

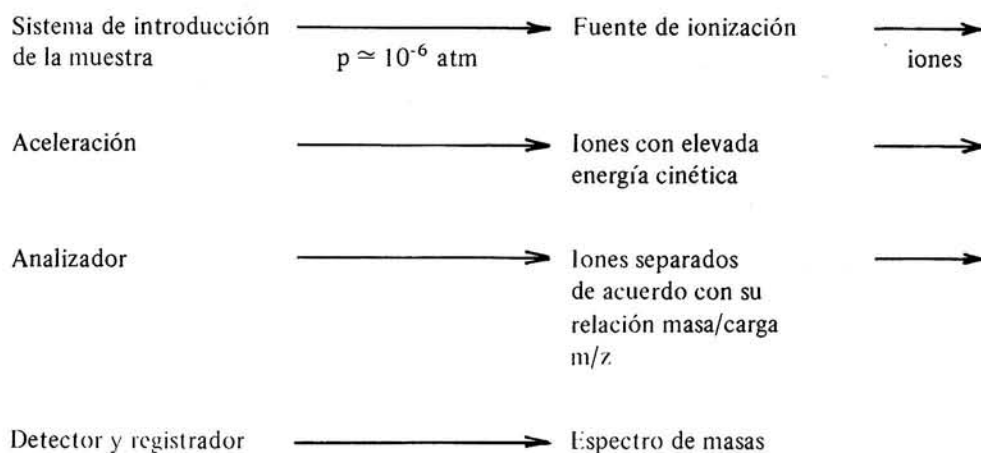
Técnicas

La aplicación de la espectrometría de masas al análisis y caracterización de biomoléculas

GABRIEL PADRÓN

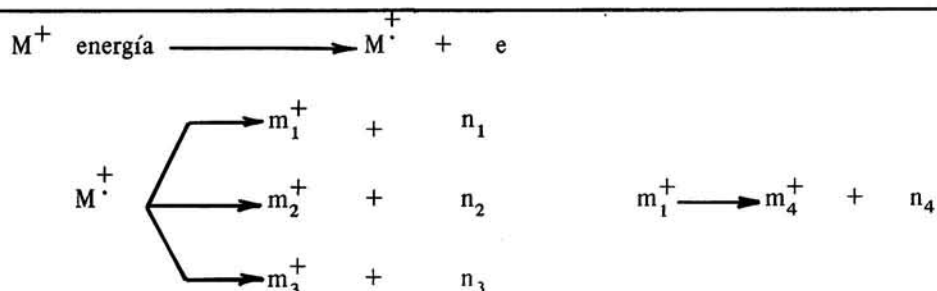
La espectrometría de masas (E.M.) es uno de los métodos de análisis más importantes y generales de la Química. A finales de la década de 1950, se inició la aplicación masiva en el campo de la Química orgánica, pues hasta entonces su utilización se había limitado al análisis de mezclas de hidrocarburos.

El esquema general de un espectrómetro de masas es el siguiente:



La muestra, sólida o líquida, debe ser vaporizada antes de llegar a la fuente de ionización. Puede ser introducida mediante un cromatógrafo gas-líquido (C.G.L.), por lo que podemos separar y analizar los componentes de una mezcla en un tiempo muy breve. Esta combinación CGL-EM es una de las herramientas analíticas más poderosas con que se cuenta en la actualidad.

En la fuente de ionización, las moléculas gaseosas (la presión del sistema es aproximadamente de 10^{-6} atm) se ionizan y se fragmentan. Las distintas fuentes de ionización se diferencian por el tipo de energía que emplea para producir los iones.



