

Revisió

L'espectrometria de masses com a principi de mesura: fonaments i aplicació en les ciències de laboratori clínic

Raül Rigo Bonnin

Laboratori Clínic, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat

ÍNDEX

1. Introducció
2. Vocabulari
3. Espectrometria de masses
 - 3.1 Fonaments
 - 3.2 Instrumentació
 - 3.2.1 Sistemes d'entrada de la mostra
 - 3.2.1.1. Sistemes d'entrada per sonda directa
 - 3.2.1.2. Sistemes d'entrada cromatogràfics
 - 3.2.2 Sistemes d'ionització de la mostra
 - 3.2.2.1. Sistemes d'ionització de bombardeig amb àtoms ràpids
 - 3.2.2.2. Sistemes d'ionització-desorció amb làser assistida per una matriu
 - 3.2.2.3. Sistemes d'ionització a pressió atmosfèrica
 - 3.2.3 Sistemes de buit
 - 3.2.4 Analitzadors de masses
 - 3.2.4.1 Analitzadors de masses de quadrupol
 - 3.2.4.2 Analitzador de masses de trampa iònica
 - 3.2.4.3 Analitzadors de masses de temps de vol
 - 3.2.4.4 Analitzadors de masses de transformada de Fourier-ressonància iònica ciclotrònica
 - 3.2.4.5 Analitzadors de masses de sector magnètic
 - 3.2.5 Sistemes de detecció
 - 3.2.5.1 Detectors de copa de Faraday
 - 3.2.5.2 Multiplicadors d'electrons secundaris
 - 3.2.5.3 Detectors tipus *Channeltron*

3.2.5.4 Detectors de conversió fotònica o de centelleig**3.2.5.5 Detectors multicanal****3.2.6 Espectrometria de masses en tàndem****4. Aplicacions de l'espectrometria de masses en les ciències de laboratori clínic****4.1 Aplicacions de l'espectrometria de masses mitjançant la utilització d'isòtops estables com a traçadors metabòlics o estàndards interns****4.1.1 Espectrometria de masses de relació isotòpica****4.1.2 Espectrometria de masses de dilució isotòpica****4.2 Exemples d'aplicacions de l'espectrometria de masses en les ciències de laboratori clínic****5. Bibliografia****1. INTRODUCCIÓ**

L'espectrometria de masses va tenir el seu origen en els experiments desenvolupats pel físic anglès Joseph John Thomson el 1897. Thomson va descobrir que en aplicar descàrregues elèctriques sobre un gas es produïen ions i que aquests podien adoptar distintes trajectòries parabòliques d'acord amb la seva massa quan es feien passar a través d'un camp electromagnètic. Thomson va realitzar la construcció del primer espectròmetre de masses, anomenat *paràbola espectrogràfica*, per a la mesura de la relació massa/càrrega d'ions. Anys més tard, un dels estudiants de Thomson, en Francis William Aston el 1919, va ser qui va dissenyar diversos espectròmetres de masses en els quals els ions eren dispersats per les seves masses i enfocats d'acord a la seva velocitat. A la dècada dels anys 20, Arthur J. Dempster, va desenvolupar un analitzador de masses magnètic que enfocava els ions generats per impacte electrònic sobre un col·lector elèctric. Aquest disseny va ser adaptat per Josef Mattauch, Richard Herzog, Kenneth Bainbridge, Alfred Nier i altres, permetent importants descobriments en física atòmica i nuclear en els anys 30. Durant els anys 30 i 40, Alfred Nier va incorporar les tecnologies de buit i d'electrònica per millorar l'acompliment dels primers dissenys d'espectròmetres de masses. Aquests instruments

van ser originalment desenvolupats amb el propòsit de mesurar de forma precisa els pesos atòmics dels elements i els seus isòtops. Tot i això, no va ser fins a finals dels anys 40 quan es varen construir els primers espectròmetres de masses disponibles comercialment (1). Amb el temps, es varen anant desenvolupant diferents analitzadors de masses com ara l'analitzador de temps de vol a l'any 1948, l'analitzador de quadrupol el 1953, l'analitzador de trampa iònica el 1956 i l'analitzador de transformada de Fourier-ressonància iònica ciclotrònica el 1974. Als anys 80, es varen desenvolupar els sistemes d'ionització capaços d'ionitzar molècules biològiques com la ionització mitjançant el bombardeig amb àtoms ràpids, la ionització mitjançant electroesprai i la ionització-desorció amb làser assistida per una matriu amb àtoms ràpids (1).

Els sistemes de mesura que empren l'espectrometria de masses com a principi de mesura són els més versàtils, robusts, específics i selectius que han aparegut als darrers 30 anys en el camp de les ciències de laboratori clínic. Tot i que presenten com a principals inconvenients certa complexitat de maneig i interpretació de resultats, la seva elevada capacitat per poder separar, aïllar, identificar i quantificar diversos components d'una mostra així com el desenvolupament de sistemes d'entrada de

mostres a pressió atmosfèrica, entre els mètodes cromatogràfics i l'espectrometria de masses, n'han facilitat la seva incorporació en els laboratoris clínics. (2).

Aquesta revisió pretén donar a conèixer els fonaments bàsics de l'espectrometria de masses, així com enumerar les seves aplicacions dins de l'àmbit de les ciències de laboratori clínic.

2. VOCABULARI

En aquest document són aplicables, entre altres, els termes relacionats amb l'espectrometria de masses o químics de la Federació Internacional de Química Pura i Aplicada (d'ara endavant, IUPAC) (3, 4):

ànode: elèctrode on té lloc un procés d'oxidació

càtoode: elèctrode on té lloc el procés de reducció

col·lector: substància sòlida que s'afegeix o es forma en una solució per recollir un micro o macrocomponent

derivatització: procediment emprat en química que transforma un compost químic en un altre d'estructura química similar

desorció: disminució de la quantitat de substància adsorbida

dínnode: ànode que es troba en un multiplicador d'electrons o fotomultiplicador

dissociació: separació d'una entitat molecular en dues o més entitats moleculars (o qualsevol separació similar dins d'una entitat molecular poliatòmica), per exemple, la separació dels components d'un parell d'ions en ions lliures.

dissociació induïda per col·lisió: dissociació d'un ió després de la seva excitació per col·lisió

efluent : fase mòbil que surt de la columna cromatogràfica

espectre de masses: representació de les abundàncies relatives d'un feix d'ions enfront de la seva relació massa/càrrega

espectròmetre de masses: instrument que permet mesurar les abundàncies i relacions massa/càrrega dels ions en fase gasosa

espectrometria de masses: estudi de la matèria a través de la formació d'ions en fase gasosa que són caracteritzats, mitjançant un espectròmetre de masses, segons la seva massa, càrrega, estructura o propietats fisicoquímiques

espectrometria de masses de dilució isotòpica: mètode quantitatiu d'espectrometria de masses en què un compost isotòpicament enriquit s'utilitza com a estàndard intern

espectrometria de masses de relació isotòpica: mesurament i estudi de les abundàncies relatives dels diferents isòtops d'un element en un material determinat mitjançant la utilització d'un espectròmetre de masses

estàndard intern: compost que s'afegeix en una mostra a una quantitat coneguda i que permet mesurar la concentració d'un component de la mostra. L'estàndard intern és un compost químicament similar al component d'interès de la mostra pel què les possibles pèrdues que es puguin produir en el procediment de mesura són les mateixes per ambdós i per tant, la mesura de la concentració del component pot ser calculada en relació a la de l'estàndard intern.

espín: propietat física de les partícules subatòmiques que correspon al moment angular degut a la seva rotació sobre el seu propi eix

fase mòbil: fluid que penetra a través o al llarg del llit cromatogràfic en una direcció determinada

fosforescència: luminescència de llarga durada

imatge de corrent: corrent que resulta de la càrrega d'un ió com a conseqüència del seu moviment coherent en passar a prop d'un conductor

interfície de cinta mòbil: interfície d'un espectròmetre de masses per a mostres líquides que utilitza dues o més politges i un bucle continu. Les mostres són polvoritzades i dipositades sobre una cinta on són transportades al sistema de buit per a la seva vaporització, desorció i ionització

interfície de feix de partícules: interfície emprada per acoblar un cromatògraf líquid amb un

espectròmetre de masses en què es fa passar l'efluent a través d'un capil·lar escalfat per formar un feix d'expansió de vapor i partícules d'aerosol. Posteriorment, el feix de partícules format es fa incidir sobre una superfície escalfada per formar ions mitjançant una ionització química

interfície de termoesprai o termonebulització:

interfície emprada per acoblar un cromatògraf líquid amb un espectròmetre de masses en què l'efluent es fa fluir a través d'un capil·lar escalfat per produir una polvorització de gotetes i la vaporització del dissolvent. Els ions es formen a causa del desequilibri de les càrregues de les gotetes o mitjançant un filament calent

introducció directa de líquid: introducció directa d'una mostra líquida en una font d'ions d'ionització química d'un espectròmetre de masses emprant una lenta taxa de flux de dissolvent

ió precursor: ió que reacciona per formar ions producte o que pateix pèrdues neutres de massa específiques

NOTA: La reacció originada pot ser deguda a una dissociació unimolecular, una reacció ió-molècula o un canvi en l'estat de la càrrega com a conseqüència d'una isometrització

ió producte: ió format com el producte d'una reacció que implica un ió precursor en particular

NOTA: La reacció originada pot ser deguda a una dissociació unimolecular, una reacció ió-molècula o un canvi en l'estat de la càrrega com a conseqüència d'una isometrització

ionització dura: formació d'ions en fase gasosa acompanyada d'una elevada fragmentació

ionització per desorció: formació d'ions en fase gasosa a partir d'una superfície sòlida o líquida d'una mostra després de la seva activació per calor, per un fort camp elèctric, per partícules o per un bombardeig amb protons

ionització química: formació d'un nou ió en la fase gasosa per la reacció d'un compost neutre amb un ió

NOTA: El procés pot implicar la transferència d'un electró, d'un protó, o d'altres espècies carregades entre els reactants.

