CENTRO DE INVESTIGACION EN QUIMICA APLICADA



Espectrometría de Masas de Compuestos de Baja Volatilidad

CASO DE ESTUDIO

presentado como requisito parcial para obtener el grado de:

ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA APLICADA

MILDRED FLORES GUERRERO

Saltillo Coahuila

Septiembre de 2004

CENTRO DE INVESTIGACION EN QUIMICA APLICADA



HACE CONSTAR QUE EL CASO DE ESTUDIO TITULADO:

Espectroscopía de Masas de Compuestos de Baja Volatilidad

Que presenta:

Mildred Flores Guerrero

Como Requisito Parcial para obtener el Grado de:

ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA APLICADA

Opción : Química Analítica

Ha sido dirigida por:

Dr. Luis Ernesto Elizalde Herrera

Saltillo, Coahuila

Septiembre 2004

CENTRO DE INVESTIGACION EN QUIMICA APLICADA



A TRAVES DEL JURADO EXAMINADOR HACE CONSTAR QUE EL CASO DE ESTUDIO TITULADO:

Espectroscopía de Masas de Compuestos de Baja Volatilidad

Que presenta:

Mildred Flores Guerrero

HA SIDO ACEPTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA APLICADA

Opción : Química, Analítica



Saltillo, Coahuila

Septiembre 2004

INDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Sistema de vacío	3
1.2. Generación de iones	
a) Impacto electrónico	3
b) Ionización química	5
c) Inserción directa y exposición directa	5
1.3. Filtros de masas	5
1.3.1. Filtros de sector magnético	. 5
a) Campo magnético solamente	6
b) Doble enfoque	6
1.3.2. Filtros de cuadrupolo y trampa de iones	
a) Filtros de masa de cuadrupolo	7
b) Filtros de masas de trampa de iones	7
1.3.3. Filtros de tiempo de vuelo	8
1.3.4. Filtros de resonancia de ciclotrón	9
II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	10
2.1. Iones moleculares de muestras no volátiles	10
2.2. GC-MS	11

2.3. Pirolisis	15
2.4. Técnicas de spray	23
2.5. Electrospray	25
2.6. Desorción de superficies	30
2.7. Alta energía de impacto de partícula	31
2.8. Baja energía de impacto de partícula	33
2.9. Impacto de baja energía con superficies líquidas	35
2.10.Flujo FAB	36
2.11.FD y FAB	37
2.12.GDMS	39
2.13.LDMS	40
2.14.MALDI	42
2.14.1. Preparación de la muestra	46
2.14.2. Proceso de ionización	49
2.14.3. Tipos de reacciones secundarias	
a) Transferencia de protones	50
b) Transferencia de cationes	51
c) Transferencia de electrones	51
d) Captura de electrones	52

	2.14.4. Proceso de desorción	53
	2.14.5. Mediciones de peso molecular	56
	2.14.6. Determinación de grupos terminales	62
	2.14.7. Análisis de co-polímeros	65
	2.14.8. Aplicación de la síntesis de productos	69
	2.14.9. Láser MALDI	70
	2.14.10.IR MALDI	71
	2.14.11.Extracción retrasada	72
III.	ESTADO DEL ARTE	74
IV.	CONCLUSIONES	77
v.	REFERENCIAS	81

V. <u>NOMENCLATURA</u>

Abreviatura	Significado
ASMA	Sociedad Americana de espectroscopia de
	masas.
CI	Ionización química
dc	Corriente directa
DCI	Ionización por desorción química
DHB	Ácido 2.4-dihidroxibenzoico
EI	Ionización de electrones
EO	Óxido de etileno
ES	Sistema especialista
ESI	Ionización de electrospray
FAB	Bombardero rápido de átomos
FD	Desorción de campo
FIMS	Ionización de espectroscopia de masas por
	pirolisis de campo
FT-MS	Espectroscopia de masas con transformada
	de Fourier
GC-MS	Cromatografía de gases-mases
GDMS	Espectroscopia de masas de descargas
	luminosas
GPC	Cromatografía de permeación en gel
HCCA	Ácido hidroxicianimico
HPA	Ácido 3-hidroxipicolinico
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
IAA	Ácido indolácetico
IR	Infrarrojo
LC	Cromatografía de líquidos
LCMS	Cromatografía de líqidos-masas
LDMS	Espectroscopia de masas por desorción de

	láser
LDPE	Polietileno de baja densidad
LSIMS	Espectroscopia de masas de iones
	secundarios líquidos.
MALDI	Desorción /ionización de la matriz asistida
	por un láser
MESIMS	Espectroscopia de masas de iones
	secundarios enaltecidos de la matriz
M_N	Peso molecular promedio en número
M_W	Peso molecular promedio en peso
NIST	Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
PBD	Polibutadieno
PD	Polidispersidad
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDS	Decaimiento post-fuente
PEG	Polietilenglicol
PEI	Poliéterimida
PMMA	Polimetilmetacrilato
РО	Óxido de propileno
PPE	Polióxido de fenileno
РРО	Polióxido de propileno
PS	Poliestireno
PTFE	Politetrafluoroetileno
rf	Radio-frecuencia
SIMS	Espectroscopia de masas de iones
	secundarios
SPME	Microextracción en fase sólida
TG-MS	Espectroscopia de masas termogravimetrica
TIC	Cromatografía de iones totales
TOF	Tiempo de vuelo

TOF-MS	Espectroscopia de masas de tiempo de vuelo
u	Unidades de masa
UV	Ultravioleta
XPS	Espectroscopia fotoelectronica de rayos X

I.- INTRODUCCIÓN.

Los materiales poliméricos son un grupo de compuestos que están integrados por moléculas unidas que forman una cadena muy grande de unidades repetitivas compuestas de monómeros que pueden tener diversas propiedades químicas.

Los polímeros pueden contener en su estructura grupos terminales que capturan la cadena en crecimiento, que incluye en su estructura la unidad repetitiva. El polímero es caracterizado por la composición química, número de unidades repetitivas que lo integran, grupos terminales y por la distribución de peso molecular de los oligómeros individuales.

Los materiales poliméricos son preparados de muy diversas formas, en función de los grupos funcionales que integran a la molécula del monómero, y que reaccionan en una secuencia para formar moléculas de mayor peso molecular. Idealmente, las moléculas del monómero reaccionan y se incorporan en una secuencia ordenada integrando un oligómero y terminalmente un polímero hasta que la presencia del monómero se agota y se obtiene una molécula, o grupo de ellas, que contienen el mismo número de monómeros y por consecuencia el mismo peso molecular. Sin embargo, en la práctica no sucede así debido a que durante el proceso de polimerización, los monómeros y el propio sistema de reacción tienen una enorme cantidad de reacciones laterales que provocan el término súbito de la reacción de polimerización, derivando la presencia de oligómeros y polímeros de muy diferente tamaño y peso molecular.

Debido a que la cantidad de unidades repetitivas generalmente no son iguales en un polímero, están definidas por conceptos estadísticos, teniendo como principal parámetro la distribución normal del tamaño de las moléculas, entre más estrecha es está distribución indica un mayor conjunto de moléculas de propiedades similares. Por lo que la determinación del tamaño de las moléculas es importante, este tamaño está íntimamente ligado al peso molecular, por lo que es importante encontrar un método seguro en la determinación del peso molecular.

La técnica de espectroscopia de masas se desarrolló originalmente para establecer el peso de moléculas de bajo peso molecular y es empleada para separar los iones de acuerdo a su relación masa/carga. En la mayoría de los espectrómetros de masas se requiere que los iones se encuentren en fase gaseosa en un vacío lo suficientemente bueno, para evitar colisiones de los iones generados con el gas de fondo que pudieran originar interferencias.

La espectroscopia de masas se ha consolidado como una técnica analítica en la cual se pueden analizar con exactitud las masas moleculares de los compuestos orgánicos. Esta técnica fue desarrollada originalmente por el físico británico J.J.Thompson a principios de 1900. En sus primeros 50 años la mayoría de los físicos del mundo validaron esta técnica para la determinación de nucleótidos de masa conocida mediante la determinación de su relación masa/carga. Durante e inmediatamente después de la segunda guerra mundial, las aplicaciones analíticas y las mediciones físicas fundamentales sobre las moléculas empezaron a sobresalir. Los primeros trabajos requerían de un haz de luz de iones atómicos muy intenso. El hecho de que la mayoría de los elementos de interés fueran disponibles naturalmente como componentes de moléculas o como sólidos cristalinos, fué una limitante que debía ser superada por la selección de un tipo de energía apropiada y que fuera capaz de producir iones como descargas gaseosas, arcos y chispa. Durante la segunda mitad del siglo hubo un cambio relativamente continuo en las aplicaciones, involucrando moléculas de gran complejidad, y cerca de la década pasada empezaron las aplicaciones biológicas.

Dentro de la espectroscopia de masas, existen pocas excepciones, en donde, en la forma de ionización como flama y plasma, las muestras a analizar no están cargadas y están presentes en la fase condensada o como gases a presión atmosférica o a presiones mayores. El reto en seleccionar un método de ionización para espectroscopia de masas, es el seleccionar una técnica que conserve las propiedades de la muestra que se va a analizar, mientras que al mismo tiempo la convierta en iones, los cuales puedan ser analizados por espectroscopia de masas.

La espectroscopia de masas de polímeros y las superficies poliméricas representan un gran campo de investigaciones activas. Existe muchas técnicas experimentales diferentes para probar polímeros y superficies poliméricas, así como también numerosas composiciones de polímeros y de superficies que invitan a un estudio muy cuidadoso.

Como se ha mencionado anteriormente, la espectroscopia de masas requiere de la formación de iones en fase gaseosa para un análisis exitoso, mientras que los polímeros están compuestos de moléculas grandes y enredadas, las cuales no son fácilmente convertidas a especies en fase gaseosa. A pesar de la incompatibilidad inherente, los investigadores de espectroscopia de masas han usado una gran creatividad para desarrollar ingeniosos métodos en el uso de esta técnica para la investigación de diferentes aspectos de los polímeros y de las superficies químicas.

A continuación se describe en forma general como está integrado un espectrómetro de masas en el cual no se tiene complicación en la ionización del compuesto a analizar:

1.1. Sistema de Vacío.

La instrumentación de espectroscopia de masas implica el tener un sistema de bombas de vacío que garantizen un nivel de vacío por debajo de los 30 mTorr. Este sistema puede incluir bombas de vacío basadas en la difusión a través de membranas, bombas turbomoleculares o de difusión de aceite.

Dependiendo de la forma de generación y de separación de iones es el tipo de bomba que se emplea. En los sistemas de masas en donde se emplean métodos simples de ionización las bombas turbomoleculares son las mayormente utilizadas.

1.2. Generación de iones.

a) Impacto electrónico

Siguiendo con la descripción de la instrumentación, la generación de iones es uno de lo componentes esenciales del equipo, para moléculas orgánicas comunes el método de ionización mayormente utilizado es la ionización química por impacto electrónico, este tipo de método emplea una cámara de ionización en donde el compuesto se introduce ya sea por

3

cromatografía de gases masas (en donde la muestra ya se encuentra en forma gaseosa) o por inserción directa.

La cámara y el concepto de ionización por impacto electrónico es muy simple, en la figura # 1 se presenta un esquema en el cual se puede observar que la muestra llega a una cámara que contiene un filamento por el cual circula una corriente de electrones que tienen 70 eV de energía, al momento de que la muestra alcanza el filamento, la molécula se descompone y se generan iones positivos, negativos y moléculas neutras, junto al filamento se encuentra una placa cargada positivamente sobre la cual los iones negativos transfieren un par electrónico y son deshechados por el sistema de vacío, al igual que las moléculas neutras. Los iones negativos, por otro lado, serán expulsados del sistema de ionización con una energía cinética que es función de la masas del ión y del voltaje de la placa (repeledor).



Figura # 1 Esquema de cómo una muestra llega a una cámara que contiene un filamento por el cual circula una corriente de electrones que tiene 70 eV de energía.

Con el fín de "colimar" los iones que emergen de la cámara de ionización, se colocan una serie de lentes magnéticos que orientan los iones hacia la entrada del sistema de separación de iones o filtro de masas.

b) Ionización química:

Este tipo de ionización es conocido como "ionización suave", debido a que la ionización de la molécula se da por una transferencia de un radical o ión que proviene de la ionización de un gas que es fácilmente fraccionado en una cámara de ionización de impacto electrónico.

c) Inserción Directa y Exposición Directa.

Propiamente estos dispositivos no son en sí un método de ionización, sino una forma de introducir un compuesto térmicamente inestable o de baja volatilidad a la cámara de ionización. En la inserción directa, unos cuantos miligramos de muestra son depositados en un porta muestras en la punta de una probeta, que es introducida en la cámara de ionización, siguiendo un procedimiento para evitar el contacto de la cámara de ionización con la presión ambiental. Seguido, en un tiempo muy corto (4 minutos), se calienta la probeta hasta 450°C y el compuesto sale del porta muestra y se debe pasar por el filamento localizado en la cámara de ionización, siguiendo el proceso normal de ionización de un compuesto químico.

El dispositivo de exposición directa mantiene el mismo concepto de la inserción directa. Aquí la muestra es depositada en un filamento que calentará la muestra con una velocidad de 1000°C/s, provocando con esta temperatura y en una cámara de ionización que se encuentra por debajo de los 30 mTorr que la muestra se volatice y logre alcanzar el filamento en donde generará los iones necesarios para un correcto análisis de masas.

1.3. Filtros de Masas.

El has de iones generados en la fuente de iones, requiere separarse por medio de un sistema que garantice un dato exacto de su masa, para ello se han desarrollado diversos filtros de masas que en función del tipo de fenómeno en el cual se basa, pueden ser catalogados de la siguiente forma:

1.3.1 Filtros de Sector magnético.

a) Campo magnético solamente (única resolución)

En el espectrómetro de masas de deflección del campo magnético, los iones formados en la fuente son deflectados en una sección curveada, por un campo magnético y enfocados dentro de un detector. La separación de las masas depende de la fuerza del sector magnético, del radio de la curvatura de la sección, y de la magnitud de la aceleración del voltaje.

b) Doble enfoque (electrostatico y campo magnético, alta resolución)

La introducción de un campo electrostático después (ó antes) permite al campo magnético una alta resolución, por esto es que la masa de una partícula puede ser obtenida a 4 lugares decimales. La figura # 2 muestra un instrumento de doble enfoque. La sección del ión positivo es curveada otra vez por el campo magnético aplicado perpendicularmente a la sección de vuelo de los iones. El doble enfoque proporciona una resolución en el orden de 40,000.



Figura# 2. Esquema de un espectrómetro de masas de doble enfoque

1.3.2. Filtros de Cuadrupolo y Trampa de Iones.

a) Filtro de masa de caudrupolo

-

Este filtro de masas emplea cuatro barras acarreadoras de voltaje (el cuadrupolo) (Figura 3). Los iones entran por uno de los extremos y viajan con una velocidad constante en dirección paralela a los polos (dirección z), pero adquieren oscilaciones complejas en dirección "x" y "y" por aplicación de una corriente de voltaje directo y un voltaje de radio frecuencia a los polos. Hay una "oscilación estable" que permite a un ión particular pasar de un extremo del cuadrupolo al otro sin golpear los polos; esta oscilación es dependiente de la relación m/z de un ión. Por lo tanto, los iones de un solo valor de m/z podrán atravesar la longitud entera del filtro a un conjunto de condiciones dadas. Todos los otros iones pueden tener oscilaciones inestables y pueden golpear los polos y perderse. El barrido de masa es llevado a cabo variando cada uno de los rf y las frecuencias de corriente directa (dc) mientras se mantienen constantes los radios.