Este esquema de reacciones nos permite resumir lo que ocurre en la fuente de ionización de un espectrómetro de masas. La molécula gaseosa es primeramente ionizada y posteriormente se fragmenta a través de un número relativamente grande de reacciones de fragmentación, en cada una de las cuales se produce un ion y un fragmento neutro. La cantidad que se produce de cada ion depende de la probabilidad con que pueda ocurrir cada una de estas reacciones, y esto, a su vez depende de la estabilidad de ambas especies obtenidas en cada reacción, es decir, del ion y del fragmento neutro. Puede establecerse, por tanto, una correlación entre la estructura de la molécula analizada y los iones producidos, lo que constituye, junto a la determinación del peso molecular, la base de la utilización de la espectrometría de masas en el análisis y la caracterización de los compuestos orgánicos.

En la mayoría de los estudios realizados con los compuestos orgánicos se ha empleado la fuente de ionización por impacto electrónico: un filamento de tungsteno o renio emite electrones que son acelerados, adquiriendo una elevada energía cinética (aproximadamente 70 eV). Estos electrones son dirigidos hacia el paso de las moléculas gaseosas de la muestra, produciendo la ionización de la molécula.

Esta fuente de ionización tiene serias limitantes para muchos tipos de compuestos que no pueden ser evaporados, o que son térmicamente inestables, como es el caso de las biomoléculas. Sólo han podido ser estudiados por esta vía los carbohidratos y aminoácidos previamente transformados en derivados más volátiles.

El analizador de un espectrómetro de masas también puede ser de diferentes tipos, pero el más generalizado es el que emplea un campo eléctrico radial y a continuación un sector de campo magnético. El primero funciona como un filtro de energía, de manera de asegurar que el haz de iones (previamente acelerados hasta alcanzar una elevada energía cinética) que llegue al campo magnético sea esencialmente monoenergético. El campo magnético es capaz de separar iones monoenergéticos de acuerdo a su relación masa/carga (m/z). La detección y registro de cada ion producido permite obtener un espectro de masas donde tenemos relacionados el valor de m/z con su intensidad.

En los últimos años se han logrado dos avances importantes que han permitido el aumento progresivo de la aplicación de la espectrometría de masas a las biomoléculas, y en particular a las proteínas y ácidos nucleicos. En primer lugar, el diseño de fuentes de ionización basados en procedimientos de desorción de iones, que no requieren la volatilización de la muestra, y en segundo lugar, el incremento del alcance de masas de los espectrómetros de masas.

De las técnicas de desorción de iones conocidas, la que parece más prometedora es la de ionización por bombardeo con átomos rápidos, originalmente desarrollada por Barber en 1981.

Las características relevantes de esta fuente son las siguientes:

Un gas noble, generalmente argón o xenón es ionizado (por impacto electrónico) y los iones Ar^+ son acelerados hasta alcanzar una energía cinética relativamente elevada. Los iones Ar^+

son descargados haciéndolos pasar por gas argón, intercambiando la carga, y se convierten en un haz de átomos que se mueven a una alta velocidad. Con este haz se bombardea la muestra provocando su ionización.

La muestra se encuentra disuelta (o dispersa) en una matriz de glicerina. Generalmente la glicerina ha sido la matriz empleada por sus buenas propiedades como solvente y su baja tensión de vapor, aunque se han usado otras matrices, por ejemplo, la tioglicerina.

De esta forma se logra una ionización suave que permite obtener iones pseudomoleculares $(M + H)^+$ y $(M - H)^-$ (por captura o pérdida de un protón) y los iones resultantes de las posteriores fragmentaciones. Es posible obtener espectros de iones positivos o negativos, y ambos han sido utilizados indistintamente en los trabajos de aplicación reportados.

Esta técnica de bombardeo por átomos rápidos tiene ventajas evidentes, como es la facilidad de preparación de la muestra (a diferencia de otras técnicas de desorción de iones) y la posibilidad de analizar compuestos polares de peso molecular elevado (varios miles de unidades de masa), como es el caso de polipéptidos y oligonucleótidos.

