural.

In Source Decay, ISD

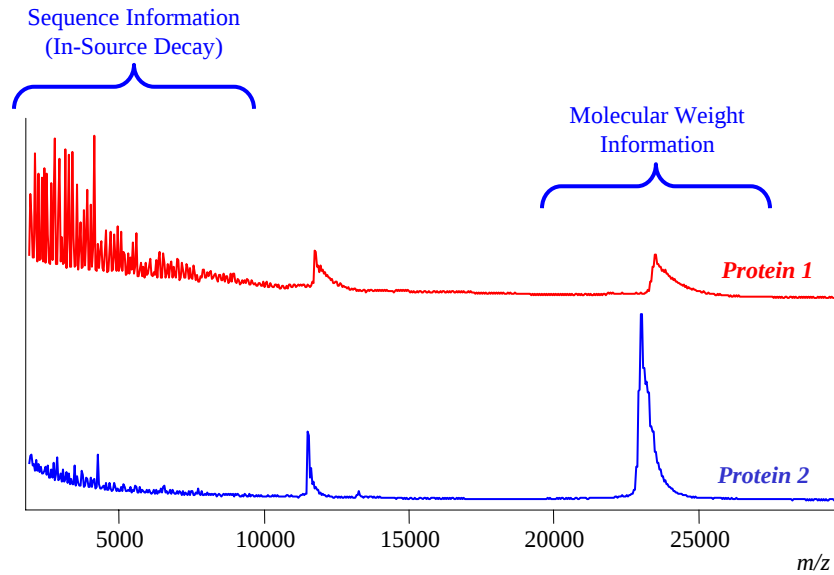
Peptides and large proteins can be fragmented by ISD

Fragmentation occurs in the MALDI ion source (not generally well controlled)
Reflectron TOF not necessary (linear TOF sufficient to measure product ions)



Complete sequence information not present, but extensive stretches of sequence from the N- and/or C-termini observed