Figura # 3. Esquema de un filtro de masas de cuadrupolo.

b) Filtro de trampa de iones

En la configuración de trampa de iones, la ionización y el análisis de masa ocurren en el mismo lugar. Los electrones emitidos por el filamento ionizan las moléculas de la muestra en

la trampa; estos iones pueden ser barridos sobre el rango de masa de 20-650 en el período de un décimo a pocos segundos.

Un electrodo es un pieza en forma de dona horizontalmente rodeando la cámara, y los otros dos son capas hemisféricas en el tope y en el suelo de la cámara (Figura 4). La trampa de iones es muy usada como el componente MS de la unidad de la banca de GC-MS; esto es simple, compacto, rugoso y fácil de usar, pero actualmente tiene un limite superior a 650 daltons en el rango de masa. Este es fácilmente adaptado a ionización química, pero no tolera muestras grandes.



Figura # 4. Esquema de un espectrómetro de masas de trampa de iones.

1.3.3. Filtros de Tiempo de Vuelo.

En los espectrómetros de masas de tiempo de vuelo, todas las partículas cargadas individualmente sujetadas a un diferencial de potencial V obtienen la misma energía en electrón volts (eV). Estas partículas livianas tienen el tiempo de vuelo más corto a distancias dadas. Las partículas aceleradas están pasando dentro de una región de campo libre donde son separadas en un tiempo por sus valores de m/z y son colectadas. Ya que los tiempos de entrada entre los iones sucesivos pueden ser menores que 10⁻⁷ seg. Los equipos de espectrometría de masas de tiempo de vuelo requieren de electrónicas lo suficientemente rápidas para adecuar la resolución. Los dispositivos de tiempo de vuelo son muy usados con métodos de ionización sofisticados (FAB,etc.) para medidas de masa altas.

1.3.4. Filtros de Resonancia de Ciclotrón.

Los iones excitados a bajas energías cinéticas perpendicularmente a campos magnéticos seguirán orbitales de ciclotron circulares (Marshall y Verdun 1990 Figura 5). Un conjunto de iones del mismo valor de m/z inducirán a una corriente de onda indefinida en platos paralelos justo afuera y a los lados opuestos de la orbita del ión; la frecuencia de onda indefinida se determina solo por el valor de m/z, la fuerza del campo magnético, y la amplitud se determina por el número de cargas en el conjunto de iones. Orbitando los conjuntos de iones de muchos valores de m/z se producen muchas frecuencias, con la transformada de Fourier de estas señales sobrelapadas rindiendo el espectro de masa de m/z y los valores de intensidad . Las ventajas del FT/ICR incluyen mediciones no destructivas de un amplio rango de valores de m/z, usualmente con un poder de resolución alto (mayor 10⁶ a m/z 100) y capacidades para reacciones de moléculas–ión.



Figura # 5. Espectrómetro de masas de transformada de Fourier.

II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

Como se ha mencionado anteriormente, una de las principales limitantes de la espectroscopia de masas es la introducción de la muestra en forma gaseosa a la cámara de ionización, podemos decir que los compuestos no volátiles ó de baja volatilidad presentarán problemas importantes para la determinación de su peso molecular. Dentro del tipo de muestras que presentan baja volatilidad se encuentran los compuestos organometálicos, y macromoléculas, ya sea de origen sintético o biológico.

Así, en los equipos de espectroscopia de masas la instrumentación requerida para poder analizar compuestos no volátiles o de baja volatilidad difieren de los equipos convencionales, en la forma de ionización, ya que los sistemas de separación y detección de iones son similares.

En equipos donde se analizan compuestos no volátiles o de baja volatilidad, debido a que la forma de ionización que se emplea no logra degradar la molécula en iones-fragmento, sino solo en el mejor de los casos en iones moleculares (ionizaciones más suaves que las de impacto electrónico), solo se obtendrá una información muy limitada del peso molecular. Con el fin de obtener una mayor información se necesita emplear equipos de alta resolución de masas, en donde se obtiene la relación masa/carga con valores significativos hasta de 10⁻⁴ daltons, proveyendo la posibilidad de obtener el peso molecular exacto y de ahí inferir una fórmula molecular con gran certeza.

Los métodos de ionización que se encuentran disponibles actualmente para espectroscopia de masas a continuación se resumen brevemente:

2.1. Iones moleculares de muestras no volátiles

A mediados de los años 70's, la espectrometría de masas con ionización de electrones (EI), y ionización química (CI) fue muy reconocida como una poderosa herramienta de análisis, particularmente en combinación con separaciones en línea de muestras por cromatografía de

gases y con la interfase a sistemas de computo para adquirir y procesar los datos. Las aplicaciones fueron limitadas a muestras relativamente volátiles, y a pesar de algunos éxitos con derivatizaciones químicas para incrementar volatilidad y la introducción de técnicas directas para minimizar la pirolisis, se entendió que la espectrometría de masas tuvo muy poco uso en biología. Aún para muestras biológicas pequeñas no volátiles, como el ácido amino arginina, fue casi imposible producir intensidades detectables de iones moleculares. Excepto para péptidos pequeños que contenían residuos volátiles, los polímeros biológicos quedaron fuera de esta cuestión. Esto nos da a entender que la espectroscopia de masas fue adquiriendo madurez, y mientras las aplicaciones de GC-MS se fueron expandiendo rápidamente, muchos creyeron que el exitoso trabajo de descubrir la espectrometría de masas analítica había terminado. Después Macfalran y sus colaboradores^[1] hicieron el asombroso descubrimiento de que los iones moleculares íntegros de la cisteina y la arginina, podían ser desorbidos a partir de placas delgadas de estos compuestos, los cuales habían sido excitados por altas energías de fragmentos de fisión a partir de ²⁵²Cf radioactivo. Esto fue seguido por la detección de iones moleculares de moléculas complejas como tetradotoxina, péptidos con pesos moleculares excedentes de 3000^[2] y oligonucleotidos protegidos con una relación m/z por encima de 12,500^[3]. Estas observaciones le dieron fuerza a la espectrometría de masa para aplicaciones biológicas, y muchas otras técnicas fueron descubiertas rápidamente dentro de las cuales podemos mencionar las siguientes:

2.2. GC-MS

La tradicional cromatografía de gases-espectroscopia de masas (GC-MS) con ionización de electrones (EI) o ionización química (CI), todavía es usada para establecer la estructura química de los polímeros. GC-MS es una técnica valiosa para identificar y caracterizar pequeños componentes volátiles de materiales poliméricos, monómeros residuales, y contaminantes no deseados. GC-MS es un analizador bidimensional que combina el poder de la cromatografía de gases y la espectroscopia de masas.

GC-MS puede resolver y caracterizar completamente un gran número de compuestos volátiles. La limitación de la técnica es que para que una muestra pueda ser analizada debe ser lo suficientemente volátil para eluir del cromatógrafo.

En los análisis de polímeros, GC-MS ha sido muy usado para identificar y caracterizar compuestos volátiles y contaminantes ^[4]. Un ejemplo de estas aplicaciones es la identificación de problemas de olor en productos comerciales.

Maeno y sus colaboradores usaron un puerto de muestreo de gases ambientales para GC-MS con el fin de caracterizar un problema de olor en un polímero superabsorbente ^[5,6] basado en poliacrilato. En sus experimentos, Maeno y sus colaboradores descubrieron que los compuestos con una estructura vinil-cetona causaba los problemas del olor y se identificó gracias a su espectro de masas a la isobutil vinil cetona como la causante del problema de olor.

También se emplea GC-MS para caracterizar materiales oligomericos de muy bajo peso molecular ^[7]. Estos oligoméros no son eficientemente cationizados por un metal y no son muy bien analizados por algunas de las otras técnicas de espectroscopia de masas, como:

- a) desorción de la matriz asistida por láser (MALDI)
- b) ESI
- c) bombardeo rápido de átomos (FAB)
- d) espectroscopia de masas de iones secundarios (SIMS).

Debido a que su volatilidad es adecuada se puede analizar oligómeros y caracterizarlos completamente por GC-MS. Así, el surfactante etoxilato Suffynol (2, 4, 7, 9-tetrametil-5-decin-4, 7-dio) nombrado S420, se analizó por medio de GC-MS, en la figura 6 se muestra el cromatograma del total de iones (TIC) obtenido en una cámara de ionización por impacto electrónico (EI) de S420.



Figura # 6. GC-MS EI TIC de S420.

Cada uno de los picos intensos es asignado como un oligómero individual del surfactante S420. La estructura fina observada para los picos agrupados más grande es asignada como la resolución de los isómeros de cadena larga del etoxilato. Debido a que los surfactantes Surfynol son dioles, cada alcohol puede ser etoxilado. De la distribución de los picos de los oligomeros podemos calcular los pesos moleculares promedio de $M_N = 281$ u y $M_W = 292$ u con PD = 1.04. Además de la información de distribución de peso molecular, también se puede obtener la información de estructuras químicas de un espectro de masas individual EI.

GC-MS también puede ser usada para caracterizar la degradación de los polímeros, ya que los productos generados tendrán volatilidades más altas al ser degradados de materiales poliméricos originales e incluyen fotolisis y termoquimiolisis^[8,9]. Ritcher y sus colaboradores usaron GC-MS y técnicas de cromatografía de líquidos (LC)-MS para caracterizar la fotodegradación de poli(2,6-dimetil-1,4-fenilen-oxido) (PPE). Entendiendo que el proceso de fotodegradación es importante para probar la estabilidad en la luz de PPE. La fotodegradación fue realizada usando la radiación de una lámpara de arco de Hg/Xe. La figura 7 muestra un cromatograma TIC adquirido por impacto electrónico EI de PPE fotodegradado.



Figura # 7. GC-MS EI TIC de productos de degradación de PPE sólido.

El cromatograma del producto de degradación muestra 19 picos primarios, que fueron asignados con la ayuda de los datos de fragmentación de Wiley y una serie de estándares de bajo peso molecular. Los productos de fotodegradación pueden ser identificados como conjuntos de series homologas y son característicos de la unidad repetitiva de un polímero de PPE. Los autores proponen que el proceso primario involucra el desdoblamiento del grupo hidroxilo terminal.

GC-MS también puede ser combinada con microextracción de fase sólida (SPME) para caracterizar la degradación producida en los polímeros ^[10]. Hakkarainen y su colaboradores demostraron que SPME seguida por GC-MS puede ser más efectiva que headspadce GC-MS para identificar productos de degradación de películas de polietileno de baja densidad (LDPE).

Las películas de LDPE fueron tratadas con radiación ultravioleta (UV) por 100 horas seguidas de envejecimiento térmico a 80 °C por 5 semanas. La SPME fue realizada con fibras basadas en silicón cubiertas con polidimetisiloxano (PDMS) y con carbowax polar (divinilbenceno). La figura 8 muestra tres TIC GC-MS de:

- a) SPME usando fibras cubiertas por PDMS,
- b) SPME usando fibras cubiertas por carbowax,
- c) Headspace GC-MS.



Figura # 8. GC-MS EI TIC de productos de degradación UV de películas de LDPE

Se detectaron algunas diferencias en las especies de degradación, con estos diferentes análisis. En estos espectros se encuentran principalmente cetonas, ácidos carboxílicos, ceto-ácidos, y furanonas. Claramente, ambos experimentos SPME identifican muchos más productos de degradación que el headspace GC-MS. Para evaluar la estabilidad térmica relativa de diferentes películas de LDPE Hakkarainen y sus colaboradores usaron los datos del GC-MS.

2.3. Pirolisis

La espectroscopia de masas de pirolisis es una técnica que emplea calor para producir iones volátiles para análisis por espectroscopia de masas. El calor necesario para producir fragmentos útiles depende de la estabilidad térmica del polímero, pero generalmente va de aproximadamente 250 a 1000 °C. Casi siempre este calentamiento daña al polímero y solo se pueden analizar fragmentos del polímero de masa relativamente baja. Estos fragmentos con frecuencia contienen la información suficientes para identificar la química original del polímero, pero se pierde la información de peso molecular promedio. La tabla 1 muestra algunos productos de degradación de polímeros comunes observados por pirolisis de

espectroscopia de masas ^[11]. Este es un método relativamente sencillo para establecer la estructura química de un material polimérico desconocido.

Tabla # 1. Productos de degradación encontrados en estudios de polímeros por pirolisis.



El calentamiento por pirolisis puede tomar lugar directamente en un espectrómetro de masas donde el pirolizado es ionizado por EI, CI, ó ionización directa del láser. El calentamiento puede ser separado del espectrómetro de masas, y se pueden aplicar otros experimentos de espectroscopia de masas a los pirolizado, como GC-MS, ESI o MALDI.

El proceso de pirolisis también puede ser caracterizado por métodos de espectroscopia de masas termogravimetrica (TG-MS) o por una combinación de TG-MS y GC-MS^[12]. La ventaja de la espectroscopia de masas de pirolisis es que son experimentos relativamente simples y que los rendimientos son medidos directamente de la masa del polímero. En algunos casos se pueden conseguir resultados cuantitativos^[13-14].

Los experimentos directos de espectroscopia de masas de pirolisis pueden usarse para establecer la estructura química del polímero y para investigar las vías de degradación química. Un ejemplo de este trabajo es la investigación de polieterimida (PEI) realizada por

Carroccio y sus colaboradores ^[15]. En estos experimentos, el PEI es calentado gradualmente, de 50 a 700 °C a 10 °C/min. Los pirolizados son ionizados por EI. La figura 9 muestra ejemplos de los espectros de masas que se obtuvieron.



Figura # 9. Espectro de masas EI de productos pirolisados desarrollados de una muestra de PEI purificada a (a) 520 y (b) 620°C.

Se identificaron aproximadamente 57 diferentes iones en el pirolizado. La información del espectro de masas se combina con la información de temperatura de pirolisis para crear perfiles térmicos. La figura 10 muestra una serie de perfiles térmicos para PEI crudo y purificado para algunos de los iones más importantes observados en el espectro de masas. Las asignaciones químicas y los perfiles térmicos de los iones dan información importante sobre la estructura y el desarrollo del mecanismo involucrado en la degradación térmica del PEI.



Figura # 10. TIC y los perfiles de temperatura de los iones detectados a 368, 387, 592 y 594 u observados en el espectro de masas de pirolisis directa del crudo (-) y purificado (....) de muestras de PEI.

Otro ejemplo de aplicación es la pirolisis directa seguido de espectroscopia de masas en la caracterizarción de co-polímeros en bloque y al azar de estireno-butadieno. Estos experimentos muestran que en el co-polímero en bloque, cada bloque es pirolizado muy similarmente al correspondiente homopolímero. El caucho al azar de estireno-butadieno, sin embargo, produce datos de pirolisis que muestran una forma parecida entre los dos homopolímeros.

La espectroscopia de masas por ionización de campo (FIMS) puede ser usada como una técnica directa para obtener datos de masa analizada en productos de pirolisis de masas más altas. Un ejemplo de esta técnica es en la caracterización de dienos de caucho por medio de pirolisis FIMS de polibutadieno a 300-325 °C. En la figura 11 se muestra un ejemplo de un espectro de masas.



Figura # 11. Ionización de espectroscopia de masas por pirolisis de campo (FIMS) de PBD.

Los datos de pirolisis FIMS proporcionan información acerca del mecanismos de pirolisis a baja temperatura del caucho. Los datos pueden ser interpretados en términos del mecanismo de degradación de radicales libres.