ionització suau: formació d'ions en fase gasosa sense que es presenti una fragmentació elevada

isòmer: una de diverses espècies (o entitats moleculars) que tenen la mateixa composició atòmica (fórmula molecular), però diferent fórmula empírica o fórmula estereoquímica i per tant, presenten distintes propietats físiques o químiques

isomerització: reacció química on el producte principal de la reacció és isòmer amb el reactiu principal

isòtop: núclid que presenta el mateix nombre atòmic però diferent nombre màssic

luminiscència: emissió espontània de radiació d'una espècie electrònicament o vibratòriament excitada degut a que no es troba en equilibri tèrmic amb el seu entorn

nombre atòmic: nombre de protons que presenta el nucli d'un àtom

nombre màssic: nombre total de partícules pesades (neutrons i protons) que presenta el nucli d'un àtom

nebulització: dispersió d'un líquid sobre un gas a partir de la formació de partícules líquides molt petites que romanen barrejades en suspensió amb el gas

núclid: espècie d'àtom, que es caracteritza pel seu nombre màssic, nombre atòmic i estat d'energia nuclear, amb la característica que la seva vida mitjana en aquest estat energètic és prou llarg com per a ser observable

polaritat (química) : propietat d'un enllaç químic, un àtom o una molècula per la qual existeix una separació estable entre les càrregues positives i negatives

reflectró: component d'un espectròmetre de masses de temps de vol que utilitza un camp elèctric estàtic per invertir la direcció de desplaçament dels ions i millora la resolució de massa, assegurant que els ions amb una mateixa relació massa/càrrega però amb diferent energia de translació arriben al detector en el mateix temps

3. ESPECTROMETRIA DE MASSES

3.1 Fonaments

L'espectrometria de masses o MS (acrònim de l'anglès *mass spectrometry*) és un principi de mesura que permet, a partir del mesurament de magnituds bàsiques com la càrrega i la massa, separar, aïllar, identificar i quantificar de manera inequívoca els diferents components d'una mostra en funció de les interaccions químiques existents entre les substàncies que la componen (5).

Fonamentalment, l'espectrometria de masses es basa en l'obtenció d'ions a partir de molècules en fase gasosa que són posteriorment separats segons la seva massa i la seva càrrega, i finalment detectats mitjançant un dispositiu adequat. Un espectre de masses serà, en conseqüència, una informació bidimensional on es representa l'abundància dels diferents tipus d'ions en funció de la relació massa/càrrega de cada un d'ells (1, 5).

L'espectrometria de masses té molt poc en comú amb altres principis de mesura espectromètrics, ja que, en sentit estricte, no ho és. Des d'un punt de vista físic, un espectre aporta una informació bidimensional que representa i relaciona un fenomen com l'emissió o absorció d'una radiació amb l'energia d'aquesta radiació. En l'espectrometria de masses, no s'utilitza cap tipus de radiació, de manera que bàsicament, no pot ser considerada com un principi espectromètric. Una altra diferència essencial que presenta l'espectrometria de masses amb les espectrometries clàssiques (per exemple, d'absorció o d'emissió molecular) és que en aquestes últimes, els fenòmens són purament físics, no destructius, de manera que la mostra utilitzada per a l'obtenció de l'espectre no es modifica químicament i, per tant, es pot tornar a recuperar. Per contra, en

l'espectrometria de masses, durant l'obtenció de l'espectre tenen lloc fenòmens químics, fent que la mostra utilitzada es destrueixi i no pugui recuperar-se (1, 5).

Com ja s'ha esmentat, els fenòmens que tenen lloc en l'espectrometria de masses són de naturalesa química i, en conseqüència, la presència i abundància en l'espectre de determinats tipus d'ions, identificables a partir de la seva massa, serà funció de l'estructura química de cada compost. Així, la informació oferta per un espectre de masses és comparable a l'obtinguda mitjançant una gran quantitat de reaccions utilitzades per a la identificació d'estructures per via química, de manera que l'espectrometria de masses pot oferir una enorme quantitat d'informació sobre un compost determinat.

3.2 Instrumentació

Un espectròmetre de masses està format per diversos components que inclouen un sistema d'entrada de la mostra, una font d'ionització per ionitzar els components de la mostra, un sistema de buit per mantenir pressions molt baixes (entre 10 i 100 Pa), un o diversos analitzadors de masses per separar els ions produïts, un detector o comptador d'ions i finalment, un sistema de processament de dades que reproduïx l'espectre de masses (Figura 1) (1, 5).

Existeixen diversos sistemes tant d'ionització com d'analitzadors dels ions que resulten en diferents tipus d'espectròmetres de masses en funció de les seves diferents combinacions.

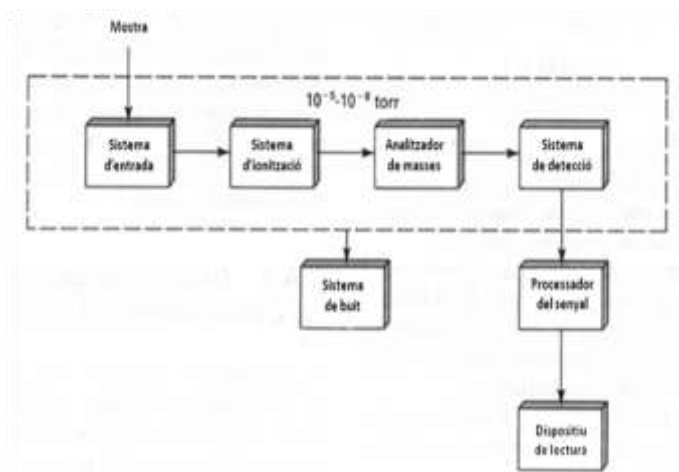


Figura 1. Components d'un espectròmetre de masses.

3.2.1 Sistemes d'entrada de la mostra

La finalitat d'un sistema d'entrada és permetre la introducció d'una mostra representativa en el sistema d'ionització amb una mínima pèrdua de buit. L'elecció del sistema d'entrada de la mostra en l'espectròmetre de masses dependrà de les propietats fisicoquímiques dels components que es vulguin separar, identificar, aïllar i quantificar. Els espectròmetres de masses més moderns estan equipats amb dos tipus d'entrades capaços d'acomodar diversos tipus de mostres, i inclouen els sistemes d'entrada de sonda directa i els sistemes d'entrada cromatogràfics (1, 5).

3.2.1.1 Sistemes d'entrada per sonda directa

Els líquids i sòlids no volàtils es poden introduir al sistema d'ionització mitjançant un suport de mostra o sonda, el qual s'insereix a través d'una càmera intermèdia de buit. La càmera intermèdia està dissenyada per limitar el volum d'aire que pot entrar al sistema d'ionització durant la inserció de la sonda. La mostra es posa generalment en la superfície d'un vidre o en un tub capil·lar d'alumini, un filferro fi o una copa petita i la sonda es col·loca a uns pocs mil·límetres de la font d'ionització i d'una l'esclatxa que condueix a l'espectròmetre (1).

3.2.1.2 Sistemes d'entrada cromatogràfics

La combinació de mètodes cromatogràfics, com la cromatografia de gasos o la cromatografia líquida d'alta eficàcia, i l'espectrometria de masses ha estat sempre un objectiu desitjat al camp de la química analítica degut a l'elevada especificitat intrínseca i la capacitat d'anàlisi de mesclures complexes que presenta l'espectrometria de masses en comparació amb altres sistemes de detecció cromatogràfics com els visible-ultraviolats, els fluorimètrics o els voltamperomètrics (electroquímics). El seu principal avantatge sobre aquests sistemes de detecció és, d'una banda, la seva capacitat per subministrar informació útil des d'un punt de vista identificatiu, de manera que l'espectre de masses es presenta així com una prova gairebé inequívoca de la identitat del component la concentració del qual es mesura i, d'altra banda, es tracta d'un sistema de detecció universal basat en la separació de substàncies carregades d'acord amb la seva relació massa/càrrega (5).

Avui dia l'acoblament de l'espectrometria de masses a la cromatografia de gasos, utilitzada de forma rutinària en molts laboratoris d'anàlisi, es considera robusta i amb una utilitat inqüestionable. Aquest fet és degut a la utilització de l'impacte electrònic com a sistema d'ionització el qual dona lloc a una fragmentació reproducible dels components d'una mostra independentment de la instrumentació utilitzada, possibilitant la creació de llibreries amb espectres de masses característics per a multitud de substàncies. No obstant, el principal inconvenient que presenta la cromatografia de gasos és la dificultat en l'anàlisi de determinats compostos, com substàncies poc volàtils, polars o termolàbils, fent necessària la utilització de laboriosos procediments de derivatització per dur-les a terme (1, 5, 6).

Aquesta limitació de la cromatografia de gasos va donar lloc a la investigació sobre les possibilitats que podria oferir l'acoblament de la cromatografia líquida d'alta eficàcia a l'espectrometria de masses. La seva combinació permetria aprofitar els avantatges d'aquest versàtil mètode de separació amb la gran especificitat i capacitat identificadora de l'espectrometria de masses (1, 2, 5, 6). El problema fonamental que va sorgir en l'acoblament de la cromatografia líquida d'alta eficàcia i l'espectrometria de masses va ser l'enorme contrast que hi havia entre els volums relativament grans de dissolvent de la primera i els requeriments de buit de l'última. Per resoldre aquest problema es van desenvolupar diverses interfícies o sistemes d'entrada de la mostra. La primera solució per contrarestar aquest problema va ser publicada per Arpino *et al.* el 1974 (7). Des de llavors, s'han descrit en la bibliografia més de 25 interfícies diferents (8), de les quals només unes poques han tingut aplicació pràctica i han arribat a ser comercialitzades (1, 5). De les interfícies que es van utilitzar durant un temps i avui dia estan en desús, es poden destacar la interfície d'introducció directa de líquid o DLI (acrònim de l'anglès *direct liquid introduction*) i la cinta mòbil o MB (acrònim de l'anglès *moving belt*). Les interfícies que s'usen rutinàriament en l'actualitat per a la introducció i anàlisi de mostres líquides per espectrometria de masses poden classificar-se en dos grups: les que només introdueixen la mostra líquida a la font d'ionització de l'instrument com ara les de feix de partícules o PB (acrònim de l'anglès *particle beam*) i les que, a més, aconseguixen la ionització de la mateixa com les interfícies de termoesprai o termonebulització o TSP (acrònim de l'anglès *thermospray*), de bombardeig amb àtoms ràpids o FAB (acrònim de l'anglès *fast atom bombardment*) i

d'ionització a pressió atmosfèrica o API (acrònim de l'anglès *atmospheric-pressure ionization*). No obstant això, han sigut les interfícies d'ionització a pressió atmosfèrica com l'electroesprai o ESI (acrònim de l'anglès *electrospray*) i la ionització química a pressió atmosfèrica o APCI (acrònim de l'anglès *atmospheric-pressure chemical ionization*) les que han donat lloc, en les últimes dècades, a l'enorme expansió experimentada per la cromatografia líquida acoblada a l'espectrometria de masses en multituds de camps científics, entre els que es troben les ciències de laboratori clínic. Cal destacar altres sistemes d'entrada de la mostra que permeten també la seva ionització com són la ionització-desorció amb làser assistida per una matriu o MALDI (acrònim de l'anglès *matrix-assited laser desorption-ionitation*) i la ionització-desorció amb làser sobre superfícies reforçades o SELDI (acrònim de l'anglès *surface-enhanced laser desorption-ionitation*) que actualment presenten una aplicació en el camp de la proteòmica (1, 5).