El otro aspecto que ha tenido un rápido desarrollo en los últimos años es la ampliación del alcance de masas de los equipos comerciales. Hasta hace 3 ó 4 años, el alcance de masas de la mayoría de los equipos era de alrededor de 1 000 unidades de masas, sin embargo, ya existen equipos comerciales que superan en unas diez veces ese valor.

El número de artículos donde se reporta la aplicación de la espectrometría de masas utilizando la ionización por bombardeo de átomos rápidos al estudio de las biomoléculas, ha ido en ascenso ininterrumpido. Hasta el momento existen varios reportes de aplicación en carbohidratos, oligonucleótidos y péptidos, incluyendo estudios de secuenciación. Algunos compuestos estudiados son los siguientes:

Angiotensina II (PM 1046), somatostatina (PM 1638), endorfina (PM 1745), bradikina (PM 1059), insulina bovina (PM 5729), proinsulina humana (PM 9390), deoxioctanucleótido ACTCGATC (PM 2408) y deoxidecanucleótido GAAGATCTTC (PM 3025).

Las perspectivas de aplicación son amplias y aumentarán a medida en que se desarrollen otros métodos. Por ejemplo, los métodos de ionización por desorción de iones presentan problemas de baja relación señal-ruido, lo cual puede ser resuelto usando una combinación de dos espectrómetros de masas en sucesión (EM-EM), donde el primero actúa como un separador y el segundo como un analizador.

Otro sistema de gran perspectiva es la utilización de una combinación de un cromatógrafo líquido y un espectrómetro de masas (CL-EM), donde una parte del solvente de elución es empleado como agente de ionización (ionización química). Este es un método que permite la separación y el análisis de mezclas, de forma similar a la CGL-EM, pero con la ventaja de que puede trabajarse a temperatura ambiente y por tanto ser aplicado a las biomoléculas.

Los siguientes trabajos contienen información más detallada sobre estas técnicas.

REFERENCIAS

- BARBER, M.; R. S. BORDOLI; G. J. ELLIOTT y N. J. HOROCH (1983). *Fast atom bombardment mass spectrometry of human proinsulin*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **110**, 753.
- BUKO, A. M.; L. R. PHILLIPS y B. A. FRASER (1983). *Peptide studies using a fast atom bombardment high field mass spectrometer and data system 2. Characteristics of positive ionization spectra of peptides m/z 858 to m/z 5729*. Biomed. Mass Spectrom **10**, 408.

- CLAYTON, E. y A. J. C. WAKEFIELD (1984). *Fast atom bombardment (F.A.B.) mass spectrometry; mechanism of ionization*. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 969.
- COOKS, R. G.; K. L. BUSCH y G. L. GLISH (1983). *Mass spectrometry analytical capabilities and potentials Science*, **222**, 273.
- GROTJAHN, L.; R. FRANK y H. BLÖCKER (1982). *Ultrafast sequencing of oligodeoxyribonucleotides by FAB-mass spectrometry*. Nucleic Acid Res. **10**, 4671.
- LEHMANN, W. D.; M. KESSLER y W. A. KÖNING (1984). *Investigations on basic aspects of fast atom bombardment mass spectrometry: matrix effects, sample effects, sensitivity and quantification*. Biomed. Mass Spectrom. **11**, 217.
- ROSE, M. E.; M. C. PRESCOTT; A. H. WILBY e I. J. GALPIN (1984). *Analysis of Peptides with unusual structural features by fast atom bombardment mass spectrometry: Protease inhibitors*. Biomed. Mass Spectrom. **11**, 10.
- SCHÄFER, W. (1983). *Fast atom bombardment mass spectrometry. A new technique for peptide sequencing Modern Methods in Protein Chemistry*. Ed. H. Tschesche Walter de Gruyter and Co. Berlín-New York.
- WILLIAMS, D. H.; C. BRADLEY; G. BOJESEN; S. SANTIKARN y L. C. E. TAYLOR (1981). *Fast atom bombardment mass spectrometry: a powerful technique for the study of polar molecules*. J. Am. Chem. Soc. **103**, 5700.