El descubrimiento de técnicas de fotoionización láser directa para espectroscopia de masas de pirolisis proporciona la ventaja de una técnica de ionización suave. Zoller y su colaboradores desarrollaron métodos de espectroscopia de masas de fotoionización-pirolisis para identificar y cuantificar materiales poliméricos de acrilonitrilo-butadieno ^[16-17]. En estos experimentos, los pirolizados fueron formados en la fuente del reflector de un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOFMS) y los iones fueron creados por fotoionización con láser ultravioleta a vacío con una radiación 118.2 nm. El láser UV es creado por una frecuencia triplicada a 355 nm en tercer armónico de un láser Nd:YAG. La figura 12 muestra un espectro de masas de fotoionización-pirolisis de polietileno de alta y baja densidad producidos por esta técnica.



Figura # 12. Espectro de masas de fotoionización-pirolisis de polietileno de (a) baja y (b) alta densidad.

El espectro de masas es claramente diferente, y las diferencias pueden estar relacionadas al grado de derivación en la muestra. Empleando análisis lineal discriminatorio, las diferentes muestras de poliolefinas son clasificadas correctamente.

Aunque la técnica de espectroscopia de masas acoplada directamente a un equipo de pirólisis puede ser una herramienta muy poderosa para caracterizar materiales poliméricos, el espectro de masas puede ser complejo y difícil de interpretar debido a la enorme cantidad de compuestos que se generan, sin embargo, el uso de un modelo de computadora y de cromatografía previa a la espectroscopia de masas puede simplificar el proceso de interpretación. Georgakopoulos y sus colaboradores desarrollaron un sistema especialista (ES) para ayudar en la interpretación de espectros de masas de pirolisis directa. El sistema especialista contiene espectros de referencia de una variedad de polímeros de condensación, incluyendo poliamidas, policarbonatos, polieteres, poliesteres, poliureas, poliuretanos, poliimidas, polisulfidas, polisulfonas, bases polischiff, polisiloxanos y polifosfogenos. El sistema también contiene datos que fueron adquiridos usando EI, CI y ionización por desorción química (DCI). Con la ayuda de este programa se obtiene un buen resultado cualitativo en la determinación de la unidad repetitiva.

El equipo de pirolisis también pueden estar acoplado a un cromatógrafo de gasesespectrómetro de masas, por ejemplo en los casos en que los experimentos no pueden ser realizados con ionización directa dentro del espectrómetro de masas, se emplea GC para simplificar el espectro de masas individual. Un ejemplo de este arreglo instrumental es el análisis de polietileno. En la figura 13 se muestra un cromatograma de elusión de pirolisis GC-MS, también llamados pirogramas.



Figura # 13. Cromatogramas de pirolisis GC-MS de (a) referencia de PE pirolizado a 750°C y (b) muestra de una capa de comida limepia (película de polietileno)

En este caso, el pirolizado fue separado vía GC antes del análisis MS. La adición de la separación de GC puede ser muy útil para separar los fragmentos EI del espectro de masas^[18]. Los patrones individuales de fragmentación iónica pueden ser usados para asignar correctamente la estructura del pirolizado. En la figura 13 se pueden ver claramente los picos iónicos asignados como los diferentes segmentos de cadena larga del polietileno. Estos segmentos de hidrocarburos muestran la estructura química del polietileno, pero el peso molecular promedio de las muestras originales del polietileno se ha perdido.

La espectroscopia de masas de pirolizados también puede ser usada para monitorear la reacción de polimerización de un polímero térmicamente crudo. Galipo y sus colaboradores fueron capaces de seguir el progreso de la polimerización de una poliimida (Ciba-Geigy Matrimid 5292) identificando pirolizados característicos de los reactivos y los productos.

Controlando el calor suministrado para un experimento de espectroscopia de masas de pirolizados se pueden crear fragmentos de mayor masa. Estos pirolizados de mayor masa después pueden ser analizados por técnicas como MALDI o ESI.

Uno de los polímeros de los que se obtiene una gran cantidad de compuestos en el pirolizado son los poliuretanos. Lattimer y sus colaborados emplearon pirolisis de baja temperatura en un rango de 250-325 °C, seguido por MALDI para estudiar materiales de poliuretano ^[19]. El uso de MALDI para analizar los productos de pirolisis de baja temperatura permite la caracterización de pirolizados de elevada masa, mejor que el uso de pirolisis directa o pirolisis GC-MS. La figura 14 muestra un espectro de masas MALDI de poliuretano pirolizado a 300 °C por 30 minutos.



Figura # 14. Espectro de masas MALDI de poliuretano pirolizado por 30 min a 300°C.

En esta figura Lattimer y sus colaboradores identificaron 5 diferentes series oligómericas que se asignaron como un diol lineal; un poliéster ciclico; poliésteres terminales insaturados y poliésteres cíclicos, derivados de la deshidratación. Los datos de pirolisis MALDI indican que la degradación del poliuretano sigue dos pasos; disociación del enlace uretano y el intercambio de esteres.

Barton y sus colaboradores emplearon pirolisis ESI y MALDI para caracterizar las formas de degradación del polióxido de propileno (PPO)^[20]. La figura 15 muestra un espectro de masas de una pirolisis ESI para una muestra de PPO lineal con un peso molecular de 2000 u.



Figura # 15. Espectro de masas ESI de PPO pirolizado.

Los autores observaron e identificaron algunas series diferentes en el espectro de masas. Estos resultados sugieren que los enlaces C-C y C-O contiguos al radical alcoxi son formas claves de degradación para el PPO. Además, los autores señalan que los datos de pirolisis-ESI juegan el rol principal para los radicales alcoxi en la degradación.

2.4. Técnicas de Spray (termospray).

Con el fin de resolver el problema de la ionización y vaporización de moléculas no volátiles el Profesor Leonard Loeb en el año de 1958 estudió el proceso de electrificación estática de partículas no volátiles. Este estudio había sido anteriormente realizado por Chapman desde 1938. El midió la movilidad de los iones producidos a presión atmosférica evaporando gotas de líquidos cargados, las cuales fueron coherentes con los iones moleculares en la fase gaseosa, aunque esto también puede ser explicado como unas gotas relativamente pequeñas altamente cargadas, esto hasta entonces era un dato inusual. Después en la década de los 60's y 70's, Dole y sus colaboradores desarrollaron un aparto de electrospray enfocado a producir iones moleculares a partir de polímeros no volátiles. Las soluciones en spray que contenían poliestireno de alto peso molecular, produjeron una movilidad del espectro, la cual fue

coherente con los iones moleculares de estas moléculas, pero los intentos para observar iones en un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo, no fueron exitosos. Iribarne y Thompson ^[21] repitieron las pruebas realizadas por Chapman, empleando un aparato de más alta resolución, concluyendo que la desorción de iones moleculares pequeños en realidad había ocurrido. Enseguida ellos demostraron que los iones moleculares de una gran variedad de solutos pueden ser producidas por electrificación spray, y que estas especies pueden ser detectadas y analizadas por espectroscopia de masas.

Durante los últimos años de 1980 y principios de 1990, basándose en estas observaciones se desarrollaron equipos comerciales de masas para compuestos de baja volatilidad, que se denominó interfase "termospray", ya que era una unión entre la cromatografía de líquidos y espectroscopía de masas. Los compuestos no volátiles eran eluidos por HPLC e introducidos en una cámara que estaba a una temperatura alta con el fin de eliminar el solvente. Los iones eran producidos en el proceso "spray", cuando las moléculas pasaban a través de un filamento caliente, que normalmente es usado como fuente de ionización inicial. Este método que emplea una vaporización térmica directa seguida de una ionización spray mostró fallas ya que el haz del ión mostraba iones adicionales de los que se podía inferir la formación de aductos con el solvente, en donde el ión molecular contenía una, dos y hasta tres moléculas de solvente.

Fue entonces que se llegó a la conclusión de que los iones moleculares eran producidos por la técnica de ionización "spray" a partir de moléculas en forma muy similar al método de ionización química normal con las moléculas del solvente, por lo que con este tipo de espectrómetro de masas se generaban más problemas que soluciones, por lo que los equipos se dejaron de producir de forma comercial a finales de los años 90.

Siguiendo estas primeras observaciones, Fenn y sus colaboradores aplicaron sus conocimientos en un haz molecular supersonico para desarrollar un nuevo camino, similar superficialmente a lo primeramente por Dole, pero con resultados espectacularmente diferentes.

24

2.5. Electrospray

El trabajo por Fenn y sus colaboradores en desarrollar la técnica de ionización electrospray fue ignorada por mucho tiempo por la comunidad de espectroscopía de masas, hasta que tuvieron una pequeña audiencia de la ASMS en 1988, donde ellos presentaron sus primeros resultados en trabajos realizados sobre proteínas^{[22].} Una pequeña muestra de los primeros resultados se muestran en la figura 16.



Figura # 16. Ejemplos de los primeros espectros de electrospray de proteínas.

El hecho de que estos iones moleculares de proteínas altamente cargadas, fueran tan grandes, tendiendo un peso molecular de aproximadamente 40,000 y que pudieran ser observados sin evidencia de fragmentación, fue verdaderamente asombroso. El aparato usado en este experimento es mostrado esquemáticamente en la figura # 17.



Figura # 17. Diagrama esquemático de una fuente de iones electrospray.

En este tipo de equipos las muestras que tiene bajas volatilidades deben de ser introducidas de manera directa en forma de solución a través de un tubo capilar localizado en la parte izquierda del dibujo, otra forma de introducción de muestra es por medio del eluente de un cromatógrafo de líquidos.

La aguja mostrada en la figura, permite la introducción de la muestra al sistema de ionización. La aguja de electrospray es operada a un elevado potencial de campo y es un elemento importante para la interfase a cromatografía de líquidos. Para iones positivos con la aguja a un cierto potencial de campo, los voltajes típicos aplicados son los siguientes:

- a) electrodo cilíndrico, -3500 V
- b) entrada metalizada al final del tubo capilar, -4500 V
- c) salida al final, +40 V
- d) skimmer, +20 V
- e) lente de entrada al cuadrupolo

Los iones negativos son producidos por la reversibilidad de la polaridad de los voltajes. Esto es útil para agregar una pequeña corriente de oxígeno o de otros electrones inservibles cerca de la aguja, y así inhibir el comienzo de la descarga corona, la cual ocurre a voltajes más bajos en el modo ión-negativo. La movilidad de los iones en el capilar es lo suficientemente baja, permitiendo que la corriente del gas a través del capilar pueda arrastrar los iones por encima

del potencial del gradiente y llevarlos hasta la salida. Este acercamiento también ha sido usado exitosamente para la interfase con espectroscopia de masas electromagnética, donde la fuente de iones puede ser como mucho + 15 Kv.

Las muestras en solución entran a través de la aguja de acero inoxidable a un flujo usualmente entre 1 y 40 µL/min. El campo en la punta de la aguja carga a la superficie del liquido emergente, y las fuerzas Coulomb dispersan a la muestra dentro de un fino spray de gotas cargadas. Las gotas son llevadas por el campo eléctrico hacia el extremo de entrada del capilar a través de un flujo concurrente de un baño de gas (nitrógeno seco), generalmente a 800 Torr, con un rango de temperatura de 320-350 °K, y un flujo de 100 mL/min aproximadamente. El vapor del solvente, que proviene de las gotas evaporadas junto con otro material no cargado, es empujado hacia afuera de la entrada del capilar por un baño de gas. Como las gotas vaporizadas se encuentran altamente cargadas, se convierten en compuestos inestables y subdivididos, y eventualmente producen iones moleculares. Si las especies están presentes como solutos, estás pueden acomodar grandes números de elementos cargados, como las proteínas, y pueden ser observados en el espectrómetro de masas como se muestra en la figura # 16. Algunos de estos iones son introducidos en el flujo del baño seco de gas que entra en el tubo capilar y emerge en el extremo de salida, llevándolos a lo largo de un jet libre supersonico dentro de la primera de las dos cámaras de vacío. Una porción del núcleo de este jet libre pasa a través de un deflector (skimmer) dentro de una segunda cámara de vacío y reparte iones al analizador de masas.

Los detalles del mecanismo por el cual los iones moleculares son desorbidos de las gotas líquidas evaporadas cargadas son todavía un tema polémico. Las gotas son inicialmente formadas con una carga cercana pero debajo del limite de Rayleigh, el cual corresponde a los radios de las gotas, al cual las fuerzas de tensión superficial que mantiene las gotas juntas es igual a las fuerzas repulsivas Coulomb entre las cargas. Como los gotas se evaporan, este limite es excedido y se vuelven inestables, esta inestabilidad hidrodinámica, al menos para gotas grandes, provoca la liberación de un jet de pequeñas gotas cargadas. Mientras la gota inicial se evapora, este proceso es repetido hasta que el líquido es enteramente dispersado. Hay acuerdos generales sobre la primera parte de este proceso, pero el mecanismo principal
para iones moleculares a partir de gotas cargadas muy pequeñas ha sido la fuente de algunos debates.

Iribarne y Thomson ^[23] propusieron el modelo de evaporación del ión campo-inducido, en el cual el alto campo eléctrico en la superficie de una pequeña gota cargada, fue suficiente para hacer la evaporación del ión en competencia con la evaporación del solvente.

Roellgen desafío este modelo basándose en que los campos altos que fueron localizados, pueden causar el inicio de una inestabilidad hidrodinámica en la superficie, produciendo así un chorro y liberando un gran número de gotas cargadas. La opinión de Roellgen es que la desintegración hidrodinámica continua hasta que las gotas son tan pequeñas que contienen solo un ión solvatado, y que la desolvatación produce los iones que son observados en el espectrómetro de masa. Esta bastante claro que las energías observadas para el modelo del ión evaporado requieren que los iones emitidos estén fuertemente solvatados. De ser así, los dos modelos se vuelven casi indistinguibles y principalmente semánticos. En uno de los casos tenemos un ión solvatado y en el otro una pequeña gota cargada que contiene una sola especie. Esta especie puede competir con el solvente por la carga como un proceso de evaporación. En cualquiera de los casos, para producir iones eficientemente por electrospray, es deseable producir primero pequeñas gotas que estén cargadas todo lo que sea posible y provocar que estas gotas se evaporen en un baño de gas. Si la concentración de la muestra o de sales no volátiles es muy alta, la eficiencia de ionización es baja, ya que las gotas pueden secarse a una partícula sólida.

Han sido descritas en la literatura un gran número de variaciones en el diseño de la fuente del ión electrospray. Muchas de estas variaciones se encuentran en uso en instrumentos comerciales. La mayoría están relacionadas con el muestreador de iones de electrospray dentro del espectrómetro de masas, con el fin de maximizar la sensibilidad y mejorar la seguridad. En algunas de estas variaciones, no se usa el flujo del baño de gas a contracorriente y el residuo de gotas y alguno de los vapores del solvente entran a la interfase de la aguja con el espectrómetro de masas.

En estos sistemas la evaporación se completa y se previene la desolvatación usando una aguja capilar caliente o una cámara caliente. En aplicaciones en las que se requiere un muestreador continuo del efluente de HPLC, la principal preocupación ha sido la contaminación de superficies en la interfase con el espectrómetro de masas por componentes no volátiles, los cuales pueden causar la suspensión del sistema y que el equipo fuera desarmado y limpiado constantemente. Algunos esquemas ingeniosos han sido descritos recientemente en un intento para eficientar muestras de iones, pero rechazan gotas líquidas o partículas macroscópicas, las cuales deben de estar presentes.

La técnica de electrospray es un método de ionización dependiente de la concentración. Esta técnica trabaja mejor a bajas velocidades de flujo. Reduciendo el diámetro de la aguja de electrospray, se pueden producir sprays estables de muy finas gotas, a velocidades de flujo de 1 nL/min o menos ^[24]. Además, esta aguja de "nanospray" trabaja a muy bajos voltajes (ca. 1000 V o menos) debido a que los campos muy altos producidos en la punta pueden ser localizados muy cerca de la aguja muestreadora de iones dentro del espectrómetro de masas, el cual tiene un flujo de solvente muy lento. Esto permite una sensibilidad muy alta para cantidades pequeñas de muestra.