3.2.2 Sistemes d'ionització de la mostra

Principalment, els sistemes d'ionització es poden classificar en *sistemes d'ionització o fonts d'ions durs o suaus*. Les fonts dures, com ara les fonts d'impacte electrònic, comuniquen energies elevades als ions formats de manera que es troben en estats vibracionals i rotacionals excitats. La relaxació d'aquests ions produeix una gran quantitat de fragmentació dels components de la mostra, resultant espectres de masses complexos. Per contra, les fonts suaus, com ara les fonts d'ionització química i les de desorció, com la ionització a pressió atmosfèrica, produeixen relativament poca excitació dels ions, de manera que, té lloc poca fragmentació, i els espectres de masses són més senzills. Els

espectres senzills produïts com a conseqüència de les fonts suaus permeten la mesura exacta de la massa molar dels components d'una mostra, mentre que els models espectrals més complexos de les fonts dures sovint permeten una identificació inequívoca d'aquest (1).

Per altra banda, quan el sistema d'entrada de la mostra és un cromatògraf de gasos, la mostra es troba en un estat vaporitzat o gasós i l'única funció de la font d'ionització és ionitzar les molècules neutres (és a dir, conferir càrrega) mitjançant l'aplicació d'energia. En aquest tipus d'acoblaments, la ionització es produeix a pressions molt baixes, o sigui, en un estat de buit. En contraposició, quan el sistema d'entrada és un cromatògraf líquid d'alta eficàcia, les fonts d'ionització són interfícies més sofisticades que han trigat gairebé més de 30 anys a ser desenvolupades. Com ja s'ha comentat amb anterioritat, aquest lent desenvolupament s'ha degut a l'enorme contrast que existeix entre els volums relativament grans de dissolvent de la cromatografia líquida i els requeriments de buit de l'espectrometria de masses. Per això, les interfícies o fonts d'ionització desenvolupades han tingut la doble funció d'eliminar el dissolvent (normalment present en ordres de 0,5-10 mL/min) i vaporitzar i ionitzar la mostra. En aquest tipus d'acoblament, la ionització es produeix a pressió atmosfèrica (5).

A la Figura 2, s'indica l'interval d'aplicació dels diferents sistemes d'ionització d'acord a la mida i a la polaritat dels components d'una mostra.

Dels diferents sistemes d'ionització existents, a continuació, es descriuen tan sols aquells que permeten l'acoblament de la cromatografia líquida d'alta eficàcia a l'espectrometria de masses, donat que són els que major utilitat presenten en les ciències de laboratori clínic.

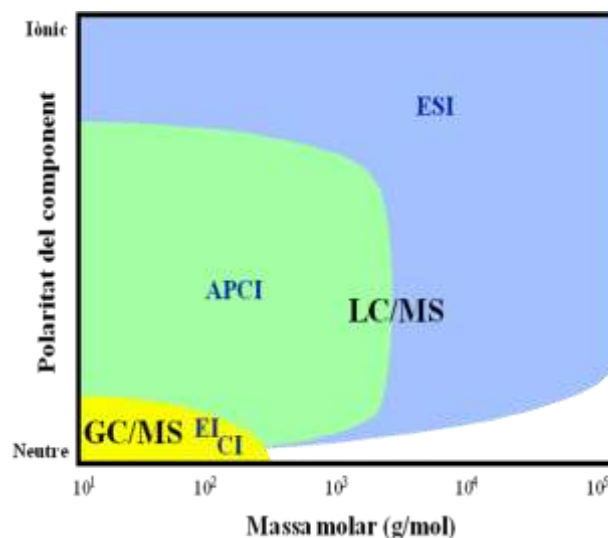


Figura 2. Interval d'aplicació dels diferents sistemes d'ionització en funció de la massa molar i la polaritat dels components d'una mostra.

GC/MS : Acrònim de l'anglès *gas chromatography/mass spectrometry* (cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses)

EI : Acrònim de l'anglès *electron impact* (impacte electrònic)

CI : Acrònim de l'anglès *chemical ionization* (ionització química)

LC/MS : Acrònim de l'anglès *liquid chromatography/mass spectrometry* (cromatografia líquida d'alta eficàcia acoblada a l'espectrometria de masses)

ESI : Acrònim de l'anglès *electrospray ionization* (ionització mitjançant electroesprai)

APCI : Acrònim de l'anglès *atmospheric-pressure chemical ionization* (ionització química a pressió atmosfèrica)

3.2.2.1 Sistemes d'ionització de bombardeig amb àtoms ràpids

Els sistemes d'ionització de bombardeig amb àtoms ràpids o FAB (acrònim de l'anglès *fast atom bombardment*) han adquirit un paper important en la producció d'ions per a l'estudi per espectrometria de masses de components d'elevada massa molar. En aquests sistemes d'ionització, els components d'una mostra, en un estat condensat i sovint en una matriu amb una dissolució de glicerol, s'ionitzen mitjançant el bombardeig amb àtoms d'elevada energia de xenó o argó. Tant els ions positius com els negatius dels components de la mostra són expulsats de la superfície per un procés de desorció (Figura 3). Aquest tractament permet un escalfament molt ràpid de la mostra, el que redueix la seva fragmentació. La matriu líquida ajuda a reduir l'energia reticular, la qual

ha de ser vençuda perquè es desorbeixi un ió de la fase condensada i proporcioni una manera d'eliminar l'efecte produït pel bombardeig (1, 5).

El bombardeig de compostos orgànics o bioquímics amb àtoms ràpids normalment produeix quantitats significants d'ions moleculars fins i tot per a components d'elevada massa molar i tèrmicament inestables.

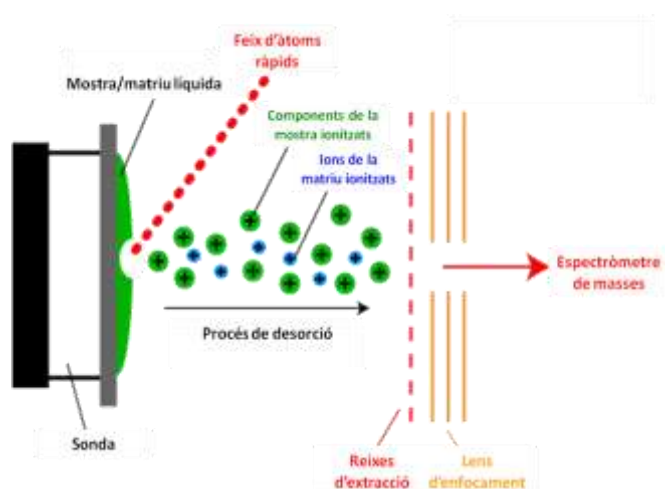


Figura 3. Esquema del mecanisme de funcionament d'un sistema d'ionització de bombardeig per àtoms ràpids.

3.2.2.2 Sistemes d'ionització-desorció amb làser assistida per una matriu

Els sistemes d'ionització-desorció amb làser assistida per una matriu o MALDI (acrònim de l'anglès *matrix-assited laser desorption-ionitation*) són una evolució dels sistemes d'ionització de bombardeig amb àtoms ràpids. Les diferències fonamentals radiquen en què la matriu és sòlida (cristal·lina) enlloc de líquida i que el bombardeig es duu a terme a partir de fotons enlloc d'àtoms ràpids. El resultat final és un enorme increment, comparat amb el FAB, tant en la sensibilitat metrològica i capacitat de detecció com en l'interval de masses dels components analitzables (1, 5).

En aquests sistemes d'ionització, la mostra es dissol en la matriu sòlida i es deixa cristal·litzar en una

targeta d'acer inoxidable. Les matrius més apropiades inclouen àcid 2,5-dihidroxibenzoic i àcid sinapínic. Després, la targeta s'introdueix en l'espectròmetre de masses i la superfície és bombardejada per un feix polsant de llum làser (làser de nitrogen a una longitud d'ona de 337 nm). Els components es desorbeixen de la superfície de la matriu i s'ionitzen, normalment, per protonació o desprotonació (Figura 4) (1, 5).

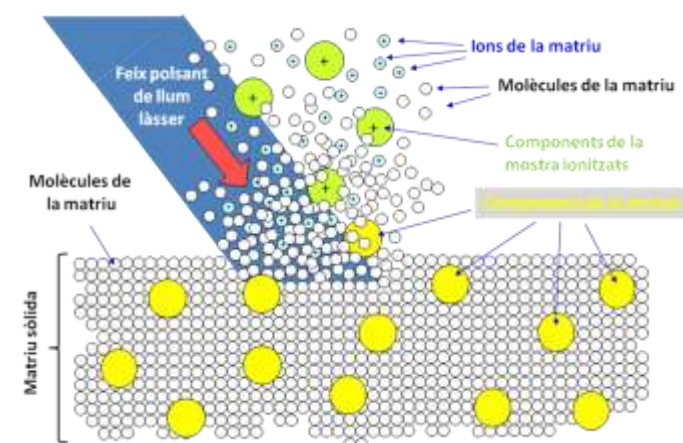


Figura 4. Esquema del mecanisme de funcionament d'un sistema d'ionització-desorció amb làser assistida per una matriu.