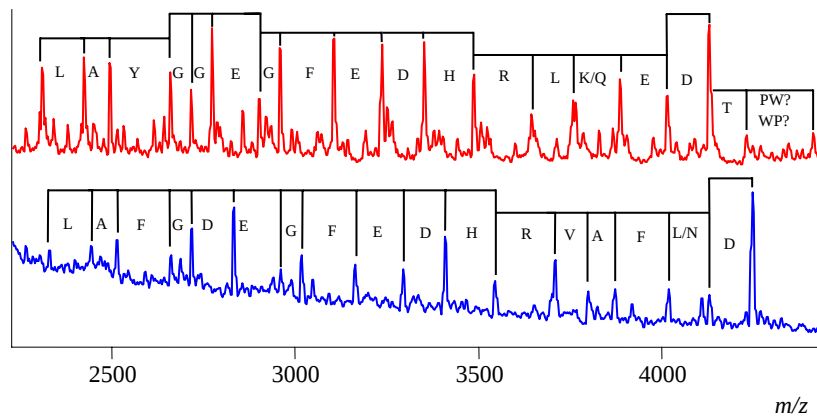
In Source Decay, ISD



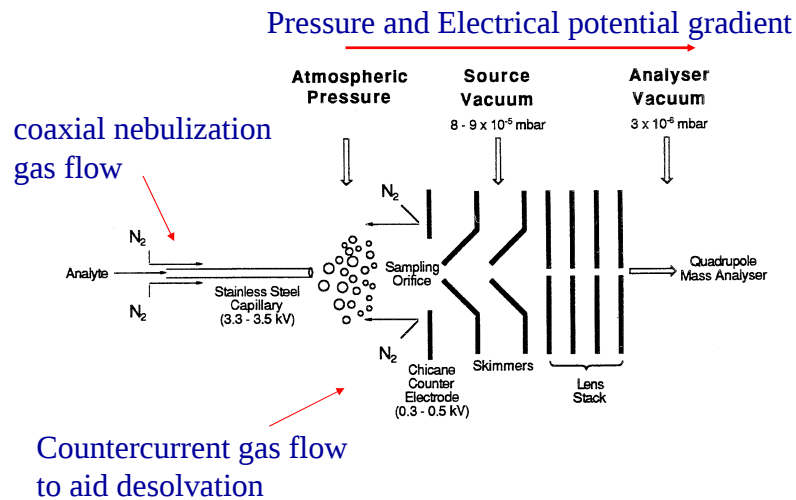
In Source Decay, ISD

ISD generally yields c-ions or z-ions

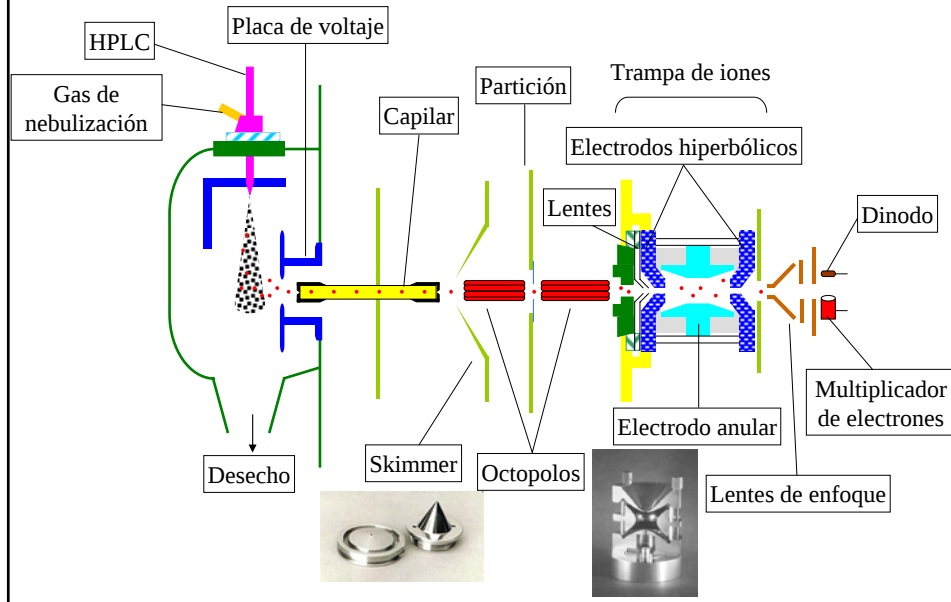
Sequence information from the N-terminus



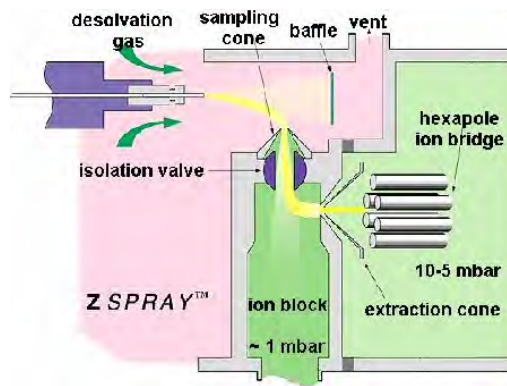
Configuraciones ESI-MS, Lineal



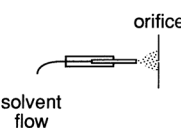
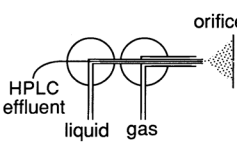
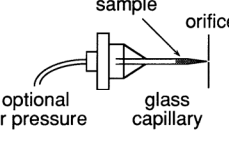
Configuraciones ESI-MS, Ortogonal