El empleo de ésta técnica de análisis a tomado rápidamente un lugar preponderante en el análisis de muestras de baja volatilidad, ya que gracias a la técnicas de cromatografía líquida se puede aprovechar la separación que se pueden tener de los diversos compuestos con la técnica de electrospray, puediendo tener resultados relevantes cuando se tiene una interfase con la cromatografía de elusión por tamaño, lo cual ha permitido hacer calibraciones absolutas de estándares de metilmetaclirlato, polietilenglicol, estireno, y de algunos co-polímeros de bisfenol A, neopentilglicoles y ácido tereftalico.

Gracias a esta técnica de interfasamiento, por medio de cromatografía de líquidos se han logrado identificar muestras tan complejas como los oligómeros de taninos presentes en el vino tinto, ó productos de degradación como ácido humico y ácido fulvico, en donde se tiene la principal limitante que es la solubilidad de estos compuestos en el sistema de separación ^[25].

Dentro del área de los polímeros esta técnica de electrospray tiene una aplicación importantísima debido a que es posible establecer un análisis estructural donde se pueden definir los grupos funcionales terminales como lo reporto Yalcin ^[26], para un grupo de polietilenglicoles usados en fármacos de liberación controlada.

Dentro del área de los polímeros aplicados a la electrónica, Svedberg ^[27] ha logrado identificar con éxito los polímeros aplicados en microchips que contienen una capa conductora, policarbonatos ó polimetilmetacrilatos. El establecimiento de los mecanismos de reacción durante el proceso de polimerización de isobutileno, y de estireno de vinil benceno también han sido ayudados por la técnica de ionización de electrospray, ya que se han logrado establecer intermediarios importantes y debido a su acople con cromotografía de permeación de gel, también se ha logrado separar oligómeros y establecer distribuciones de pesos moleculares de una manera muy exacta cuando se encuentran acoplados a un espectrómetro de masa de tiempo de vuelo ^[28-29].

A pesar de los enormes beneficios que esta técnica de ionización de compuestos de baja volatilidad ha contribuido en la química y en la ciencia de los materiales, las principales aplicaciones se encuentran en el área biológica, la cual se ha logrado combinar con la cromatografía capilar de electroforesis para la identificación de proteínas y oligonucleotidos ^[30], así como la microextracción en fase sólida.

2.6. Desorción de superficies

Con todos los beneficios mostrados, ahora es obvio considerar que la técnica del electrospray debe ser un método muy suave de ionización. Ahora se ve perfectamente razonable el concepto de descomponer líquidos para producir gotas muy finas, cargarlas, y evaporarlas suavemente para remover el solvente, dejando un ión de una proteína multi-cargada en la fase de gas, la mayoría de las técnicas de desorción superficial no hacían esto.

30

Una excepción es la técnica de desorción de campo (FD) descubierta inicialmente por Beckey y sus colaboradores. Ellos deben ser considerados iniciadores de la técnica de spray, en la cual se involucran aplicaciones de un campo eléctrico alto a una superficie líquida, obteniendo como resultado la producción de iones moleculares intactos de muestras no volátiles. La principal diferencia es que la técnica FD se realiza a vacío del espectrómetro de masas y la técnica del spray requiere un baño de gas a temperaturas altas.

El mecanismo de producción de iones, para iones positivos y negativos por FD ha sido ampliamente estudiado por Roellgen y colaboradores^[31]. Aunque está técnica no es muy practicada en el presente, estos estudios han proporcionado muchos de los fundamentos de los procesos involucrados en ionización de spray.

2.7. Alta energía de impacto de partícula

No es intuitiva la idea de que los fragmentos de fisión de Mav impactados sobre la superficie pueden producir iones moleculares de moléculas no volátiles y térmicamente lábiles. El método de ionización fue descubierto como un subproducto de estudios en decaimiento por Macfarlane y sus colaboradores. Ellos emplearon la técnica de análisis de tiempo de vuelo (TOF) para medir el tiempo entre la emisión del electrón y la detección de las partículas beta en el detector separado algunos metros. De los picos observados en este espectro se encontró que ninguno estaba relacionado con el decaimiento beta. La conclusión fue que los contaminantes en la superficie fueron ionizados y emitidos. Los emisores beta fueron remplazados por una fuente del fragmento de fisión ²⁵²Cf para incrementar la deposición de energía en la superficie. La superficie fue dopada con muestras conocidas no volátiles. En los primeros experimentos, los iones moleculares protonados observados fueron de la arginina, una molécula consideraba imposible por técnicas entonces en uso.

Un diagrama esquemático de un sistema de desorción de plasma se muestra en la figura 18.



Figura # 18. Esquema de un experimento Cf-PDMS.

La ionización se inicia por una fisión espontánea de un núcleo ²⁵²Cf. el cual produce fragmentos de fisión con energías de 100 Mev y cargas de + 20 aproximadamente. Los resultados también se han obtenido usando un haz de luz similar a las partículas de un acelerador. La transferencia de energía lineal de estos iones en un sólido es tan grande (0.1-1 ke V/Å), que es importante que la fuente sea delgada (fina). Una fuerza típica de una fuente es de 10 microcuries extendida sobre un área circular de 3-5 mm de diámetro. El grueso de la capa de californio está alrededor de 1 ng/cm². El complemento de la capa debe de ser bastante delgado, que permita que uno de los fragmentos de fisión alcance el detector del comienzo y el otro fragmento pase a través del complemento y ionize la muestra depositada en la superficie del complemento. La rejilla se coloca aproximadamente a 2-5 mm en frente de la superficie de la muestra, y se aplica un alto voltaje (aproximadamente 5-10 kV) a la muestra para acelerar los iones hacia el detector. Antes de MALDI y electrospray, esta técnica se convertía en una herramienta estándar en laboratorios de espectrometría de masas al centrarse en muestras biológicas. En aquella época era la única técnica disponible que podría producir confiablemente los iones moleculares de las proteínas con un peso molecular mayor de 10,000. El espectro de una de las proteínas más grandes que fueron medidas se muestra en la figura 19; esta ilustra la energía y los problemas con la técnica.



Figura # 19. Ion positivo de PSP ²⁵²Cf-PDMS.

La baja calidad del espectro por estándares contemporáneos, se entiende que es debida primeramente a la descomposición metaestable de los iones en vuelo. La técnica de desorción de plasma ha sido suplantada en gran parte por electrospray y MALDI, pero esta técnica marcó un punto importante en el descubrimiento de técnicas de ionización para espectrometría de masas de muestras difíciles. En ambas técnicas, se renovó el interés en gran parte al campo inactivo de espectrometría de masas de tiempo de vuelo, particularmente para moléculas grandes, y demostrándose que para el primer tiempo, estos iones increíbles pueden existir en la fase gaseosa el tiempo necesario para que sean medidas.

2.8. Baja energía de impacto de partícula

Poco después de la publicación del trabajo de Macfarlane's, Benninghoven y sus colaboradores presentaron los primeros resultados en ionización de moléculas no volátiles por impacto ionico de baja energía. El análisis de espectrometría de masas de iones producidos por bombardeo de superficies con iones keV, era ya establecido como una técnica para análisis de superficies ^[32]. Las primeras aplicaciones fueron a estudios fundamentales, los cuales se basaron en el hecho de que la espectroscopia de masas de iones secundarios (SIMS) proporciona una alta sensibilidad absoluta para muchas componentes de la superficie y se

diferencia de otras técnicas disponibles, ya que puede detectar hidrogeno y determinar los componentes isotópicos de elementos en la superficie.

Benninghoven y colaboradores ^[33] mostraron que SIMS fue una técnica muy sensible para la detección e identificación de compuestos orgánicos. Esta técnica puede ser operada en el modo "estático". El principal problema en detectar moléculas intactas en SIMS puede ser el efecto dañino del haz del ión primario. Este efecto puede ser minimizado operando en el modo "estático", en el cual la superficie es bombardeada a una densidad de corriente muy baja. Los daños de las secciones transversales se encuentran generalmente en el orden de 10⁻¹⁴ cm²; manteniendo el nivel total de iones primarios por debajo de aproximadamente 10¹²/cm² asegurando una pequeña probabilidad de que un área superficial dañada por el impacto de un ión sea impulsado por otro ión primario durante la medición. La técnica estática SIMS ha sido aplicada a una amplia variedad de compuestos orgánicos incluyendo amino ácidos, péptidos, nucleosidos, nucleótidos, vitaminas y muchos otros ^[34]. Casi todos los espectro muestran abundancias altas de iones moleculares protonados ó cationizados. Los rendimientos secundarios de iones moleculares son tan altos como 0.1 y dependen fuertemente del substrato y de las propiedades del haz primario. Los substratos de metales nobles generalmente producen los rendimientos más altos.

La mayoría de los primeros trabajos de SIMS emplearon deflexión magnética o analizadores de cuadrupolo, y la necesidad de trabajar en el modo estático junto con la pérdida de iones, la cual es causada por el ciclo de analizadores de barrido, hacen la sensibilidad menor que la deseada. Una solución a este problema fue el uso del analizador de tiempo de vuelo, esto permito que cada ión fuera desorbido por un pulso de iones primarios y que los iones fueran detectados ^[35]. También, el analizador lineal de tiempo de vuelo solo requiere que el ión se mantenga estable durante el tiempo necesario para atravesar el campo acelerado; así, los iones que no pueden ser detectados en el instrumento de barrido pueden ser detectados como resultado de los fragmentos con el mismo tiempo de vuelo de iones moleculares intactos. Se observaron producciones significantes de iones moleculares de un número insuperable de compuestos. Los espectros obtenidos por TOF-SIMS son muy similares a los obtenidos por ²⁵²Cf TOF según lo demostrado por comparación de las mismas muestras. En ambos casos,

los iones de peso molecular muy alto son predominantemente metaestables. También han sido utilizadas las partículas neutras en el rango keV, pero los resultados de estas partículas son similares a los de los iones de energía comparable.

Puesto que es entendido que los iones que se acercan a la superficie con energías keV son probablemente neutralizados por una amplia gama de transferencia de electrones, no es sorprendente que la carga en las partículas es poco importante.

2.9. Impacto de baja energía con superficies líquidas

Otro acercamiento exitoso para mejorar la utilidad de la ionización de impacto de baja energía para moléculas no volátiles fue descubierta por Barber y sus colaboradores ^[36]. Esta técnica difiere de SIMS en dos aspectos:

- a) Primero, el haz primario es un haz de energía neutra keV, el cual es producido por neutralización de intercambio de la carga de un haz del ion.
- b) Segundo, la muestra se introduce a una solución ó suspensión en un líquido relativamente no volátil, como lo sería el glicerol.

Esta claro que la presencia ó ausencia de cargas en las partículas incidentes tiene un pequeño efecto sobre el proceso de desorción, pero el uso del haz neutro es más conveniente con instrumentos magnéticos, donde las fuentes estén a un potencial alto. Se tienen efectos muy marcados si se substituye la superficie sólida con una matriz líquida. El efecto más notable de la matriz líquida es el retiro de los requisitos para trabajar a bajas densidades de corriente para evitar el daño a moléculas en la superficie. Frecuentemente se han empleado densidades de corriente y algunos niveles de magnitudes más grandes que las sugeridas por Benning y colaboradores. En muchos casos se han mantenido como intensidades estables por 30 minutos o más ^[37] la producción de iones moleculares protonados de muestras no volátiles. El análisis racionalizado para estos efectos es que la solución presenta una superficie móvil, la cual es constantemente renovada para el bombardeo del haz. Esto proporciona rellenos continuos de muestras que no perjudiquen a la superficie para que sea ionizada. Los trabajos realizados por Field muestran que si ocurre el daño por la radiación substancial al glicerol, aproximadamente

100 moléculas de radiación de productos dañados son producidos por átomos de argón incidentes 5-keV.

Una desventaja de la matriz líquida es que el fondo substancial es producido por la ionización del glicerol y sus fragmentos son inducidos por radiación. También los agrupamientos substanciales del glicerol con muestras ionicas son observados junto con agrupamientos de iones mezclados cuando se analizan muestras impuras o mezcladas. Esta técnica, conocida como bombardeo rápido del átomo (FAB) o líquido SIMS, que es dependiente de la carga del haz incidente, ha sido exitosamente aplicada a una amplia variedad de muestras difíciles ^[38]. Parte de este éxito puede ser atribuido a su compatibilidad con instrumentos magnéticos de alta resolución; estos fueron los instrumentos más utilizados al tiempo que esta técnica fue descubierta, y las fuentes FAB o LSIMS fueron disponibles comercialmente en la mayoría de las empresas inmediatamente después de la publicación inicial.

2.10. Flujo FAB

El flujo continuo FAB fue descubierto para corregir algunas de las dificultades con la técnica estándar FAB, mientras que se conservan las ventajas esenciales ^[39]. Esta técnica utiliza una punta de prueba para la introducción de la muestra que proporciona una flujo continuo de liquido dentro de la fuente de iones en el espectrómetro de masas y sobre la plataforma de la muestra donde ocurre el bombardeo del átomo. Esto reduce los requisitos para un acarreador viscoso y permite el uso de solventes más volátiles como el agua, metanol y acetonitrilo. La velocidad de flujo del líquido se encuentra generalmente en el rango de 1-20 μL/min, y las muestras pueden ser analizadas por inyección de flujo, siguiendo una separación en línea por LC capilar, o electroforesis capilar. Además a la ventajas obvias, también proporciona bajos limites de detección y efectos disminuidos de la supresión del ión ^[40] comparados a el FAB convencional.

1.10. FD y FAB

La espectroscopia de masas de desorción de campo (FD) ^[41-42] y bombardeo rápido de átomos (FAB) ^[43] son técnicas que fueron desarrolladas para proporcionar masas especificas a compuestos que no son lo suficientemente volátiles para analizarlos por técnicas de espectroscopia de masas tradicionales. FD y FAB fueron muy practicadas en un tiempo y usada algunas veces con instrumentos de sectores magnéticos para proporcionar datos de masas elevadas exactas para materiales mayores a unos cuantos miles de unidades de masa (u).

En FD se aplica directamente una solución diluida del polímero al filamento, en el cual ha crecido una microaguja de carbon pirolitico. Este emisor es puesto a un voltaje alto y es colocado cerca del electrodo contador creando altos campos potenciales requeridos para la ionización de campo. FD es una técnica de ionización suave, la cual primeramente produce iones oligomericos intactos. Se ha demostrado que está técnica es efectiva para llevar a cabo el análisis de polímeros de bajo peso molecular, como el poliestireno. FD con cargas cationizadas múltiples ha empezado a ser investigada para ayudar a ampliar el rango de masa de los instrumentos del sector magnético. FD es una técnica que todavía se utiliza, principalmente en el análisis de polímeros que les falta la suficiente funcionalidad para ser ionizados por MALDI.

Evans y sus colaboradores demostraron que FD puede caracterizar estándares de polietileno de bajo peso molecular, como se muestra en la figura 20.



Figura # 20. Espectro de masas FD de un estándar de PE de bajo peso molecular.

La técnica FD también es empleada para análisis de pre-polímeros y de aditivos para polímeros en casos donde las técnicas como MALDI ó espectrometría de masas de iónsecundario líquido (LSIMS) presentan algunas complicaciones debido a las interferencias de la matriz^[44].

En el caso de FAB, la solución diluida del polímero se mezcla con una matriz líquida, como el glicerol, y esta mezcla es aplicada a una punta de prueba. La prueba es bombardeada con un haz de luz rápido. Las técnicas FAB y LSIMS están muy relacionadas. La principal diferencia entre estas técnicas es que para FAB se utiliza una haz de luz neutro primario y para LSIMS se utiliza un haz de luz cargado. La matriz líquida sirve para mantener separada las moléculas oligoméricas individuales y para refrescar constantemente la superficie de la muestra, provocando tiempos de análisis muy largos.