3.2.2.3 Sistemes d'ionització a pressió atmosfèrica

La ionització a pressió atmosfèrica o API (acrònim de l'anglès *atmospheric-pressure ionization*) és un sistema d'ionització suau que, en actuar a pressió atmosfèrica, i no en alt buit com és l'habitual en altres sistemes, aconsegueix un altíssim rendiment. En general, aquests sistemes ionitzen la mostra a pressió atmosfèrica, eliminen el dissolvent, s'ionitzen els components i es traslladen els ions a l'espectròmetre de masses.

Els dos sistemes d'ionització a pressió atmosfèrica més comunament utilitzats són l'electrosprai o ESI (acrònim de l'anglès *electrospray*) i la ionització química a pressió atmosfèrica o APCI (acrònim de l'anglès *atmospheric pressure chemical ionization*).

En la ionització mitjançant electroesprai, la mostra líquida s'introdueix a través d'un capil·lar al qual s'aplica un voltatge elevat (generalment, 2-5 kV). Sota la influència del camp elèctric generat, els ions de la mateixa polaritat migren cap a l'extrem del capil·lar on el líquid comença a formar un con (con de Taylor) a partir del qual es generen petites gotes altament carregades. Per permetre la formació d'un esprai estable a fluxos de 50-200 $\mu\text{L}/\text{min}$, aquest procés és assistit amb un flux coaxial de nitrogen (gas de nebulització). A mesura que avancen al llarg de la font d'ionització, les gotes es van fent cada vegada més petites a causa de l'evaporació del dissolvent, augmentant el nombre de càrregues per unitat de superfície. Quan les forces coulòmbiques degudes a l'excés de càrregues superen les forces de cohesió a causa de la tensió superficial (límit de Rayleigh), es produeix la fissió de les gotes. Aquest procés d'instabilitat es repeteix successivament, portant a la formació de gotes molt més petites (3-10 nm) altament carregades. Posteriorment, té lloc el procés d'ionització dels components de la mostra en fase gasosa, mitjançant la desorció dels components carregats des de la superfície de la gota (Figura 5) (1, 5).

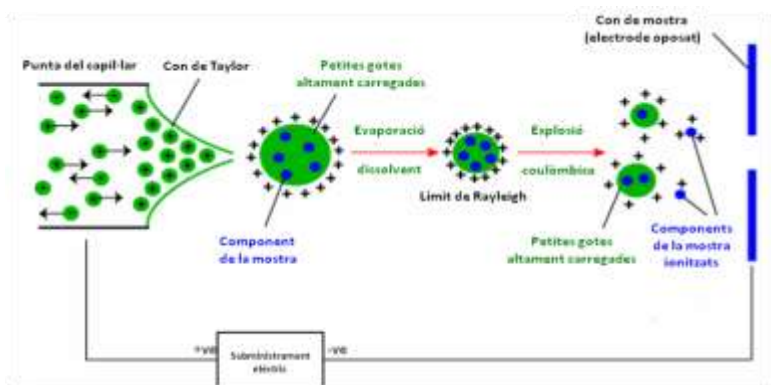


Figura 5. Esquema del mecanisme de funcionament d'un sistema d'ionització mitjançant electroesprai.

En la ionització química a pressió atmosfèrica, a diferència del que passa en la ionització mitjançant electroesprai, el procés d'evaporació i d'ionització

constitueixen dues etapes diferents. En la primera, l'eluent que procedeix de la columna cromatogràfica s'introdueix a la regió d'ionització a través d'un capil·lar sotmès a una temperatura entre 400-500 °C. Les altes temperatures aplicades i l'acció d'un flux coaxial de nitrogen provoquen la nebulització i la ràpida evaporació del dissolvent. En una segona etapa, a la sortida del capil·lar, un elèctrode produeix una descàrrega en corona (2-5 kV) que origina la ionització de les molècules de dissolvent, nitrogen i oxigen en fase gasosa afavorint la ionització dels components de la mostra formant adductes (per exemple, per captació o cessió d'un protó) i la ionització dels components per transferència de càrregues (Figura 6) (1, 5).

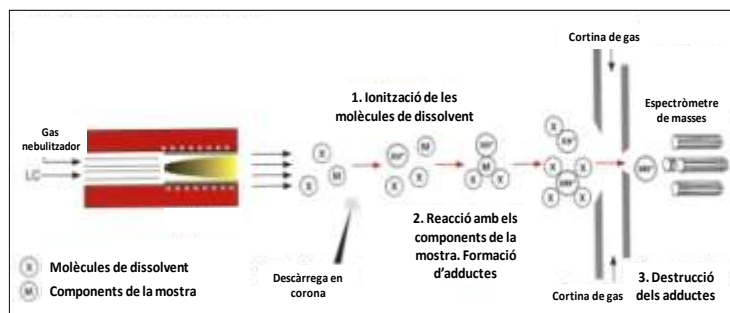


Figura 6. Esquema del mecanisme de funcionament d'un sistema d'ionització química a pressió atmosfèrica.

3.2.3 Sistemes de buit

Perquè un ió format a la font d'ionització recorri una trajectòria determinada fins arribar al detector, a l'interior de l'espectròmetre per on ha de moure's l'ió ha d'estar evacuat a un buit suficient per assegurar l'absència de col·lisions en el seu camí.

Els principals sistemes de buit que s'utilitzen per aconseguir l'alt buit en l'espectrometria de masses són les bombes difusores i les bombes turbomoleculares, sent, les segones les més àmpliament utilitzades en l'actualitat (1, 5).

3.2.4 Analitzadors de masses

Un cop formats els ions, aquests són transferits a l'analitzador de masses on es porta a terme la seva separació en funció de la seva relació massa/càrrega (m/z).

Existeixen diferents tipus d'analitzadors: de quadrupols, de trampa d'ions, de temps de vol, de sector magnètic i de transformada de Fourier-ressonància iònica ciclotrònica. Una característica comuna de tots ells és la necessitat de treballar en condicions de molt baixa pressió (~ 10 Pa) i de la separació dels ions en fase gasosa en funció de la seva relació massa/càrrega (m/z). No obstant això, difereixen en els mitjans emprats per dur a terme la separació i la informació subministrada per cada un d'ells quant a les seves propietats metrològiques (selectivitat, sensibilitat metrològica, capacitat de detecció, exactitud, precisió i veracitat), a la seva capacitat de resolució de masses, a l'interval de masses aplicable i a la velocitat d'escaneig emprat (1, 5).

3.2.4.1 Analitzadors de masses de quadrupol

Es tracta de l'analitzador de masses més versàtil i el més àmpliament utilitzat degut al seu fàcil maneig i al seu preu relativament econòmic si es compara amb altres analitzadors, juntament amb el fet que ofereix unes més que acceptables propietats metrològiques, resolució de masses, interval de masses i velocitat d'escaneig.

Consisteix en quatre corrons circulars (o hiperbòlics) disposats en paral·lel dos a dos entorn a un eix central. A cada un dels corrons se'ls hi aplica un corrent continu, de manera que els rodets oposats presenten una mateixa polaritat: un parell amb voltatge positiu, i l'altre, amb voltatge negatiu.

Mitjançant l'aplicació de dos camps elèctrics, un corrent continu i un potencial de radiofreqüència, els ions que entren en el quadrupol comencen a oscil·lar en un pla perpendicular a la longitud dels rodets de manera que, per a una combinació de corrent continu i radiofreqüència donada, només aquells que tenen una determinada relació m/z presenten una trajectòria estable i travessen el quadrupol sense xocar contra les parets fins arribar al detector (Figura 7) (1, 5).

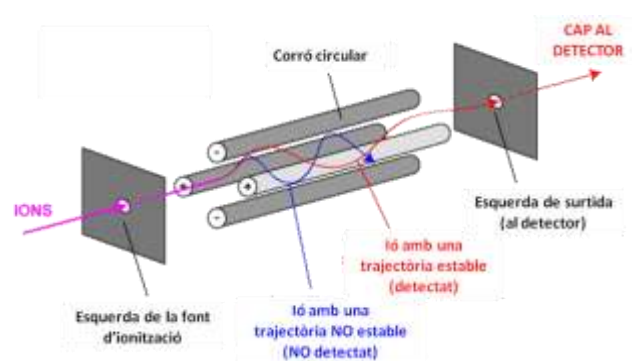


Figura 7. Esquema del mecanisme de funcionament d'un analitzador de masses de quadrupol.

En els espectròmetres que presenten analitzadors de masses de quadrupol, quan s'aplica un corrent continu i un potencial de radiofreqüència que només permet el pas d'un únic ió a través del quadrupol es diu que s'està treballant en la modalitat *monitorització selectiva d'ions* o SIM (acrònim de l'anglès *selected ion monitoring*). Pel contrari, quan es crea una rampa de combinacions d'aquests voltatges i a més es mantenen constants, s'aconsegueix que un interval determinat de masses (m/z) arribi fins al detector. Aquesta modalitat de treball es coneix com la modalitat d'escaneig (*scan* en anglès) (1, 5).

A més d'utilitzar-se en l'anàlisi de masses, en molts espectròmetres de masses, s'utilitzen quadrupols (hexapols, octapols) als quals només se'ls hi aplica el potencial de radiofreqüència amb la finalitat de focalitzar els ions en la seva transferència des de les

regions de pressió decreixent (sistemes d'ionització) fins a l'analitzador de masses (1).

3.2.4.2 Analitzadors de masses de trampa iònica

Els analitzadors de masses de trampa iònica o IT (acrònim de l'anglès *ion trap*) consisteixen en un elèctrode circular sotmès a un potencial de radiofreqüència, per sobre i sota del qual se situen dos elèctrodes hemisfèrics perforats, pels que els ions entren i surten de la trampa. Els ions són transmesos des de la font d'ionització per polsos i atrapats en la trampa on, per acció del potencial de radiofreqüència, adquireixen una freqüència d'oscil·lació que dependrà de la seva relació m/z . A l'interior de la trampa, la presència d'un gas (generalment heli) fa que els ions se situïn al centre, la qual cosa evita la pèrdua d'ions per col·lisió amb els elèctrodes, i millora la resolució, ja que limita la distribució espacial dels ions. Per fer un escombrat d'un interval de masses, es modifica l'amplitud del potencial de radiofreqüència (Figura 8) (1, 5).