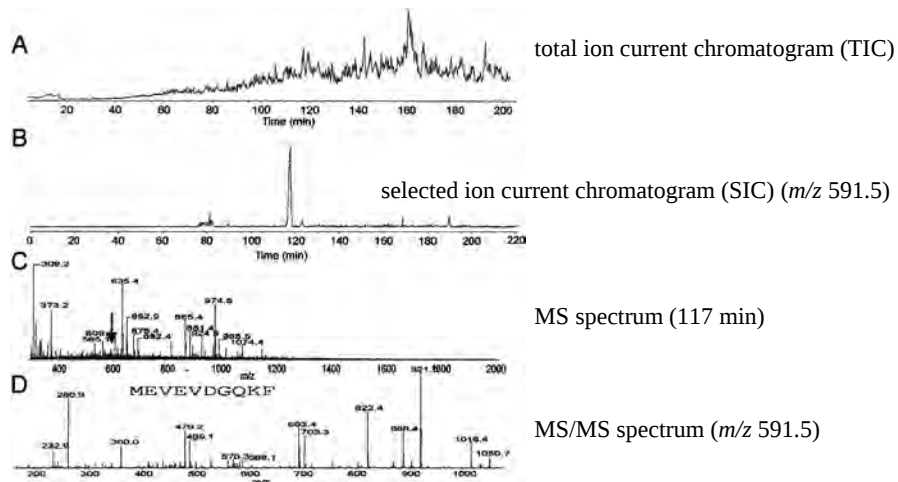
Configuraciones ESI-MS, Doble Ortogonal



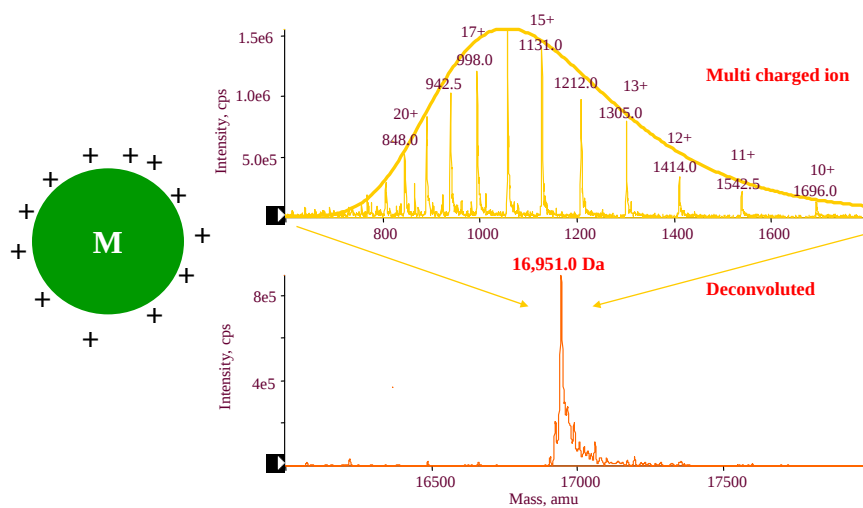
Diferentes interfaces para ESI-MS

ESI	LC-ESI	Nano-ESI
		
Needle ID: 100 μm Flow rate: 0.3 $\mu\text{l/min}$ Voltage: 2500 V Distance: 7 mm	Needle ID: 150 μm Flow rate: 10 $\mu\text{l/min}$ Voltage: 4500 V Distance: 10 mm	Needle ID: 1 μm Flow rate: 25 nL/min Voltage: 700 V Distance: 1 mm

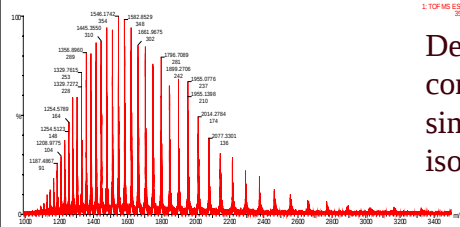
LC-MS, Métodos de detección



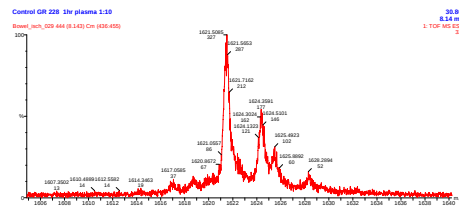
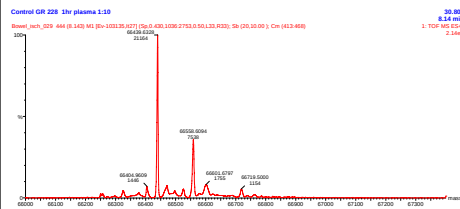
ESI-MS Spectrum of a Protein



ESI-MS Spectrum of a Protein



Deconvolution is the procedure to convert multiply charged peaks to singly charged, and sum up all the isotopic ion peaks



ESI Transformation

- ❑ Software can be used to convert these multiplet spectra into single (zero charge) profiles which gives MW directly
- ❑ This makes MS interpretation much easier and it greatly increases signal to noise
- ❑ Two methods are available:
Transformation (requires prior peak ID)
Maximum Entropy (no peak ID required)

ESI-MS, Métodos de detección

Product or Daughter Ion Scanning

first analyzer selects ion for further fragmentation
most often used for peptide sequencing

Precursor or Parent Ion Scanning

no first filtering, used for glycosylation studies

Neutral Loss Scanning

selects for ions of one chemical type (COOH, OH)

Selected/Multiple Reaction Monitoring

selects for known, well characterized ions only

ESI-MS, Ventajas

- 1) Good for charged, polar or basic compounds.
- 2) Permits the detection of high-mass compounds at mass-to-charge ratios that are easily determined by most mass spectrometers (m/z typically less than 2000 to 3000).
- 3) Best methods for analysing multiply charged compounds.
- 4) Very low chemical background leads to excellent detection limits.
- 5) Can control presence or absence of fragmentation by controlling the interface lens potentials.
- 6) Compatible with MS/MS methods.

ESI-MS, Desventajas

- 1) Multiply charged species require interpretation and mathematical transformation.
- 2) Very sensitive to contaminants such as alkali metals or basic compounds.
- 3) Relatively low ion currents.
- 4) Relatively complex hardware compared to other ion sources.