Una gran desventaja de la técnica FAB es que la superficie de la matriz liquida es la única parte analizada de la muestra. FAB puede tener problemas con la discriminación, la cual esta basada en la actividad relativa de la superficie de los diferentes analitos. La figura 21 muestra un espectro de masas FAB de un surfactante Surfinol etoxilado S465.

38



Figura # 21. Espectro de masas FAB de un surfactante etoxiliado S465. El ión a 513 u es asigando como el oligomero etoxilado 6.

El espectro de masas muestra claramente los oligoméros de la muestra surfactante. La popularidad de FAB disminuía con el incremento de MALDI y ESI. Los experimentos de FAB todavía se realizaban en materiales con poli(metilmetacrilatos peróxidos), epoxi-aminas adicionados a polímeros, y copolímeros poliéster.

2.12. GDMS

La espectroscopia de masas de descargas luminosas (Glow discharge mass spectroscopy GDMS) es otra técnica capaz de identificar diferentes materiales poliméricos ^[45]. Las técnicas de descargas luminosas han sido bien establecidas para el análisis elemental. Las técnicas GDMS ahora han empezado a desarrollarse para el análisis de polímeros. Una ventaja de GDMS en el análisis de polímeros es la habilidad para analizar muestras de gran masa. Se requiere muy poca preparación de la muestra, además de que se pueden analizar directamente varias muestras de diferentes materiales. Esto puede ser valioso para materiales que no son solubles, como algunos termoplásticos y co-polímeros complejos. En GDMS, el analito se comporta como cátodo en una descarga a presión baja. Para permitir que la técnica pueda analizar muestras no conductoras, como los polímeros, se usa un cátodo secundario para crear una descarga de corriente directa (dc) en la superficie de la muestra. Un buen ejemplo de datos espectrales de huella digital obtenidos por GDMS, son los datos obtenidos por Shick y sus colaboradores en politetrafluoroetileno (PTFE) ^[46]. Un espectro de masas de GDMS de

huella digital de una muestra de PTFE de 1.5 mm de espesor se puede observar en la figura 22, aquí se pueden ver claramente los iones atómicos y moleculares típicos para PTFE. Todos los iones pueden ser asignados como C_xF_y . El desarrollo de métodos GDMS para polímeros incluye un compartimiento de muestra enfriada criogenicamente para ayudar en el análisis de polímeros térmicamente lábiles.



Figura # 22. Espectro de masas GDMS de una muestra de PTFE con un espesor de 1.5 mm.

2.13. LDMS

La espectroscopia de masas por desorción de láser (LDMS) es una técnica que fue desarrollada para analizar materiales al enfocar un láser de alto poder sobre una superficie, los iones formados se volatizan y son analizados en un espectrómetro de masas por separación de las especies. Los iones pueden ser formados coincidentemente con la separación del láser por la post-ionización con otro láser o con un haz de electrones. La separación de los átomos del

láser también puede ser analizada por plasma acoplado inductivamente a espectrometría de masas para caracterizar especies atómicas a nivel de trazas ^[47]. El desarrollo de la técnica de MALDI como un caso especial de LDMS ha reducido mucho la cantidad de LDMS usado, aunque la técnica LDMS en instrumentos FTMS puede producir una cantidad significante de información sobre materiales poliméricos. Uno de los avances recientes de LDMS para análisis de polímeros es la detección de aditivos para polímeros, la caracterización de grupos terminales polimericos, la caracterización del nylon 6.6, y la caracterización de materiales C_{60}

Wright y sus colaboradores emplearon LDMS, con láser ultravioleta (UV) para detectar antioxidantes fenolicos y estabilizadores UV (Tinuvin) en muestras de polímeros. La figura 23 muestra un espectro de masas LDMS de Tinuvin 320.



Figura # 23. Espectro de masas LDMS de muestras injection-molded de POM (a) conteniendo un 0.3% en peso de Tinuvin 320 usando fotoionización a 193 nm y (b) conteniendo 0.1% en peso de antioxidante Santo White empleando una fotoionización a 266 nm.

2.14. MALDI

MALDI es un caso especial de LDMS usando métodos específicos de preparación de las muestras y una baja desorción del láser para crear los iones que serán analizados. Esta es quizá la técnica de espectrometría de masas más importante usada para análisis de polímeros.

Desde su introducción por los laboratorios Tanaka y Hillenkamp ^[49-51], MALDI ha crecido rápidamente en aplicaciones, extendiéndose para secuencias de péptidos y así medir el peso molecular promedio de materiales poliméricos sintéticos complejos. Con el reciente descubrimiento de extracciones retrasadas y decaimiento post-fuente (PSD), MALDI puede dirigir una gran variedad de cuestiones analíticas.

En MALDI, una solución diluida del polímero a analizar se mezcla con una solución madre más concentrada. Generalmente las matrices de MALDI son ácidos orgánicos aromáticos. Una pequeña alícuota de la muestra se aplica al blanco de MALDI y va cristalizando conforme el solvente se va evaporando. Después el blanco se coloca en la fuente del espectrómetro de masas, un láser irradia el blanco, vaporiza la solución madre , y desorbe los oligómeros poliméricos dentro de la fase gaseosa. Los oligómeros neutros en la fase gaseosa son cationizados por los protones o por los cationes metálicos. Los iones son extraídos dentro del espectrómetro de masas, después se realiza el análisis de masa y los iones son detectados.

Muchos laboratorios han investigado las mediciones de MALDI en una gran variedad de polímeros, compuestos químicos, estándares y muestras desconocidas. Estás investigaciones han contribuido significativamente al entendimiento total de MALDI de polímeros. La tabla 2 lista algunas de las contribuciones más importantes a este trabajo.

Química	Comentarios	Grupo	
anhídridos y époxidos	co-polímero	Liu y colaboradores	
celulosa	bajo peso molecular	Francotte y colaboradores	
materiales etoxilados	productos comerciales	Berchter y colaboradores	
metacrilatos	co-polímero	Suddaby y colaboradores	
PDMS	estándares estrechos	Yalcin y colaboradores	
РММА	grupos terminales	Maloney y colaboradores	
PS	alto MW	Schreimer y colaboradores	

Tabla # 2.	Referencias	representativas	de MALDI	de química.
------------	-------------	-----------------	----------	-------------

Un diagrama esquemático de una fuente MALDI se muestra en la figura 24.



Figura # 24. Esquema de la fuente de iones de MALDI

Las muestras que se encuentran en solución se mezclan con una solución madre que contiene un gran exceso molar (aproximadamente $10^4 - 10^5$) de un material madre UV absorbente. Este liquido se deposita en una pequeña gota, unos pocos µL o menos en volumen, se coloca en una muestra o placa y se deja que se seque. En el primer trabajo se empleó un sola punta de prueba, similar a las puntas de prueba sólidas usadas en otras áreas, pero en la mayoría de los sistemas comerciales ahora se usa una placa de muestra que sostiene cierto número de muestras y un mecanismo para posiciones secuenciales de las muestras frente al láser. Se prefiere un láser con una duración de pulso de unos pocos nanosegundos. El láser de nitrógeno más usado es el que emite a 337 nm, pero frecuentemente los lásers triplicados y el cuadruplicado Nd:YAG que emiten a 355 y 266 nm también son usados. El ángulo de radiación a la superficie de la muestra varia entre 15° y 70° y no es grave. El láser es enfocado a un tamaño de punta de entre 30 y 500 µm, la irradiación requerida se encuentra generalmente entre 10^{6} y 10^{7} W/cm² dependiendo del tamaño de punto y la matriz usada. La desorción neutra y iónica muestran una fuerte dependencia en radiación láser aplicada. Para una muestra dada, hay un valor de umbral distinto para producir intensidades de iones detectables y sobre ese valor la producción de iones incrementa rápidamente con incremento de la radiación. Generalmente, la fuente de iones es proporcional al quinto ó sexto poder de irradiación sobre el umbral. Los mejores resultados se obtuvieron con irradiaciones láser no mayores que 20 – 50% sobre el umbral; así, se requiere un atenuador cuidadosamente controlado para ajustar la intensidad del láser.

Algunos de los detalles del mecanismo involucrado en MALDI son todavía algo controversiales y son el tema de investigación de varios investigadores. Sin embargo, las mayores características han sido establecidas y han sido revisadas por Karas y Bahr. La matriz sirve para varias funciones: primero debe proporcionar fuertes absorciones de la luz del láser incidente. Esto permite la transferencia de energía del láser a la muestra sólida en un modo controlado. Las condiciones típicas de operación son

a) radiación del láser en el rango $10^6 - 10^7$ W/cm²,

b) la longitud del pulso del láser de unos pocos nanosegundos,

c) los coeficientes de absorción molar para la matriz de unos cuantos miles L mol⁻¹ cm⁻¹.

Esto corresponde generalmente al orden de un fotón absorbido por molécula matriz en la capa exterior. Estos resultados con decaimiento exponencial profundizan la excitación con profundidades típicas de penetración de aproximadamente 100 nm. Esta energía es suficiente para inducir la ablación de un volumen pequeño, fijando la matriz intacta y los analitos ionicos y neutros. Otra importante función de la matriz es la de aislar moléculas de muestras individuales y prevenir la agregación. El analito generalmente es diluido en un gran exceso de matriz (aproximadamente 10000 ó más sobre una base molar), y aparece que las moléculas son aisladas como un "sólido en solución" en la matriz. Se desearía la incorporación de

moléculas analíticas dentro de los cristales de la matriz que son formados por la evaporación del solvente, ya que para algunas matrices puede ser esencial. La matriz también aparece para jugar un rol en el proceso de ionización, pero esto no esta totalmente entendido.

El entendimiento del proceso de MALDI todavía no es suficiente para permitir la selección de una matriz solo en consideraciones teóricas. La absorción requerida a la longitud de onda del láser-UV no es un criterio muy restrictivo; es necesario pero no suficiente para una buena matriz. Un gran número de materiales han sido evaluados, y solo unos pocos han dado resultados satisfactorios. Las propiedades requeridas para la matriz son la compatibilidad de los solventes para los analitos y la matriz, la ausencia de la reactividad química con los analitos, y la estabilidad en un vació. Un gran número de compuestos que han sido empleados empíricamente pueden trabajar como matrices, pero muy pocos se ven actualmente como matrices de alta calidad para UV-MALDI. Estos incluyen ácido sinapico y algunos derivados relacionados con el ácido sinamico, ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB frecuentemente con un mezcla agregada de 10% de ácido 2-hidroxi-5-metoxibenzoico (super DHB), ácido α -cyano-4hidroxicianimico (4-HCCA), ácido 3-hidroxipicolinico (HPA), además de di y triacetofenonas. Un gran número de otras matrices satisfacen la co-solubilidad requerida para emplearse con polímeros industriales.

Los factores determinantes de la distribución de iones observada en MALDI continúan siendo de interés, deseando que el método pueda ser colocado en una base racional y predictiva.

Un evento de desorción láser asistida por una matriz (MALDI) constituye un proceso complejo, el cual involucra fenómenos ópticos y mecánicos, así como también procesos termodinámicos y físico-químicos de transición de fase y ionización. Un análisis exitosos de MALDI abarca algunos pasos cruciales:

- 1) preparación de la muestra
- 2) excitación de la muestra y desintegración de la fase condensada
- 3) generación y separación de cargas
- 4) ionización de las moléculas analíticas

- extracción, separación de acuerdo al radio de masa/carga de los iones en el espectro de masas.
- 6) Detección.

2.14.1. Preparación de la muestra

Los experimentos de MALDI son dominados por la preparación de la muestra. El método de preparación de la muestra es vital para el éxito de los experimentos MALDI de polímeros. El Profesor Kevin Owens de la Universidad de Drexel dice que un espectrómetro de masas MALDI es un instrumento diseñado para determinar si la preparación de la muestra fue realizada correctamente. Para algunos materiales, puede haber diferentes métodos de preparación de la muestra y producir casi los mismos resultados. Desafortunadamente, los errores significativos en la preparación de la muestra pueden conducir a un resultado completamente erróneo.

La preparación de la muestra para polímeros MALDI debe lograr 5 diferentes roles, uno para el solvente y cuatro para la matriz. Los roles son como sigue:

- 1)Separar los oligomeros individuales, el solvente debe separar efectivamente las moléculas de la muestra. Se necesitan minimizar las interacciones entre las moléculas a analizar y generar moléculas individuales para los experimentos de MALDI.
- 2)Aislar los oligomeros de la matriz. Se debe mantener la separación de los oligomeros, esto se logra disolviendo la muestra en un buen solvente. La mayoría de las matrices usadas en polímeros MALDI son ácidos orgánicos aromáticos pequeños, los cuales forman rápidamente cristales conforme el solvente se va evaporando.
- 3)Absorber la energía la matriz debe absorber la energía emitida a la muestra, generalmente con un láser de 337 nm.

- 4)Desorber el analito la matriz debe convertir la energía emitida por el láser para expulsar las moléculas del analito hacia dentro de la fase gaseosa.
- 5)Ionizar el analito la matriz debe proporcionar una trayectoria de ionización para las moléculas del analito.

Se han empleado diferentes estrategias para la preparación de la muestra para polímeros MALDI. La más simple es el método de secado de la gota. En este método, una solución diluida del analito se prepara en un buen solvente. Esta solución del analito después se mezcla con una solución madre de mayor concentración en el mismo solvente. El solvente debe ser seleccionado cuidadosamente para ser un buen solvente tanto para el analito como para la solución madre. Se puede usar casi cualquier solvente relativamente volátil. La razón de la mezcla de las dos soluciones puede resultar en una relación matriz-analito de entre 100 y 10000 dependiendo de la química y del peso molecular del polímero. Para polímeros de bajo peso molecular, generalmente se usan 5 mg/mL de solución de polímero con 0.25 M de solución madre ^[52, 53], los cuales se mezclan en una relación 1:7.

Aproximadamente 1 μ L de la solución resultante es después colocada en el blanco y posteriormente secada. Para muchos de los experimentos más simples de polímeros, MALDI es un método adecuado para producir datos convenientes.

Otro método popular es el método de capa. En este método, la solución madre es primero colocada en la superficie del blanco y se deja secar. La solución de la muestra después es aplicada a los cristales secos de la matriz. En algunos casos, la preparación de la muestra puede ayudarse por la adición de un surfactante ^[54].

Algunas muestras requieren más control sobre el proceso de evaporación para lograr la acertada preparación de la muestra. En este caso, la evaporación puede ser controlada por electrospraying o neumáticamete asperjadas. Mientras estas dos técnicas tienen diferentes mecanismos, los resultados son similares. La técnica de spraying controla la evaporación del

solvente para obtener un mejor mezclado del analito y de la matriz. Esto es especialmente importante para analitos que tienen poca solubilidad en la matriz y para experimentos donde la cuantificación es importante.

Los experimentos de asperjado generan muestras muy homogéneas para los experimentos MALDI. En la figura 25 se pueden observar muestras de iones totales, tiempo de vuelo (TOF) espectrometría de masas de ión secundario (SIMS), imágenes de gotas secas y PMMA electrospray 2900^[53].



Figura # 25. Imagen de iones totales SIMS para muestras de PMMA MALDI.

La imagen de la figura 25a muestra una estructura cristalina definida de la matriz. La imagen en la figura 25b es completamente homogénea en la escala de resolución lateral del experimento, aproximadamente 1 μ m. Las imágenes individuales de los iones (para la matriz, Na⁺, agente cationizante, y el polímero), todas muestran el mismo efecto.