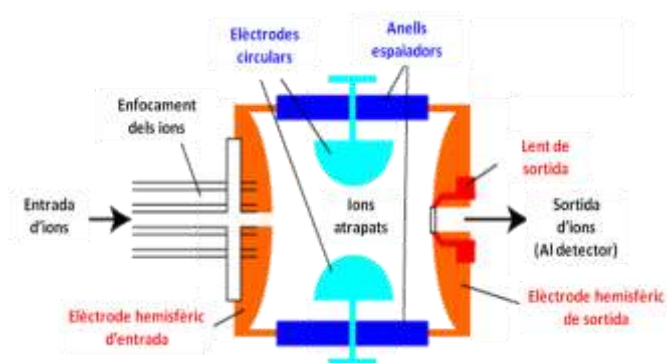


Figura 8. Esquema del mecanisme de funcionament d'un analitzador de masses de trampa iònica.

3.2.4.3 Analitzadors de masses de temps de vol

En els analitzadors de masses de temps de vol o TOF (acrònim de l'anglès *time of fly*) els ions són accelerats mitjançant l'aplicació d'un potencial cap a un "tub analitzador" o "tub de vol" d'un metre de longitud sobre el qual no actua cap potencial. Degut a que tots els ions que entren dins del tub presenten

idealment la mateixa energia cinètica, les seves velocitats en el tub varien de manera inversa a les seves masses, i per tant els ions dels components amb menor massa arriben abans al detector que els de major massa. Així doncs, la separació dels ions es basa en el temps necessari per recórrer la longitud del tub el qual dependrà de la seva relació massa/càrrega (m/z). Els primers analitzadors de temps de vol lineals no permetien obtenir una bona resolució degut principalment a l'energia de dispersió dels ions quan abandonen la font d'ionització. En l'actualitat, aquest efecte s'ha corregit mitjançant la utilització d'una disposició ortogonal del tub i la introducció, en el punt intermedi, d'una sèrie de lents sotmeses a diferents potencials (*reflectrons*), que donen lloc a una compensació de la dispersió inicial. Aquests tipus d'analitzadors presenten una excel·lent resolució i, teòricament, no tenen cap límit en quant a l'interval de masses que permeten mesurar (Figura 9) (1, 5).

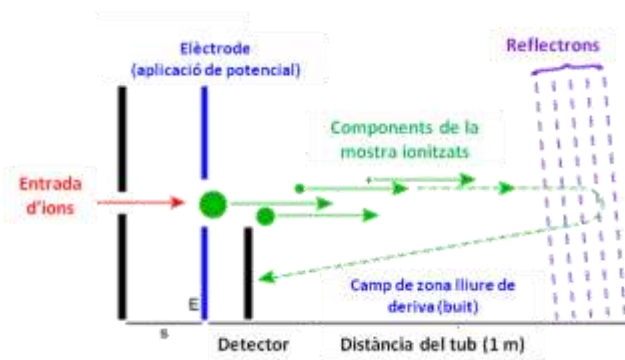


Figura 9. Esquema del mecanisme de funcionament d'un analitzador de masses de temps de vol.

3.2.4.4 Analitzadors de masses de transformada de Fourier-ressonància iònica ciclotrònica

Els analitzadors de masses de transformada de Fourier-ressonància iònica ciclotrònica o FT-ICR (acrònim de l'anglès *Fourier transform-ion cyclotron resonance*) són analitzadors tipus trampa iònica, que consisteixen en una cel·la cúbica formada per dos plats paral·lels (un d'entrada i un de sortida), dos

plats d'excitació i dos plats detectors. La cel·la és sotmesa a un elevat camp magnètic que provoca un moviment circular dels ions perpendicular a la direcció d'aquest camp magnètic sent el radi del moviment dels ions inversament proporcional a la seva relació massa/càrrega (m/z). Els ions que es troben a l'interior de la cel·la són excitats mitjançant un potencial de radiofreqüència que origina un augment del radi circular descrit. Quan els ions excitats passen prop dels plats receptors generen un corrent elèctric (anomenada *imatge de corrent*) la qual és detectada. A diferència de la resta d'analitzadors de masses, la detecció dels ions no es destrueix, pel que poden ser mesurats repetidament, amb el conseqüent augment de sensibilitat metrològica (Figura 10) (1, 5).

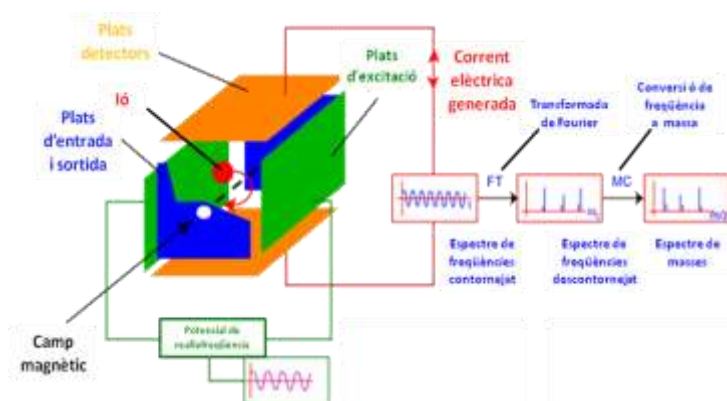


Figura 10. Esquema del mecanisme de funcionament d'un analitzador de masses de transformada de Fourier-resonància iònica ciclotrònica.

3.2.4.5 Analitzadors de masses de sector magnètic

En els analitzadors de masses de sector magnètic els ions són accelerats amb un voltatge cap a un camp magnètic, sota la influència del qual adquireixen un moviment circular. El radi de curvatura descrita per l'ió ve determinat pel camp magnètic, el potencial o voltatge aplicat i la seva relació massa/càrrega (m/z). Per a un valor fix de camp magnètic (i potencial), els ions d'una determinada massa/càrrega són detectats

per un detector el qual es troba ubicat en una posició fixa.

Els processos d'ionització donen lloc a una dispersió en l'energia cinètica dels ions en la seva sortida de la font. Per això, per millorar la resolució d'aquests analitzadors de masses, sol incorporar-se entre el sector magnètic i el detector un analitzador d'energia electrostàtica que focalitza els ions corregint la seva dispersió. A més, per reduir l'energia de dispersió dels ions i provocar la seva acceleració cap a l'analitzador, s'han d'emprar voltatges molt elevats en la font (generalment 5-8 kV), el que permet dur a terme la fragmentació dels ions en les regions lliures de camp magnètic. No obstant això, aquest voltatge és massa elevat per a treballar a pressió atmosfèrica i, per això, aquests analitzadors de masses no han tingut un paper important en el desenvolupament de l'acoblament de la cromatografia líquida amb l'espectrometria de masses (Figura 11) (1, 5).

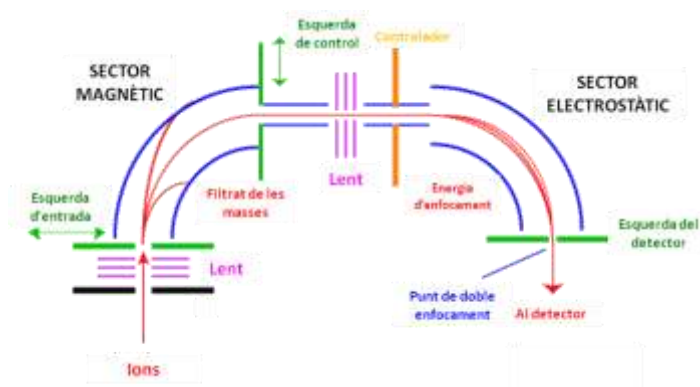


Figura 11. Esquema del mecanisme de funcionament d'un analitzador de masses de sector magnètic.

3.2.5 Sistemes de detecció

Comercialment són assequibles diversos tipus de detectors per espectròmetres de masses. En els primers anys predominaven els multiplicadors d'electrons de detecció puntual. Més tard van anant apareixent nous desenvolupaments dels mateixos, com els detectors tipus *Channeltron* de baix cost i ús

general, i els sistemes de conversió fotònica més sofisticats, sensibles i duradors. També han aparegut sistemes de detecció simultània, com ara les bateries de micromultiplicadors multicanal, combinats normalment amb centelleig o conversió fotònica.

3.2.5.1 Detectores de copa de Faraday

Un detector de copa de Faraday consisteix en un simple elèctrode, normalment en forma de copa o caixa, que rep l'impacte dels ions. Els ions es neutralitzen per transferència d'electrons, i el senyal es mesura com un corrent analògic igual o superior al corrent iònic original, depenent de la forma de l'elèctrode (Figura 12). És un detector de baixa sensibilitat metrològica i capacitat de detecció. Pot treballar a pressions relativament altes i posseeix una gran linealitat de resposta. La mínima corrent detectable és de l'ordre de 10^{-14} A (1).

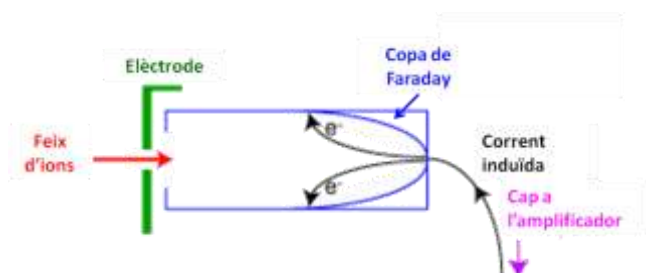


Figura 12. Esquema del mecanisme de funcionament d'un detector de copa de Faraday.

3.2.5.2 Multiplicador d'electrons secundaris

El multiplicador d'electrons secundaris és un dels detectors que més s'utilitzen en l'espectrometria de masses. Està format per un càtode i successius dínodes que presenten una superfície de coure i berili de les que s'emeten ràfegues d'electrons en ser assolides per ions o electrons d'elevada energia. L'ió a detectar xoca amb el primer dínode, provocant l'emissió d'un elevat nombre d'electrons, que incidiran sobre el segon dínode. El procés de multiplicació es repeteix successivament en els altres dínodes obtenint, al final del sistema, una

amplificació de senyal de l'ordre de 10^6 a 10^8 (Figura 13a). És un detector molt més sensible que el de copa de Faraday, amb un senyal mínim detectable de l'ordre de 10^{-18} A (1).