La selección del solvente es critica para el éxito de un experimento de polímero MALDI ^[55, 56, 57]. Si la muestra de polímero no es totalmente soluble en el solvente, solo la porción de la muestra que se pudo disolver será observada por MALDI.

Yalcin y su colaboradores mostraron como la elección del solvente puede afectar dramáticamente el peso molecular promedio para poliestireno^[56]. Un ejemplo interesante de usar cambios en la solubilidad de la muestra, y así afectar las mediciones de MALDI, es mostrado por Liu y sus colaboradores en su trabajo con poli(alquiltiofenos). Ellos emplearon

cambios en la solubilidad de la muestra en diferentes solventes para obtener muestras con polidispersidades estrechas (PD de 1.09 a 1.29). La figura 26 muestra cinco diferentes extracciones del poli(alquiltiofeno) usando acetona, hexano, cloruro de metileno, tetrahidrofurano y cloroformo.



Figura # 26. Espectro de masas MALDI de una poli(alquiltiofeno) fraccionado con acetona, hexanos, cloruro de metileno, THF, y cloroformo.

2.14.2. Proceso de Ionización

Knochenmuss y sus colaboradores propusieron recientemente que las reacciones secundarias en MALDI, en muchos casos pueden ser el factor determinante del espectro de masas.

Una motivación para separar los sucesos primarios y secundarios en MALDI es la escala de tiempo. El pulso del láser esta generalmente entre 3-5 ns (láser de N_2 o Nd:YAG), pero el tiempo necesario para la extensión a densidades de colisiones libres es mucho más grande, en el orden de varios microsegundos ^[58]. Con la posible excepción de que los iones pre-formados son liberados después, y que los iones primarios pueden ser generados durante el pulso del láser o con el tiempo de vida del estado excitado de la matriz. Durante el proceso de

generación de iones, las reacciones entre los iones y los compuestos neutros serán tantas como haya colisiones. Si el número y las energías de estas colisiones son los suficientemente grandes, en cualquier proceso termodinámico favorable puede alcanzar el equilibrio. Notando que la escala de tiempo de reacciones primarias y secundarias pueden o no pueden ser similares; la consideración clave es la secuencia de las reacciones.

La ionización primaria de la matriz en una matriz UV-MALDI comúnmente emplea el ácido 2-hidroxienzóico, el cual ha mostrado que tiene una escala de tiempo para el proceso dominante de aproximadamente 2 ns.

En las reacciones ión-molécula, la matriz es el acompañante neutro dominante, simplemente porque casi siempre esta presente en un exceso substancial. La relación ion-compuesto neutro en MALDI se ha reportado como $10^{-4} - 10^{-7}$ ^[59,60]. Pueden tomar otras reacciones, como las recombinaciones ión-ión, pero estas serán mucho menos frecuentes.

2.14.3. Tipos de reacciones secundarias.

a) Transferencia de protones.

La transferencia de protones es probablemente la reacción secundaria en MALDI más importante. Las proteínas y los péptidos son detectados predominantemente en MALDI cuando tienen forma protonada.

Los analitos neutros como los péptidos y las proteínas tienen altas afinidades con los protones (PAs), generalmente al menos 900 kJ/mol, algunas veces mucho más altas. Por lo tanto se supone que las reacciones de transferencia de protón de la matriz primaria protonada, MH⁺, con el analitos son eficientes (esto no excluye la presencia adicional del AH⁺ pre-formado en la ionización primaria):

$$MH^+ + A \longrightarrow M + AH^+$$

b). Transferencia de cationes

Los aductos de los analitos con varios cationes pueden ser una molestia cuando otras señales son ya fuertes (por ejemplo especies protonadas), o muy usadas cuando son débiles. Particularmente para el análisis de polímeros sintéticos, los cationes son frecuentemente adheridos intencionalmente.

Las afinidades de los cationes son muchos más bajas que las afinidades de los protones. Para matrices, Na⁺ las afinidades se encuentran en el rango de 150-170 kJ/mol. Las afinidades para el potasio son menores, en el orden de 50 kJ/mol.

La cationización es tipicamente importante para analitos con una afinidad de protón menor que la de la matriz. Los analitos por lo tanto deben competir con la matriz neutra para protones disponibles en las reacciones de ionización. La transferencia de cationes no se cuenta como una limitante cinética.

c) Transferencia de electrones

Los radicales cationicos moleculares o aniones son observados para un gran número de matrices. El tipo más simple de reacción matriz-analito ión-molécula, transferencia de electrones, se ha demostrado para ciertas combinaciones de matrices y analitos.

Como se ilustran en la figura 27, si el potencial de ionización de la matriz (IP) es mayor que el IP del analito, la reacción puede ser eficiente, por otro lado, el analito no es ionizado:

 $M^+ + A \longrightarrow M + A^+ \Delta H = IP(A) - IP(M)$



Figura # 27. (a) Espectro MALDI-TOFMS de trifenilfosfina (m/z 262.3, IP=7.8 eV) usando 1,4-difenil-1,3butadiendo (m/z 206.27, IP=8.5 eV) como la matriz. (b) espectro MMALDI-TOF de trifenilfosfina analizado usando perileno (m/z 252.3, IP=6.96 eV) como matriz.

La reacción reversible, la transferencia del electrón de la matriz neutra a los iones analíticos, es muy importante en la determinación del espectro de MALDI.

d) Captura de electrones

Un aspecto importante de un mecanismo propuesto recientemente involucra las capturas carga-dependencia para electrones libres y así explicar la pre-valencia de +1 de iones en MALDI.

Para que los electrones libres jueguen un rol importante en MALDI, ellos deben estar presentes en cantidades substanciales. Una polaridad negativa grande puede algunas veces ser observado a un tiempo de vuelo muy corto. Esto es probablemente debido a los electrones. Sin embargo, no son necesariamente siempre abundantes.

2.14.4 Proceso de desorción

El proceso de desorción o extracción de la matriz proporciona muestras o iones en estado gaseoso que son ideales para el análisis de MALDI.

La selección de la matriz es critica para el éxito de la desorción en experimentos MALDI de polímeros ^[61]. Una gran variedad de polímeros han sido analizados, y una gran variedad de matrices han sido empleadas exitosamente. Usando una combinación de MALDI y análisis de superficies (Espectrometría de masas de iones secundarios enaltecidos de la matriz, MESIMS), descubrimos una simple figura mostrando la hidrofilicidad/hidrofobicidad relativa de algunas matrices comunes comparadas a polímeros comunes, mostrado en la figura 28.



Figura # 28. Hidrofobicidad/hidrofilicidad relativa de algunos polímeros comunes MALDI matrices y estándares de polímero complementados por MALDI y MESIMS.

Los datos relativos de hidrofilicidad/hidrofobicidad mostrados en la figura 28 ayudan en la reducción del tiempo para desarrollar un método de preparación de la muestra conveniente de polímero por MALDI.

El rol final de la matriz es proporcionar una forma de ionización conveniente para los polímeros oligoméricos. Las muestras de polímeros observadas en MALDI son cationizadas, las funciones amina tienden a protonarse ^[62], las funciones oxígeno tienden a cationizarse alcalinamente, y los hidrocarburos insaturados tienden a cationizar el cobre y la plata. Ya que

Revisión Bibliográfica

la mayoría de las matrices son ácidos orgánicos y pueden suministrar un protón fácilmente. Si se requiere la cationización del metal, se debe incluir una fuente del metal apropiado en el método de preparación de la muestra. Aunque el mecanismo de ionización en MALDI todavía no esta muy bien entendido, una combinación de iones pre-formados y una reacción de cationización en fase gaseosa probablemente explica la mayoría de las ionizaciones observadas. Zenobi y sus colaboradores escribieron un articulo de revisión sobre este tema. Ellos observaron para algunos polímeros, especialmente polietilenterftalato, que la selección del catión puede impactar significativamente en la medición del peso molecular promedio. Todavía se están desarrollando e investigando nuevos agentes cationizantes ^[63]. Los metalocenos han sido desarrollados para mejorar la intensidad de las señales de polímeros de peso molecular alto. Los métodos teóricos se están empleando para entender mejor las cuestiones de cationización en MALDI.

Se ha propuesto que el proceso de desorción sigue diversos modelos, el mas aceptado es la transición de fases, en donde la matriz es irradiada por un has de alta energía que provoca transiciones de fase, fusión, evaporización, sublimación o algún otra forma de disipación de energía. Como ya se mencionó anteriormente, ocurre una transferencia de protones, electrones y finalmente la cationización del analito, el siguiente paso es la desorción de la matriz, en donde derivado de la absorción de la energía se generan presiones puntuales muy altas, derivando así la expulsión de clusters del analito que se encuentra en forma iónica, logrando ser orientado por una serie de lentillas magnéticas al sistema de separación de iones.

Se ha establecido que un proceso importante en la desorción es la cationización que surge en la matriz Marino y sus colaboradores muestran como la teoría y la parte experimental pueden complementarse una a la otra, y así mejorar el entendimiento de la ionización en espectrometría de masas.^[64] Para algunos complejos pequeños de éteres, se usa la teoría de la perturbación para caracterizar la interacción éter-metal alcalino. Los estudios que modelan la molécula de un surfactante etoxilado muestran un incremento en la estabilidad del catión con incremento en la cadena del oligómero. Estos resultados complementan los datos de la espectrometría de masas.

Bowers y sus colaboradores emplearon experimentos ion-cromatografía / mobilidad del ión, combinados con mecanismos moleculares para extraer las conformaciones de los oligomeros cationizados. Sus resultados indican que los oligomeros de PEG cationizados alcalinamente prefieren una coordinación esférica cercana a 5 capada en la parte superior e inferior ocasionando una coordinación 8 en el sitio cationico, es decir en el Na⁺. La figura 29 muestra las estructuras de menor energía encontradas para PEG_n + Na⁺, con N=9, 13 y 17. Li⁺, un catión más pequeño que el Na⁺, prefiere una coordinación menor de 7, y Cs⁺, un catión más grande que Na⁺, prefiere una coordinación mayor que 11.



Figura # 29. Estructuras de menor energía encontradas para Na⁺ cationizado por PEG₉, PEG₁₃ y PEG₁₇.

Estas estructuras nos ayudan a un mejor entendimiento de la cationización alcalina en MALDI, incluyendo los efectos de cationización en el peso molecular promedio.

El éxito en los experimentos MALDI indican que si un material polimérico en particular puede ser ionizado, un método de preparación de la muestra puede probablemente ser desarrollado para analizarlo por MALDI. El problema de encontrar un agente cationizante adecuado es la llave para agregar poliolefinas a la lista de materiales que pueden ser analizados exitosamente por MALDI.

2.14.5. Mediciones de peso molecular

Uno de los experimentos claves para MALDI de polímeros es la medición del peso molecular promedio de materiales poliméricos.



Figura # 30. Espectro de masas MALDI de PMMA 2900.

La figura 30 muestra un espectro de masas MALDI de un estándar de polimetilmetacrilato (PMMA) relativamente simple. Este espectro de masas se obtuvo usando un secado de la gota y preparación de la muestra con THF como solvente y IAA como la matriz en un instrumento Bruker Biflex (Billerica, MA). En el espectro de masas podemos observar oligomeros individuales espaciados por 100 u de 800 a 4900 u. Estos iones pueden ser asignados como Na⁺ cationizados con oligoméros de PMMA. El peso molecular promedio es calculado directamente de la intensidad del ión y el ion masico es calculado en el espectro de masas usando las ecuaciones 1 y 2.

$$M_{\rm N} = \Sigma M_i N_i / \Sigma N_i \quad (1)$$

polidispersidad = PD = M_W / M_N (2)

El ión masico es corregido por la masa del catión, substrayendo 23 u en este caso para la cationización del Na⁺. Para el espectro mostrado en la figura 22, se calculó el peso molecular promedio de M_N =2510 u y M_W =2670 u, con PD=1.06.

El método para calcular el peso molecular promedio a partir de los datos del espectro de masas se ha desarrollado por algunos laboratorios y vendedores de instrumentos. En su forma más simple, el peso molecular promedio es el primero de los dos momentos de la distribución de la intensidad de los oligómeros. El algoritmo para estos momentos puede ser escrito y codificado para computación. La cuestión más complicada en el calculo del peso molecular promedio es el hecho de que los datos espectrales de masa de tiempo de vuelo comúnmente usado en MALDI no es colectado linealmente en masas pero si en tiempo. Li y sus colaboradores describen un importante factor de corrección para la intensidad de la señal que necesita ser realizada durante el proceso de calibración de masa, antes de que el peso molecular promedio sea calculado

$$q(m) \alpha D(t) (dm/dt)$$
 (3)

Donde D (t) es el detector de respuesta MALDI con una función de tiempo, t, q (m) es el correcto número de distribución de peso molecular con una función de la masa, m, y dm/dt es la derivada de la ecuación de calibración.

El peso molecular promedio obtenido por MALDI es frecuentemente comparado al peso molecular promedio obtenido por GPC. Jackson y sus colaboradores demostraron que es problemático comparar los valores del peso molecular promedio o M_P obtenidos por MALDI y por GPC, sin trazar primero ambos datos en el mismo eje de las x. El valor de M_P debe de ser recordado solamente para fracciones de peso contra el registro de las curvas de masa para reducir la confusión. Los momentos usuales, M_N y M_W , son un mejor camino para comparar los datos de MALDI y GPC.

La exactitud de los pesos moleculares promedio obtenidos por MALDI siempre han sido un tema de debate. Existe un acuerdo general que los pesos moleculares promedio obtenidos por MALDI son exactos para muestras de baja polidispersidad. Ha habido muchas investigaciones acerca de la exactitud de los polímeros por MALDI, y la mayoría de los papeles listados en la tabla 3 compara los pesos moleculares promedio obtenidos por MALDI contra otras técnicas, usualmente GPC.

Zhu y sus colaboradores proporcionaron una buena examinación de los detalles de entendimiento acerca de la cuestión involucrada en mediciones de peso molecular promedio por MALDI ^[65]. Estos datos son presentados en la tabla 4. El dato muestra desviaciones estándar relativas de 0.3-0.5 % para masas nominales entre 5050 y 11600 u.

El Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología (NIST) ha patrocinado investigaciones sobre la determinación de peso molecular promedio de polímeros obtenidos por MALDI ^[66-67]. Guttman y sus colaboradores prepararon materiales de PMMA 6300 y PS 7000 bien caracterizados con polidispersidades estrechas. La muestra de PMMA 6300 se comparo bien con sus propios estudios de GPC. La muestra de PS 7000 fue distribuida a 18 laboratorios interesados. A cada laboratorio se le pido analizar la muestra por un método de preparación de la muestra ya prescrito (usando todos ácidos trans-retinoicos como la matriz y THF como solvente) y su método favorito de preparación para PS. La mayoría de los laboratorios usaron ditranol como su segunda elección de matriz. Los resultados de los experimentos fueron $M_N = 6600 \pm 100$ u y $M_W = 6700 \pm 90$ u. La baja incertidumbre en el peso molecular muestra una excelente reproducibilidad de laboratorio a laboratorio.

Las mediciones del peso molecular por MALDI ha sido muy exitoso para muestras de polidispesidad estrecha.

La mayor ventaja sobre la medida de peso molecular por MALDI es que estos son precisos para muestras con un PD menor que aproximadamente 1.2 ^[68]. Esto es cierto, pero para las muestras con una PD entre 1.2 y 1.6, hay pocos estándares bien caracterizados. Para muestras con una PD mayor de 1.6, MALDI tiene problemas para medir exactamente las distribuciones de peso molecular promedio. Los factores que afectan las mediciones exactas de peso molecular para polímeros polidispersos incluye la preparación de la muestra, la influencia del láser, la serie de instrumentos dinámicos, el tiempo de la extracción, la fragmentación, la formación de cargas múltiples, la saturación del detector y la respuesta relativa del detector.

La cuestión involucrada en la medición de muestras con polidispersidadeas anchas se ha investigado mediante la creación de muestras anchas mezcladas con estándares estrechos. Los estudios muestran el inherente problema en la cuantificación de mezclas de polímeros por MALDI ^[69]. Algunos de los problemas asociados con las mediciones de peso molecular promedio de muestras con polidispersidades anchas pueden ser arreglados usando GPC para así simplificar las muestras antes del análisis por MALDI. También existen trabajos para corregir el espectro de masas MALDI de muestras con polidispersidades anchas para obtener pesos moleculares promedio más exactos.

La técnica de MALDI fue desarrollada por Schreimer y su colaboradores para medir los pesos moleculares promedios de polímeros con masas elevadas ^[70].



Figura # 31. Espectro de masas MALDI para tres muestras de PS con peso molecular nominal de (a) 330000, (b) 600000 y (c) 900000 u.

La figura 31 muestra un espectro de masas MALDI para un estándar de PS con PD estrecha, el cual tiene un peso molecular nominal de (A) 330000, (B) 600000 y (C)900000 u. Basándose

en sus técnicas e instrumentos, el grupo de trabajo de Schreimer estableció el record de los pesos moleculares más altos que han sido medidos por MALDI de polímeros. Ellos analizaron exitosamente un poliestireno de 1.5 millones de u.

Debido a que las mediciones exactas de pesos moleculares para polímeros con masas altas por MALDI pueden ser bastante exigentes, por lo que se pueden medir pesos moleculares exactos para polímeros con masas pequeñas. Esta claro que los polímeros con masas pequeñas no son bien cationizados por MALDI. Ellos observaron que se requiren aproximadamente cinco unidades repetitivas antes de que los efectos de cationization-descriminacion relacionada no sean muy bien observados.

Con el fin de obtener una mayor exactitud en la determinación de pesos moleculares, Parees y su colaboradores mostraron que para un surfactante etoxilado con peso molecular muy bajo (S420), los datos cationicos de espectrometría de masas resultan en valores altos de peso molecular promedio debido a la pobre ionización de los oligomeros etoxilados menores.

Un método para evitar la discriminación cationizada para materiales de muy bajo peso molecular es la derivatización de los grupos terminales. Barry y sus colaboradores derivatizaron polímeros etoxilados con ftalato anhidro para incrementar significativamente la función oxígeno de los analitos. Las figuras 32 y 33 muestran las diferencias entre en espectro de masas MALDI para el etil-feno-etoxilato de bajo peso molecular antes (figura 32) y después (figura 33) de la derivatización.



Figura # 32 Espectro de masas MALDI de un octil fenil etoxilado de bajo peso molecular.



Figura # 33. Espectro de masas MALDI de un octil-fenil-etoxilado de bajo peso molecular derivatizado con anhídrido ftálico.

La derivatización del analito claramente provoca a mayor intensidad oligomeros etoxi de cadena corta. La diferencia puede ser vista en los cálculos de peso molecular promedio para las dos muestras, como puede observarse en la tabla 3.

Tabla # 3.	Datos de peso molecula	r vs derivatización	para	políimeros	etoxilados.
	-				

Muestra	Mn	Mw	PD
Antes de la			
derivatización	416	425	1.02
Después de la			
derivatización	332	338	1.02

La mayoría de los experimentos MALDI de polímeros son realizados con experimentos de tiempo de vuelo (TOF). No se han discutido muchos resultados con respecto a las mediciones exactas de peso molecular promedio; sin embargo, un caso que requiere una mención especial es el uso de un espectrómetro de masas con transformada de Fourier (FTMS). Los instrumentos FTMS tienen la ventaja de una resolución de masa muy alta, pero se debe tener cuidado con las mediciones de peso molecular promedio de polímeros.

61

Wilkins y sus colaboradores mostraron que el instrumento FTMS puede mostrar un efecto de tiempo de vuelo durante la transposición del ión. La figura 34 muestra el efecto del cambio de tiempo a la salida de la trampa en la aparente distribución de peso molecular de una muestra de PBD 1350.



Figura # 34. Espectro de masas MALDI-FTMS de hidroxil terminated PBD 1350.

El efecto TOF en la distribución de peso molecular puede ser reducido adquiriendo y combinando espectros con diferentes tiempos de retención, o por implementación de una celda analizadora cilíndrica abierta al final.

2.14.6 Determinación de grupos terminales

Ya que la mayoría de la masa en un polímero típico esta compuesta de una unidades repetitivas, la estructura química de los grupos terminales pueden ser muy importantes para la determinación de las propiedades de cualquier material polimérico. La determinación del grupo terminal puede ser vital para el entendimiento de la estructura química del polímero. El espectro de masas MALDI del polímero puede ser usado para determinar la masa del grupo terminal del oligómero si se adquiere a una resolución de masa suficiente. Muchos de los

experimentos nombrados en la tabla 2 usaron los datos de los espectros de masas para caracterizar los grupos terminales oligómericos. El desarrollo de espectrómetros de masas con resoluciones de masa más altas para MALDI han desarrollado grandemente la habilidad para caracterizar los grupos terminales oligomericos. La extracción retrasada, ha sido la técnica clave para desarrollar el mejoramiento de la resolución de masa de los instrumentos TOF comúnmente usados para MALDI ^[71]. Whittal y sus colaboradores mostraron el efecto de la extracción retrasada en el espectro de masas de PEG 15000 en la figura 35.



Figura # 35. Espectro de masas MALDI de PEG 15000 (a) extracción continua con HABA, (b) extracción retrasada con DHB, (c) extracción retrasada con IAA, (d) extracción retrasada con HABA.

En la figura 35, las lineas A y D son adquiridas en el modo lineal con ácido benzoico 2-(4hidroxifenilazo) (HABA) como la matriz. Los oligómeros individuales son resueltos con la extracción retrasada.

Maloney y sus colaboradores usaron el espectro de masas MALDI para determinar los grupos terminales de PMMA producidos a partir de una gran variedad de diferentes métodos sintéticos. Jackson y sus colaboradores también emplearon la técnica MALDI para determinar los grupos terminales de una gran variedad de diferentes muestras de PMMA. La figura 36 muestra un espectro de MALDI y la expansión de una de las muestras.


Figura # 36. Espectro de masas MALDI de una muestra de PMMA con tres diferentes grupos terminales.

La resolución de estos experimentos fue suficiente para identificar las masas de ocho diferentes grupos terminales en muestras de PMMA. Por medio de un único experimento de MS se puede medir la masa residual después de que se tiene el total dela masa de las unidades repetitivas.

Sin otra información, como el conocimiento de síntesis o de datos espectroscópicos (como NMR, IR o XPS) indicando la funcionalidad química, los datos del espectro de masas no pueden especificar la estructura química de los grupos terminales. Se pueden determinar las estructuras químicas en conjunto con espectroscopia NMR.

Montaudo y sus colaboradores emplearon espectrometría de masas MALDI para caracterizar los grupos terminales de polímeros Nylon 6 siguiendo una degradación selectiva bajo diferentes condiciones ^[72]. La figura 37 muestra un ejemplo de este trabajo con una muestra de Nylon 6 la cual se hizo reaccionar con ácido adipico.



Figura # 37. Espectro de masas MALDI de Nylon 6 que reacciono con ácido adipico. Las expansiones muestran las siete diferentes especies identificadas.

En la figura 37, se observan especies cíclicas y oligomeros con grupos terminales ácido/ácido y ácido/amina.

2.14.7. Análisis de copolímeros

La mayoría de los trabajos acerca de MALDI de polímeros realizados hasta la fecha han sido realizados en homopolímeros, materiales formados por una sola especie de monómero.

Los materiales formados de dos ó mas especies monómericas son llamados co-polímeros. Existen pocos trabajos de MALDI realizados en copolímeros debido a los problemas en el desarrollo de buenos métodos para la preparación de las muestras. Los diferentes componentes de un co-polímeros deben de ser solubles para crear una buena muestra para MALDI. La técnica MALDI ha empezado a ser desarrollada para analizar co-polímeros en conjunto con otras técnicas analíticas, como GPC, NMR y otros métodos de espectroscopia de masas. Generalmente los datos de MALDI son muy complejos ó muy ambiguos debido a las múltiples asignaciones para concluir específicamente el material con solo los datos del espectro de masas. La figura 38 muestra el espectro de masas de un co-polímero surfactante común formado por un monómero de unidades repetitivas de óxido de etileno (EO) y óxido de propileno (PO) obtenido por van Rooij y sus colaboradores en un instrumento FTMS ^[73].



Figura # 38. Espectro de masas MALDI obtenido en un instrumento FTMS de un co-polímero común EO/PO. La expansión muestra una serie de iones de co-polímeros asignados.

La expansión en la figura 38 muestra la asignación del ión como el número de segmentos EO, y el número de segmentos PO para los iones isotopicos. Este es el tipo más sencillo de copolímeros analizados por MALDI debido a la similitud en solubilidad y la estabilidad de los cationes entre la unidades de EO y PO. MALDI también ha sido aplicada para caracterizar la estructura química de silicones surfactantes ^[74].

Yoshida y sus colaboradores emplearon MALDI para caracterizar EO o PDMS perfluoroalquil modificado. Los surfactantes PDMS modificados son importantes componentes de muchos productos en la industria de los cosméticos. Las estructuras básicas de los polímeros PDMS modificados se muestran en la figura 39.



Figura # 39. Estructura de dos co-polímeros de silicos modificados con R1=EO o R2=cadenas de perfluoroalquil.

En la figura 40 se muestra un ejemplo de un espectro de masas MALDI de un PDMS EO modificado.



Figura # 40. Espectro de masas MALDI de un copolímero de silicon modificado con EO.

La masa superior en la figura 40 es bastante compleja, con muchos iones cerca de la masa. El espectro de masas inferior es una expansión de una región del espectro de masas superior. Este muestra la asignación basada en la estructura mostrada en la figura 39. Los picos son etiquetados por masa y con el número de cada tipo de unidad repetitiva (m, n, b), donde b = a x n. Algunos de los iones pueden ser asignados a más de una posible combinación de unidades monoméricas. En este caso los datos de ¹H NMR fueron usados para ayudar a seleccionar la asignación del ión más probable.

Estudios comprensivos de estructuras químicas de co-polímeros dibloque metilestirenoestireno y metilestireno-vinilpiridina fueron recientemente completados por Wilczek-Vera y sus colaboradores. Estos experimentos fueron realizados usando un método referido como un método de análisis de copolímeros (MAC) MALDI. La figura 41 muestra un espectro de masas MALDI del copolímero metilestireno-vinilpiridina de complejidad creciente.



Figura # 41. Espectro de masas MALDI de poli(α-metilestireno)-b-poli(4-vinil piridina) co-polímeros de complejidad creciente.

Los datos son asignados usando el patrón de picos agrupados y una prueba de hipótesis de acoplamiento aleatorio estático. Una vez que se ha producido una asignación consistente, el dato puede ser trazado como una superficie tridimensional de las distribuciones largas de los bloques en cada muestra. La figura 42 muestra cuatro conjuntos.



Figura # 42. Distribución experimental normalizada de unidades de poli(α-metilestireno)-b-poli(4-vinil piridina) co-polímeros de complejidad creciente.

En un ejemplo de un polímero más complejo, Montaudo y sus colaboradores usaron MALDI para caracterizar a un copolímero de tres componentes, o terpolímero, compuesto de poli(butilen suxinato), poli(butilen adipato), y poli(butilen sebactato).

2.14.8. Aplicaciones de la síntesis de productos

Como los métodos MALDI de polímeros se ha ido mejorando, esta técnica se ha empezado a aplicar para monitorear y caracterizar reacciones de polimerización. Los datos de MALDI pueden ser usados para caracterizar las estructuras químicas del producto y los coeficientes de las polimerizaciones. Wang y sus colaboradores caracterizaron oligomeros macrociclicos ariléter-cetona usando MALDI y GPC. La polimerización es hábil para hacer reaccionar bisfenol A con 1,2-bis(4-fluorobenzil)-benceno bajo condiciones de dilución altas. La figura 43 muestra un espectro de masas MALDI de un producto oligómerico cíclico. El espectro muestra una serie de oligómeros de bajo peso molecular y la estructura asignada. Dos diferentes iones son observados para cada oligómero. El pico extra es asignado como $(M - O)^+$, el resultado de una ciclación intramolecular que forma un isobenzofurano.



Figura # 43. Espectro de masas MALDI de oligómeros ciclo aril éter cetona.

Schweer y sus colaboradores usaron los datos de MALDI y GPC para medir los coeficientes de propagación de los radicales libres para polimerizaciones pulsadas por láser para metilmetacrialto y estireno. La clave para esto experimentos es medir exactamente el peso molecular promedio. El uso de MALDI y GPC permite a los autores el uso de ambas técnicas. Estos experimentos muestran que MALDI proporciona la ventaja de una escala de masa absoluta y la ausencia de errores comparado con GPC en la determinación de peso molecular promedio para las muestras de polidispersidades estrechas preparadas en este estudio.

2.14.9. Láser MALDI

La ionización láser de sólidos orgánicos fue investigada por Munna y Vastola ^[75] a finales de 1960 y principios de 1970, pero la mayoría de las primeras investigaciones en ionización láser fueron enfocadas en muestras inorgánicas. Los primeros trabajos fueron revisados por Conzemius y Capellen. Durante la siguiente década, algunos grupos enfocaron sus investigaciones en el mejoramiento de métodos para aplicar el láser a la ionización de muestras orgánicas, pero estas técnicas no fueron muy aplicadas hasta el avance logrado por Karas y Hillenkampo en 1988. Introduciendo moléculas bio-orgánicas grandes en una matriz

conveniente, la cual absorbe fuertemente la radiación de un láser UV, demostraron que cada uno de los iones moleculares cargados con masas más grandes de aproximadamente 100000 pueden ser absorbidos eficientemente y medidos en espectrómetro de masas de tiempo de vuelo. Un ejemplo de uno de los espectro de una publicación original se muestra en la figura 44.



Figura # 44 Espectro de masas MALDI de β-D-galactosidasa en el rango molecular aparente.

Este ejemplo de β -D-glactosidasa, con una masa molecular de 116900, había sido el ión molecular íntegro más grande que se había observado. Esta técnica matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) ha sido rápidamente desarrollada para ser uno de los métodos predominantes para analizar moléculas grandes no volátiles. Puesto que los iones son producidos empleando un láser pulsante en tiempos cortos, la técnica esta particularmente bien situada para análisis de tiempo de vuelo, pero también es usada con bastante éxito con FT-ICR y con trampa de iones de cuadrupolo.

2.14.10. IR MALDI

El uso del láser infrarrojo (IR) dentro del láser UV tradicionalmente empleado en MALDI ha sido estudiado por varios grupos de investigación. Ha sido demostrado que aproximadamente el mismo funcionamiento puede ser obtenido con fuentes de láser con respecto a la resolución de masas, exactitud de masa y con la sensibilidad analíticamente útil ^[76]. Las principales diferencias observadas son que el IR generalmente da menos fragmentación de moléculas

grandes, pero muchas muestras son consumidas por disparo del láser. La eficiencia de la ionización es generalmente baja en algunos niveles de magnitud con IR que con UV, pero la sensibilidad es generalmente limitada por ruidos químicos de la matriz y de otros impurezas, y muchas pequeñas fracciones de la muestra son desorbidas en mediciones típicas de UV. El láser IR penetra profundamente dentro de la matriz y permite que las muestras de geles y membranas sean analizadas exitosamente. Por otro lado, UV MALDI detecta muestras que se encuentran presentes cerca o en la superficie y no detecta moléculas que se encuentran más profundamente. La mayor limitación de el uso del láser IR en MALDI es que los láser disponibles son costos y son más difíciles de utilizar rutinariamente.