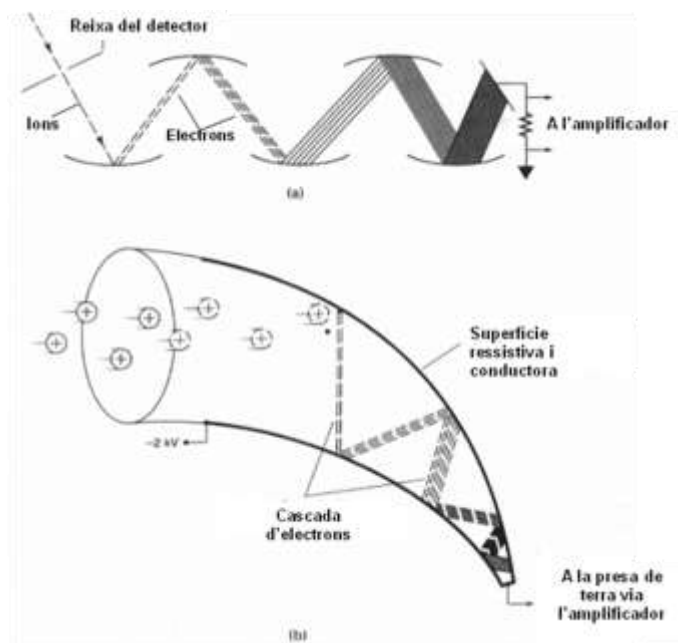


Figura 13. Esquema del mecanisme de funcionament de: (a) un multiplicador d'electrons secundaris; (b) detector Channeltron.

3.2.5.3 Detectores tipus Channeltron

Aquest detector és un dels més utilitzats avui en dia en l'espectrometria de masses per a ús general. És similar al multiplicador d'electrons clàssic, amb la principal diferència que no té múltiples dínodes discrets, sinó que està format per un tub de vidre en forma de corneta, de vegades acabat en forma d'espiral o caragol (Figura 13b), l'interior del qual està recobert per un òxid de plom semiconductor de composició i característiques especials.

Si es desitja detectar ions positius, s'aplica un potencial negatiu a l'entrada del detector perquè els ions procedents de l'espectròmetre de masses, desviats de la seva trajectòria per una placa repulsora amb potencial positiu, siguin atrets al seu interior i xoquin amb la cara interna produint l'emissió d'un cert nombre d'electrons. El final del tub del detector

presenta un potencial proper a la presa de terra, de manera que hi haurà un gradient continu de potencial des de l'entrada fins al fons del detector. A causa d'això, els electrons arrencats en l'impacte inicial de l'ió es desplaçaran en la direcció dels potencials menys negatius cap a un potencial zero, produint-se una gran quantitat d'impactes en el camí, en cada un dels quals es multiplicarà el nombre d'electrons (de l'ordre de 10^8). Al final del recorregut del tub multiplicador es troba un col·lector amb l'electrònica de preamplificació i amplificació associada. Per altra banda, els detectors tipus *Channeltron* poden exposar-se a pressió atmosfèrica sense cap problema, sempre que l'alt potencial hagi estat desconnectat, permetent trencar buit en el sistema sense complicacions (1).

3.2.5.4 Detector de conversió fotònica o de centelleig

Aquest detector és un dels més eficients, sensibles i de més llarga vida disponibles. Els ions procedents del tub de vol de l'espectròmetre de masses són desviats de la seva trajectòria mitjançant un potencial elèctric. El voltatge aplicat és de signe contrari a la càrrega dels ions que es vulguin detectar, per provocar la seva atracció i xoc sobre el dínode inicial. Aquest xoc produeix múltiples electrons que són atrets, a la vegada, per un voltatge més positiu que el del dínode, i aplicat sobre una pantalla fosforescent o de centelleig. En rebre l'impacte dels electrons, la pantalla de centelleig emet un gran nombre de fotons, els quals es dirigeixen a un fotomultiplicador convencional segellat al buit, produint-se la conseqüent cascada d'electrons que multiplica el senyal (Figura 14) (1).

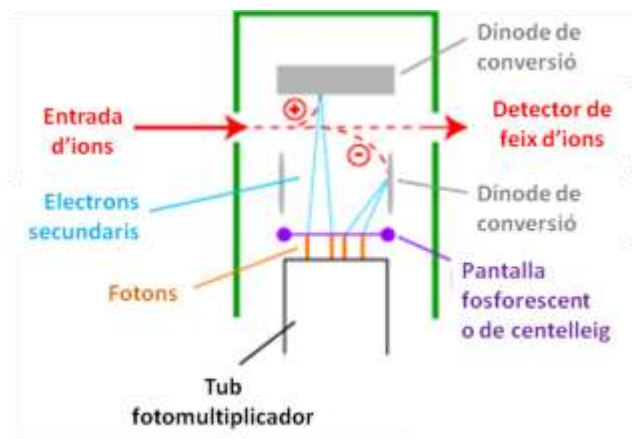


Figura 14. Esquema del mecanisme de funcionament d'un detector de conversió fotònica o de centelleig.

3.2.5.5 Detectors multicanal

Es basen en la utilització d'una o dues capes de bateries de micromultiplicadors seguides d'un sistema de detecció més o menys sofisticat i eficient, encarregat de detectar simultàniament tots els senyals. Aquest tipus de detectors reuneixen l'avantatge dels antics sistemes de fotoplaques de ser capaços de detectar simultàniament una àmplia zona espectral, el que augmenta enormement el temps d'observació de cada ió, amb la major sensibilitat, estabilitat, i capacitat d'amplificació dels moderns sistemes multiplicadors. Aquestes característiques condueixen a una sensibilitat augmentada en molts ordres de magnitud (1).

3.2.6 Espectrometria de masses en tàndem

En un espectròmetre de masses convencional, la separació dels ions es realitza emprant un sol analitzador de masses. Una alternativa a aquests tipus d'espectròmetres, que permet una millora substancial de l'especificitat o selectivitat dels mateixos i una major informació estructural dels components d'una mostra, consisteix en la combinació de dos analitzadors de masses en un mateix espectròmetre. Aquesta combinació rep el nom d'*espectrometria de masses en tàndem*. La combinació d'analitzadors de

masses més àmpliament utilitzada en les ciències de laboratori clínic és l'anomenada espectrometria de masses en tàndem de triple quadrupol o QqQ. En ella, s'utilitzen dos analitzadors de masses de quadrupol separats entre sí per una cel·la de col·lisió en la qual s'indueix la dissociació dels ions que arriben del primer quadrupol. És l'anomenada dissociació induïda per col·lisió o CID (acrònim de l'anglès *collision induced dissociation*). Aquesta combinació d'analitzadors de tipus quadrupol es tradueix en una disminució del soroll de fons respecte al que es produeix en un espectròmetre de masses convencional i, per tant, en un augment de la sensibilitat metrològica, de la capacitat de detecció i de la selectivitat o especificitat. En funció de com operin i es combinin els dos quadrupols (modalitat de monitorització selectiva d'ions o SIM o modalitat d'escaneig o *Scan*) ens permet treballar de diferents maneres (1, 5):

- Monitorització múltiple de reacció o MRM (acrònim de l'anglès *multiple reaction monitoring*) o monitorització selectiva de reacció o SRM (acrònim de l'anglès *selected reaction monitoring*)

Els dos quadrupols (el primer i el tercer) treballen en la modalitat SIM. Al primer quadrupol se selecciona un únic ió amb determinada relació m/z (ió precursor), es provoca la seva fragmentació en la cel·la de col·lisió, i un únic ió amb una determinada relació m/z (ió producte) se selecciona al tercer quadrupol. A cada combinació d'ió precursor-ió producte concret se'l denomina transició. En la modalitat MRM es poden monitoritzar diverses transicions (Figura 15a). Aquesta manera de treballar s'empra per realitzar anàlisis quantitatives, aportant la màxima sensibilitat metrològica, capacitat de detecció, selectivitat i especificitat en la mesura de la concentració de

components coneguts d'una mostra en diferents fluids biològics.

- Escaneig d'ions productes o *Product ion scan* o *Daughter ion scan*

El primer quadrupol treballa en la modalitat SIM mentre que el tercer ho fa en la modalitat *Scan*. Al primer quadrupol se selecciona un únic ió amb determinada relació m/z (ió precursor), es provoca la seva fragmentació en la cel·la de col·lisió, i es monitoritzen totes les relacions m/z generades (ió productes) al tercer quadrupol (Figura 15b). Aquesta manera de treballar s'empra per l'elucidació estructural de compostos (per exemple, una seqüència de pèptids), per conèixer els ions productes que s'empraran per generar les transicions MRM i per optimitzar el potencial de la cel·la de col·lisió per tal d'obtenir un major senyal per un determinat ió producte en la modalitat de treball MRM.

- Escaneig d'ions precursors o *Parent ion scan* o *Precursor ion scan*

El primer quadrupol treballa en la modalitat *Scan* mentre que el tercer ho fa en la modalitat SIM. Al primer quadrupol es monitoritzen totes les relacions m/z (ions precursors), es provoca la fragmentació de tots ells en la cel·la de col·lisió i se selecciona un únic ió amb determinada relació m/z (ió producte) al tercer quadrupol (Figura 15c). Aquesta manera de treballar s'empra per l'elucidació estructural de compostos (per exemple, una seqüència de pèptids) com a informació complementària o confirmatòria d'un escaneig d'ions productes.

- Escaneig de pèrdua neutral o *Neutral loss scan*

Els dos quadrupols treballen en la modalitat *Scan* d'una forma sincronitzada, de tal manera que

quan el primer quadrupol deixa passar tots els ions precursors, el tercer quadrupol monitoritza si s'ha perdut un fragment o grup funcional neutre concret dels mateixos, o sigui, es duu a terme un escaneig dels compostos que tenen un mateix patró de fragmentació (Figura 15d). Aquesta manera de treballar s'emptra per dur a terme estudis metabòlics.

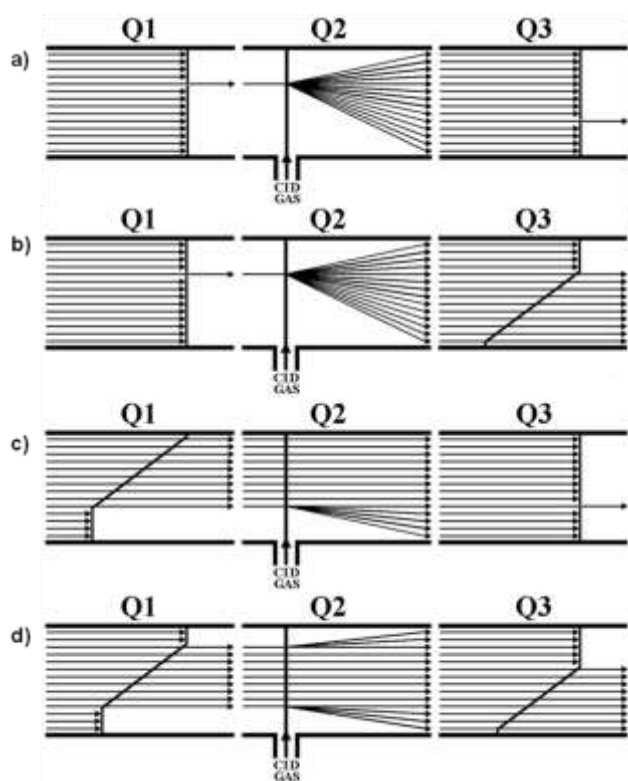


Figura 15. Modalitats de treball de l'espectrometria de masses en tàndem de triple quadrupol: a) monitorització múltiple de reacció o MRM; b) escaneig d'ions producte o Product ion scan; c) escaneig d'ions precursors o Precursor ion scan i d) escaneig de pèrdua neutra o neutral loss scan.

Tradicionalment, els dos analitzadors de masses emprats en l'espectrometria de masses en tàndem han estat els quadrupols. No obstant això, també poden combinar-se altres analitzadors, o utilitzar combinacions híbrides (quadrupol-temps de vol, quadrupol-trampa iònica, trampa iònica-transformada de Fourier-ressonància iònica ciclotrònica, entre altres).

4. APLICACIONS DE L'ESPECTROMETRIA DE MASSES EN LES CIÈNCIES DE LABORATORI CLÍNIC

De tots els principis de mesura existents, l'espectrometria de masses n'és un dels que major aplicabilitat presenta en el camp de les ciències de laboratori degut a que és capaç de proporcionar informació sobre la composició elemental de les mostres, l'estructura química de les molècules inorgàniques, orgàniques i biològiques, la composició qualitativa i quantitativa de barreges complexes d'una mostra, l'estructura i la composició de superfícies sòlides i les relacions isotòpiques dels elements presents en les mostres (1, 5).

4.1 Aplicacions de l'espectrometria de masses mitjançant la utilització d'isòtops estables com a traçadors metabòlics o estàndards interns

Els diferents àtoms d'un mateix element químic, tot i presentar el mateix nombre de protons (nombre atòmic), es poden diferenciar entre sí pel nombre de neutrons que contenen (isòtops). En la naturalesa, per un mateix element químic, existeixen diferents isòtops estables amb distintes abundàncies relatives motiu pel qual, la seva massa atòmica és la mitjana de totes les masses isotòpiques de l'element (Taula 1).

El marcatge de biomolècules amb diferents isòtops estables com el ^2H (deuteri), el ^{13}C , el ^{15}N , el ^{18}O , el ^{36}S , la posterior utilització d'aquestes biomolècules com a traçadors metabòlics o estàndards interns i la seva posterior detecció o quantificació mitjançant espectrometria de masses ha donat lloc a nombroses aplicacions dins de l'àmbit de les ciències de laboratori clínic (1, 5, 9).

Element químic	Massa atòmica mitjana (g/mol)	Massa atòmica isotòpica (g/mol)	Abundància relativa (%)
Hidrogen	1,0079	1,0078	99,985
		2,0140	0,015
Carboni	12,0110	12,0000	98,900
		13,0134	1,100
Nitrogen	14,0066	14,0031	99,640
		15,0001	0,360
Oxigen	15,9993	15,9949	99,760
		16,9991	0,040
		17,9992	0,200
Sofre	32,0646	31,9721	95,000
		32,9715	0,760
		33,9679	4,200
		35,9671	0,020

Taula 1. Principals elements químics, que formen part de molècules biològiques, i les seves masses atòmiques i abundàncies relatives.

4.1.1 Espectrometria de masses de relació isotòpica

L'espectrometria de masses de relació isotòpica o IRMS (acrònim de l'anglès *isotope ratio mass spectrometry*) permet detectar petits increments en la relació isotòpica d'una biomolècula que presenta l'isòtop més abundant i la mateixa biomolècula marcada amb un isòtop estable (traçador).

L'estructura química del traçador és planejada a l'efecte per ser el substrat més adequat al procés biològic que es vulgui estudiar. Per exemple, un substrat marcat amb ^{13}C , administrat per via oral o per infusió endovenosa en unes determinades condicions, és metabolitzat per l'organisme fins a la producció final de $^{13}\text{CO}_2$ el qual serà exhalat amb el total del produït per l'organisme ($^{12}\text{CO}_2$). A uns temps concrets establerts, arran de l'estudi dels processos fisiològics o metabòlics implicats, es recullen mostres d'aire expirat que posteriorment seran processades en un espectròmetre de masses. L'elevació de $^{13}\text{CO}_2$ respecte a $^{12}\text{CO}_2$ serà la conseqüència del trànsit i del metabolisme del procés metabòlic que s'està investigant.

En són un exemple d'aquestes aplicacions, la utilització isòtops en biomolècules com (1, 9):

- H_2^{18}O en l'estudi de l'aigua corporal total,
- $^2\text{H}_2^{18}\text{O}$ en l'estudi de la despesa energètica,
- ^{13}C -glucosa en l'estudi del metabolisme oxidatiu del glúcids,
- Àcid ^{13}C -palmític i àcid ^{13}C -octanoic en l'estudi del metabolisme oxidatiu dels àcids grassos,
- ^{13}C -leucina i ^{13}C -valina en l'estudi del metabolisme oxidatiu dels aminoàcids,
- àcid ^{13}C -cetoisocaproic en l'estudi del metabolisme oxidatiu mitocondrial,
- ^{13}C -eritromicina i ^{13}C -aminopirina en l'estudi de l'activitat del citocrom P450,
- ^{13}C -lactosa en l'estudi del dèficit de lactasa,
- ^{13}C -glucosa en l'estudi de malabsorció,
- ^{13}C -midó en l'estudi del dèficit d'amilasa,
- ^{13}C -trioctanoïna i ^{13}C -triglicèrid mixt en l'estudi del dèficit de lipasa intestinal,
- ^{13}C -octanoat, ^{13}C -acetat i ^{13}C -glicina en l'estudi del buidament gàstric,
- ^{13}C -aminopirina i ^{13}C -galactosa en l'estudi de la massa funcional hepàtica,
- ^{13}C -urea en l'estudi d'infeccions per *Helicobacter pylori*,
- àcid ^{13}C -glicòlic en l'estudi de sobrecreixement bacterià.

4.1.2 Espectrometria de masses de dilució isotòpica

L'espectrometria de masses de dilució isotòpica permet el mesurament de la concentració de multitud de compostos basant-se en la utilització d'un compost isotòpicament enriquit com a estàndard intern.

Tal i com succeeix en els mètodes cromatogràfics (10), les aplicacions quantitatives de l'espectrometria de masses de dilució isotòpica es basen principalment en la comparació dels senyals produïts pels ions d'un component d'una mostra amb els corresponents a uns compostos prèviament seleccionats. En aquest procediment, als materials de calibratge i a la mostra s'afegeix una quantitat exacta d'un compost pur, absent a la mostra, anomenat estàndard intern. Aquest compost pur és el mateix component de la mostra a estudiar però amb una composició elemental formada per un o varis isòtops estables.

Seguidament, s'obtenen els espectres per als diferents calibradors i els de l'estàndard intern i es representen els quocients entre els seus senyals (calibradors/patró intern) enfront de la concentració. Posteriorment, per a una mostra determinada, s'obté el seu senyal que correspon al component en qüestió i del seu estàndard intern, es duu a terme la relació entre aquests senyals i es calcula la seva concentració mitjançant la interpolació de la seva relació de senyals en l'esmentada representació (10).

4.2 Exemples d'aplicacions de l'espectrometria de masses en les ciències de laboratori clínic

Les diferents aplicacions existents per a la cromatografia líquida d'alta eficàcia (10) poden ser adaptades a l'espectrometria de masses simple o en tàndem, a la cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses simple o en tàndem i a la cromatografia líquida d'alta eficàcia acoblada a l'espectrometria de masses simple o en tàndem.

Entre les principals aplicacions específiques de l'espectrometria de masses es poden destacar (10-13):

- Mesurament o examen de propietats biològiques relacionades amb errors congènits del metabolisme d'àcids orgànics:
 - Uri—2-Hidroxioglutarat; c.subst.
 - Uri—2-Oxoglutarat; c.subst.
 - Uri—2-Hidroxiadipat; c.subst.
 - Uri—3-Hidroxioglutarat; c.subst.
 - Uri—3-Hidroxiadipat, c.subst.
 - Uri—3-Hidroxiisovalerat; c.subst.
 - Uri—3-Hidroxiisobacat; c.subst.
 - Uri—3-Hidroxiisopropionat; c.subst.
 - Uri—3-Hidroxiisobutirat; c.subst.
 - Uri—3-Hidroxi-2-metilbutirat; c.subst.
 - Uri—4-Hidroxiisobutirat; c.subst.
 - Uri—3-Metilbutirilglicina; c.subst.
 - Uri—3-Metilcrotonilglicina; c.subst.
 - Uri—Metilglutaconat; c.subst.
 - Uri—3-Metilglutarat; c.subst.
 - Uri—Àcids orgànics; taxon.
 - Uri—Àcid homogentísic; c.subst.
 - Uri—Adipat; c.subst.
 - Uri— α -Cetoadipat; c.subst.
 - Uri— β -Hidroxiisopiruvat; c.subst.
 - Uri—Butirilglicina; c.subst.
 - Uri—Cis-aconitat; c.subst.
 - Uri—Citrat; c.subst.
 - Uri—Etilhidracrilat; c.subst.
 - Uri—Etilmalonat; c.subst.
 - Uri—Fumarat; c.subst.
 - Uri—Glicolat; c.subst.
 - Uri—Glioxilat; c.subst.
 - Uri—Glutarat; c.subst.
 - Uri—Hexanoilglicina; c.subst.
 - Uri—Isobutirilglicina; c.subst.
 - Uri—Isovalerilglicina; c.subst.
 - Uri—Lactat; c.subst.
 - Uri—Malat; c.subst.

- Uri—Mavalonat; c.subst.
- Uri—Metilcitrà; c.subst.
- Uri—Metilmalonat; c.subst.
- Uri—Metilsuccinat; c.subst.
- Uri—N-acetilaspàrtat; c.subst.
- Uri—Oxalat; c.subst.
- Uri—Parahidroxifenilacetat; c.subst.
- Uri—Parahidroxifenilpiruvat; c.subst.
- Uri—Piroglutamat; c.subst.
- Uri—Piruvat; c.subst.
- Uri—Propionilglicina; c.subst.
- Uri—Sebacat; c.subst.
- Uri—Suberat insaturat; c.subst.
- Uri—Suberat; c.subst.
- Uri—Suberglicina; c.subst.
- Uri—Succinat; c.subst.
- Uri—Succinilacetona; c.subst.
- Uri—Tiglicilglicina; c.subst.
- Uri—Uracil; c.subst.
- Mesurament o examen de propietats biològiques relacionades amb errors congènits del metabolisme d'acilcarnitines:
 - Pla—Acilcarnitines; taxon.
 - Pla—C0-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C2-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C3-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C3DC/C4-OH-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C4-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C4DC/C5-OH-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C5-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C5:1-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C5DC-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C6-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C6DC-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C8-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C8:1-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C10-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C10:1-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C10:2-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C12-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C12:1-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C14-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C14-OH-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C14:1-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C14:2-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C16-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C16-OH-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C16:1-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C16:1-OH-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C18-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C18-OH-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C18:1-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C18:1-OH-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—C18:2-Acilcarnitina; c.subst.
 - Pla—Carnitina; c.subst.
- Mesurament o examen de propietats biològiques relacionades amb errors congènits del metabolisme d'àcids grassos:
 - Pla—Àcids grassos; taxon.
 - Pla—Cis-4-decenoic; c.subst.
 - Pla—Cis-5-tetradecenoic; c.subst.
 - Pla—Decanoat; c.subst.
 - Pla—Dodecanoat; c.subst.
 - Pla—Estearat; c.subst.
 - Pla—Linoleat; c.subst.
 - Pla—Miristat; c.subst.
 - Pla—Miristoleat; c.subst.
 - Pla—Octanoat; c.subst.
 - Pla—Oleat; c.subst.
 - Pla—Palmitat; c.subst.
 - Pla—Palmitoleat; c.subst.

- Mesurament o examen de propietats biològiques relacionades amb malalties lisosomals:

- Pla— α -fucosidasa; cont.cat.
- Pla— α -Iduronidasa; cont.cat.
- Pla— α -manosidasa; cont.cat.
- Pla—Amilo-1-6-glucosidasa; cont.cat.
- Pla—Arilsulfatasa B; cont.cat.
- Pla—Arilsulfatasa C; cont.cat.
- Pla—Aspartilglucosaminidasa; cont.cat.
- Pla— β -galactosidasa; cont.cat.
- Pla— β -glucuronidasa; cont.cat.
- Pla— β -hexosaminidasa; cont.cat.
- Pla— β -manosidasa; cont.cat.
- Pla—Heparan-N-sulfatasa; cont.cat.
- Pla—Iduronosulfatasa; cont.cat.
- Pla—N-acetil- α -galactosaminidasa; cont.cat.
- Pla—N-acetilglucosamina-6-sulfat sulfatasa; cont.cat.
- Pla—N-acetil-neuraminidasa; cont.cat.
- Pla—N-acetil-glucosaminidasa; cont.cat.
- Pla—Galactosamina-6-sulfat sulfatasa; cont.cat.
- Pla—Hidrolases lisosòmiques; cont.cat.
- Pla—N-Acetilglucosamina-3-sulfatasa; cont.cat.

- Mesurament o examen de propietats biològiques relacionades amb errors congènits del metabolisme dels aminoàcids:

- Pla—Alanina; c.subst.
- Pla— α -Alanina; c.subst.
- Pla— α -Aminobutirat; c.subst.
- Pla—Aminoàcids; taxon.
- Pla—Arginina; c.subst.
- Pla—Asparagina; c.subst.
- Pla—Aspartat; c.subst.
- Pla— β -Alanina; c.subst.

- Pla— β -Aminoisobutirat; c.subst.
- Pla—Carnosina; c.subst.
- Pla—Cistationina; c.subst.
- Pla—Cistina; c.subst.
- Pla—Citulina; c.subst.
- Pla— δ -Hidroxilisina; c.subst.
- Pla—Etanolamina; c.subst.
- Pla—Fenilalanina; c.subst.
- Pla—Glicina; c.subst.; c.subst.
- Pla—Glutamat; c.subst.
- Pla—Glutamina; c.subst.
- Pla—Hidroxiprolina; c.subst.
- Pla—Histidina; c.subst.
- Pla—Homocistina; c.subst.
- Pla—Isoleucina; c.subst.
- Pla—Leucina; c.subst.
- Pla—Lisina; c.subst.
- Pla—Metilhistidina; c.subst.
- Pla—Metionina; c.subst.
- Pla—Ornitina; c.subst.
- Pla—Prolina; c.subst.
- Pla—Serina; c.subst.
- Pla—Taurina; c.subst.
- Pla—Tirosina; c.subst.
- Pla—Treonina; c.subst.
- Pla—Triptòfan; c.subst.
- Pla—Valina; c.subst.
- Pla— γ -Aminobutirat; c.subst.
- Pla—Hidroxilisina-1; c.subst.

- Mesurament o examen de propietats biològiques relacionades amb desordres metabòlics de glucosaminoglicans:

- Uri—Condroitin-sulfat A; c.arb.
- Uri—Condroitin-sulfat C; c.arb.
- Uri—Dermatan-sulfat; c.arb.
- Uri—Glucosaminoglicans; taxon.
- Uri—Heparan-sulfat; c.arb.

- Uri—Keratan-sulfat; c.arb.
- Mesurament o examen de propietats biològiques relacionades amb desordres metabòlics de la creatina:
 - Pla—Creatina; c.subst.
 - Uri—Creatina; c.subst.
 - Pla—Guadininacetat; c.subst.
 - Uri—Guadininacetat; c.subst.

Cal destacar que, en l'actualitat, l'espectrometria de masses s'està aplicant en l'estudi del projecte *proteoma* el qual pretén identificar i quantificar nous biomarcadors (metabòlits, pèptids o proteïnes modificades) que permetin el diagnòstic, diagnòstic precoç, pronòstic i seguiment de malalties cardiovasculars, infeccioses, nefrològiques, oncològiques, reumatològiques, entre altres. Els mètodes que s'empren en aquest tipus d'estudis són, principalment, les espectrometries de masses MALDI-TOF/TOF (acrònim de l'anglès *matrix-assited laser desorption-ionitation—Time of fly/Time of fly*), MALDI-Q/TOF (acrònim de l'anglès *matrix-assited laser desorption-ionitation—Simple quadrupol/Time of fly*), SELDI-TOF/TOF (acrònim de l'anglès *surface-enhanced laser desorption-ionitation—Time of fly/Time of fly*), SELDI-Q/TOF (acrònim de l'anglès *surface-enhanced laser desorption-ionitation—Simple quadrupol/Time of fly*), ESI-TOF/TOF (acrònim de l'anglès *electrosprai ionization—Time of fly/Time of fly*) i ESI-Q/TOF (acrònim de l'anglès *electrosprai ionization—Simple quadrupol/Time of fly*).

Una de les aplicacions d'aquests estudis de perfils proteics, ja incorporat en els laboratoris clínics, consisteix en la identificació diferents microorganismes (bacteris, fongs i llevats) mitjançant l'espectrometria de masses MALDI-TOF o ESI-TOF (14).

5. BIBLIOGRAFIA

1. De Hoffmann, Stroobant V. Mass spectrometry: principles and applications. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2007.
2. Niessen WMA. Liquid chromatography—mass spectrometry. Boca Ratón: CRC Press·Taylor & Francis Group; 2006.
3. International Union of Pure and Applied Chemistry. Definitions of terms relating to mass spectrometry—IUPAC Recommendations 2013. Pure Appl Chem 2013;85:1515-609.
4. International Union of Pure and Applied Chemistry. Compendium of chemical terminology—the Gold Book. <<http://goldbook.iupac.org/>> (accés: 2013-03-22).
5. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principios de análisis instrumental. Madrid: McGraw-Hill·Interamericana; 2001.
6. Bogusz MJ. Liquid chromatography—mass spectrometry as a routine method in forensic sciences: a proof of maturity. J. Chromatogr B 2000;7483-19.
7. Arpino P, Baldwin MA, McLafferty FW. Liquid chromatography—mass spectrometry II. Continuous monitoring. Biomed Mass Spectrom 1974;1:80-2.
8. Burlingame AL, Boyd RK, Gaskell SJ. Mass spectrometry. Anal Chem 1994;66:634-83.
9. Hernández JM. Espectrometría de masas. Aplicaciones clínicas. Ed Cont Lab Clín 2007;11:19-30.
10. Rigo Bonnin R. La cromatografia com a principi de mesura: classificació, fonaments teòrics i aplicació en les ciències de laboratori clínic. In vitro veritas 2013;14:80-103. (accés: 2013_07_31).
11. Chace DH. Mass spectrometry in the clinical laboratory. Chem Rev 2001;101:445-77.
12. Garg U, Hammett-Stabler CA. Clinical applications of mass spectrometry: methods and protocols. New York: Humana Press; 2010.
13. Van den Ouweland JMW, Kema IP. The role of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. J Chromatogr B 2012;883-884:18-32.

14. Jordana Lluch E, Martró Català E, Ausina Ruiz V.
La espectrometría de masas en el laboratorio de
microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*
2012;30:635-44.