2.14.11. Extracción retrasada

La técnica electrospray fue aceptado más rápidamente que MALDI para muchas rutinas aplicadas anteriormente, porque esta fue adaptada más rápidamente al cuadrupolo y a los analizadores de campo magnético que se encontraban en uso. El haz del ion pulsante producido por MALDI fue compatible con técnicas de tiempo de vuelo (TOF), pero la resolución y la precisión de masas que se obtuvieron con MALDI-TOF en moléculas grande no fue tan buena como la obtenida con electrospray sobre cuadrupolos o analizadores magnéticos. El uso de instrumentos reflejantes TOF, como los descritos originalmente por Marin, mejoran la resultados para péptidos y otras moléculas pequeñas, pero lo resolución y la exactitud para oligonucleotidos y proteínas fue similar para los dos analizadores, los reflejantes y los lineales, y claramente inferior para los obtenidos por electrospray. Los primeros estudios muestran que los iones producidos por MALDI revelan una velocidad de distribución demasiado amplia y que la velocidad inicial de los iones desorbidos es casi independiente de la masa. También, cuando la desorción ocurre en un campo eléctrico muy fuerte, presumiblemente la energía se pierde debido a la colisiones con la pluma neutra. En los primeros trabajos realizados, Wily y McLaren [77] describen dos campos, una fuente de iones pulsantes para analizadores de tiempo de vuelo que proporcionan una corrección de primer orden para el sitio de distribución inicial de iones. También describieron una técnica, la cual ellos llamaron "time-lag energy focusing", para corregir las velocidades iniciales de distribución. Los iones son producidos en una región de campo libre, y el campo acelerado es

encendido por la aplicación de un pulso rápido a un tiempo aplazado. La correcta elección del tiempo de retraso y el campo de aceleración permite que los iones iniciales lentos reciban suficiente energía adicional para poder atrapar los iones iniciales en el detector iónico. En MALDI, los iones son producidos por una superficie casi lisa; de esto modo, no se requiere el campo enfocado, pero la velocidad de enfocamiento mejora los resultados. El mejoramiento en los resultados es causado por las extracciones retrasada. Esto se ha demostrado en un gran número de laboratorios y ahora es usado para la mayoría de las aplicaciones analíticas de MALDI. Un ejemplo del poder de resolución posiblemente presentado por MALDI-TOF se muestra en la figura 45.



Figura # 45. Región del ion molecular de un espectro de masas MALDI-TOF de dos proteínas pequeñas

Las mediciones exactas de la masa con calibraciones internas, es generalmente mejor que 10 ppm para cada espectro. El más alto poder de resolución puede ser obtenido a bajas realaciones de m/z por FT-ICR y doble enfocamiento magnético de espectroscopia de masas, pero para iones cargados solos producidos por MALDI, los resultados de la Figura 12 representan el estado actual de la destreza para cada técnica de espectroscopia de masas disponible.

III. ESTADO DEL ARTE

6

Dentro del área de caracterización y análisis de compuestos orgánicos de baja volátilidad, entre los cuales podemos mencionar oligómeros y polímeros de muy diversa indole, muestras biológicas como proteínas, oligopéptidos, caracterización de virus y elucidación de la estructura del DNA, podemos mencionar que el estado actual del arte se encuentra de la siguiente manera:

• Con respecto a las técnicas de análisis de superficies.

En la actualidad es uno de los tópicos donde la caracterización del peso molecular es importante, ya que muchas de las propiedades que se desean están influenciadas por el peso molecular, este tipo de compuestos tienen aplicaciones tanto en compuestos electrónicos, medicamentos de liberación controlada, productos para agricultura, implementos de alta tecnología, preservación de alimentos, formación de hologramas y modificación de superficies con fines decorativos, los métodos analíticos actuales implican el uso de espectrometría de masas por ionización/desorción láser asistida por una matriz empleando lásers en la región infrarroja, seguido por la desorción de superficies, desorción láser, impacto de partícula de alta energía e impacto de partícula de baja energía.

Dentro de estos equipos disponibles históricamente se puede decir que el impacto de partícula de alta energía y de baja energía surgieron en la época de los 80's y han sido rápidamente desplazados por la técnica MALDI, aunque propiamente hablando el análisis de MALDI para superficies se encuentra un poco limitado, ya que la preparación de la matriz esta restringida a la modificación superficial de la misma por el compuesto cationizante adecuado.

Una técnica no destructiva para analizar superficies es la emisión de partículas B de un compuesto radioactivo de ²⁵²Cf, teniendo como principal limitante el uso de material radioactivo y que estos equipos no se encuentran disponibles tan fácilmente.

Con respecto a análisis de compuestos biológicos la desorción láser aparenta seguir teniendo buena aceptación aunque existes cada vez más reportes de que se encuentra desplazado por la técnica de MALDI.

La técnica de impacto de partículas con superficies líquidas requiere del uso de polietilenglicol ó glicerina para poder transferir la energía a la superficie que se desea analizar, sin embargo esto provoca espectros de masas complejos, por lo que se prefiere emplear otras técnicas de análisis.

Con respecto al análisis de compuestos de baja volátilidad.

Existen diversos equipos en los cuales se pueden analizar de muy diversas formas los compuestos de baja volatilidad. Uno de los conceptos más sencillos es la degradación termoquímica (Pirolisis), dentro de los cuales existe la pirolisis directa, donde el pirolizado es intoducido directamente a un equipo de masas, sin embargo los espectros generados son complejos, por lo que se optó por tener interfases tanto con equipos de termogravimetria, en donde se pueden tener relaciones cuantitativas de los productos de degradación con respecto al espectro de masas. La otra opción es la interfase de un pirolizador-CG-MS, en dónde el pirolizado se introduce directamente a un cromatógrafo de gases, donde se obtiene un pirograma, es decir el total de los compuestos eluidos por cromatografía de gases y que son introducidos al espectrómetro de masas. Con este arreglo es posible identificar compuestos individuales gracias a su espectro de masas, pudiendo establecer las relaciones químicas estructurales de los materiales poliméricos.

Uno de los avances más recientes son los pirolizadores de campo, en donde el material no volátil se degrada en condiciones más suaves, es decir a menor temperatura. Aunque la pirolisis de los polímeros pueden generar información valiosa acerca de su estructura química, la información relacionada con el peso molecular y distribución de pesos moleculares es limitada.

Una de las técnicas que ha dado resultado en la elucidación de estructura química y distribución de pesos moleculares es el bombardeo rápido de átomos (FAB), el cual fue desplazado por la desorción láser, debido a que la ionización es más agresiva y por ende se obtiene una mayor cantidad de iones volátiles, sin embargo, esta técnica fue rápidamente desplazada por MALDI.

La técnica de MALDI es una técnica relativamente nueva en el tratamiento de muestras de baja volatilidad, sin embargo, su entendimiento y aplicación crecen rápidamente. Se ha logrado establecer el mecanismo de ionización ,transferencia de protón, catión y captura de electrones, lo cual es básico para poder establecer mejoras en la técnica. Recientemente se publicó un compendio acerca del proceso de desorción en muy diversos sustratos por la técnica de MALDI, por lo que podemos suponer, que MALDI esta pasando a ser una técnica consolidada para el análisis de compuestos de baja volátilidad.

De las principales complicaciones de esta técnica es el tratamiento de la muestra, ya que es compleja y en algunos de los casos se puede decir "artesanal", sin embargo debido a la enorme cantidad de información que se ha generado, en un futuro próximo muy cercano se contará con las suficientes bases como para establecer que este problema sea solventado en forma adecuada. Dentro del análisis de polímeros MALDI tiene una gran limitante que es la ionización de compuestos de muy alto peso molecular, así como que es limitada para compuestos con altas polidispersidades, se sigue investigando en el proceso de cationización como una probable solución a este problema.

Uno de los métodos más recientes y que esta ofreciendo enormes facilidades, debido a su gran capacidad de acoplamiento a otras técnicas es la ionización por medio de electrospray, ya que fácilmente se puede acoplar a cromatografía de líquidos, cromatografía de permeación en gel, donde el método de ionización es fácil y de alta eficiencia, por lo que se espera que en un futuro próximo sea una de las técnicas preferidas para el análisis de compuestos de baja volátilidad.

IV. CONCLUSIONES

Para los compuestos de baja volatilidad se tienen técnicas de análisis como pirolisis acoplado a espectroscopia de masas, pirolisis de campo, termogravimetria GC-MS y pirolisis GC-MS como las técnicas más simples y de fácil preparación de muestra que generan información valiosa con respecto a la estructura química del material evaluado. Por estas técnicas se pueden evaluar tanto materiales poliméricos como co-polímeros con gran certeza en el dato generado.

La técnica de MALDI se esta consolidada como una técnica "universal" en la generación de iones volátiles a partir de compuestos de baja volátilidad, se cuenta con extensa información acerca de los tipos de matrices, manejo de datos y asignación de espectros de masas que la hacen ser una técnica en franca madurez.

La técnica de electrospray es una de las técnicas más versátiles y que es fácilmente acoplada a diversas técnicas, la principal limitante es la solubilidad del compuesto y su probable elusión por cromatografía de líquidos.

V. <u>REFERENCIAS</u>

- 1. Macfarlane, R. D.; Torgerson, D. F. Science 1976, 191, 920.
- 2. Macfarlane, R. D.; McNeal, C. J.; Hunt, J. E. Adv. Mass Spectrom. 1980, 8A, 349.
- 3. McNeal, C. J.; Mcfarlane, R. D. J. Am. Chem .Soc. 1981, 103, 1609.
- 4. Stadler, M. J. Am. Lab 2000, Jan, 7-8.
- 5. Dravineks, A.; O'Donnell, A. J. J. Agric. Fodd Chem, 1971, 19, 1049-1056.
- 6. Maeno, S.; Eddy, C. L.; Rodríguez, P. A. J. Chromatogr., A 1999, 849, 217-224.
- Parees, D. M.; Hanton, S. D.; Cornelio Clark, P. A.; Willcox, D. A. J. Am. Soc. Mass Spectrom, 1998, 9, 282-291.
- Richter, F.; Schneider, S.: Distler, F.; Schubert, R. Polym. Degrad Stan. 1999, 65, 315-327.
- 9. Minard, R. D.; Hatcher, P. G.; Gourley, R. C.; Matthew, C. N. Origin Life Evol Biosphere 1998, 28, 461-473.
- 10. Arthur, C.L.: Pawliszyn, J. Anal. Chem. 1990, 62, 2145.
- 11. Wampler, T. P.; Zawdony, C. P. Am. Lab. 1999, Sept, 30.
- 12. Perng, L. H.; Tsai, C. J.; Ling. Y. C. Polymer 1999, 40, 7321-7329.
- 13. Lehre, R. S.; Rollinson, M; Dadvand, N.; Parson, I. W. Polym. Degrad. Stan. 1999, 66, 221-231.
- Dadvand, N.; Lehrle, P. S.; Parsons, I. W.; Rollinson, M. Polym. Degrad. Stab. 1999, 66, 247-255.
- 15. Carroccio, S.; Puglisi, C.; Montaudo, G. Macromol. Chem. Phys. **1999**, 200, 2345-2355.
- Zoller, D. L.; Sums, S. T.; Johnston, M. V.; Hatfield, G. R.; Qian, K. Anal. Chem. 1999, 71, 866-872.
- 17. Soller, D. L.; Johnston, M. V. Anal. Chem. 1997, 39, 115-127.
- 18. Li, J.; Xu, H.; Shi, J.; Li, C.; Bao, C. Anal. Chim. Acta 1999, 402, 311-318.
- 19. Lattimer, R. P.; Polce, M. J.; Wesdemiotios, C. J. Anal. Appl. Yrol, 1998, 48, 1-15.
- 20. Barton, Z.; Kemp, T. J.; Buzy, A.; Jennings, K. R. Polymer 1995, 36, 4927-4933.
- 21. Iribarne, J. V.; Thomson, B. A. J. Chem. Phys. 1976, 64, 2287.
- 22. Mann, M.; Meng, C. K.; Fenn, J. B. Proceeding of 36th Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, San Franciso, **1988**; pp 1207-08.

- 23. Iribanrne, J. V.; Thomson, B. A. J. Chem. Phys. 1979, 71, 4451.
- 24. Wilm, M.; Mann, M. Anal. Chem 1996, 68, 1-8.
- 25. These. A.; Reemtsma. T. Anal. Chem, 2003, 6275-6281.
- 26. Yalcin. T.; Gabryelski. W.; Li. L.; Anal. Chem. 2000, 72 (16), 3847-3852.
- Svedberg. M.; Petterson. A.; Nilsson. S.; Bergquist. J.; Nyhol. L. Anal. Chem, 2003, 75 (15),3934-3940.
- Harrison, J. J.; Mijares, C. M.; Chemg, M. T.; Hudson, J. Macromolecules, 2002, 35 (7), 2494-2500.
- Moore. R. E.; Licklider L.; Schumann. D.; Lee T. Anal. Chem, 1998, 70 (23), 4879-4884.
- 30. Freudemann. T.; Brocke. A.; Bayer. E. Anal Chem, 2001, 73 (11), 2587-2593.
- 31. Beckey, H. D. Int. J. Mass. Spectrome. Ion Phus. 1969, 2, 500.
- 32. Liebl, H. Anal. Chem. 1974, 46, 22A.
- 33. Benninghoven, A.; Sichtermann, W. Anal. Chem. 1978, 50, 1180-1184.
- 34. Grade, H.; Winograd, N.; Cooks, R. G. J. Am. Chem. Soc. 1977, 99, 7725.
- 35. Ens, W.; Standing, K. G.; Westmore, J. B.; Oglivie, K. K.; Nemer, M. J. Anal. Chem. 1982, 54, 960-966.
- Barber, M.; Brodoli, R. S.: Sedgwick, R. D.; Tyler, A. N.; Whalley, E. T. Biomed. Mass Spectrom. 1981, 8, 337; 8, 492.
- Barber, M.; Bordoli. R. S.; Elliott, G. J.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A. N. Anal. Chem. 1982, 54, 645A-657A.
- 38. Rinehart, K. L., Jr. Science 1983, 218, 254-260.
- 39. Caprioli, R. M.; Fan, T.; Cottrell, J. S. Anal. Chem, 1986, 58, 2949.
- 40. Capriolo, R. M.; Fan, T. Rapid Común. Mass. Spectro, 1987, 1, 1058.
- 41. Prokai, L. Field Desorption Mass Spectrometry, Dekker; New York, 1990.
- 42. Lattimer, R. P.; Harmon, D. J.; Welch, K. R. Anal. Chem. 1979, 51, 1293.
- 43. Barber, M.; Bordoli, R.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A. N. J. J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1981, 325.
- 44. Jackson, A. T.; Jennings, K. R.; Scriven, J. H. Rapid Commun. Mass. Spectrom. 1996, 10, 1449-1458.
- 45. Coburn, J. W.; Eckstein, E. W.; Kay, E. J. J. Vac. Sci. Technol. 1975, 12, 151-154.

- 46. Shick, C. R.; DePalma, P. A..; Marcus, R. K. Anal. Chem. 1996, 68, 2113-2121.
- 47. <u>www.cetac.com</u>
- 48. Smith, A. B.; Strongin, R. M.; Brard, L.; Furst, G. T.; Romanow, W. J.; Owend, K. G.; Goldschmidt, R. J.; King, R. C. J.Am. Chem. Soc. **1995**, 117, 5492-5502.
- 49. Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. Rapid Communm. Mass Spectrom. **1988**, 2, 151.
- 50. Karas, M.; Hillenkampo. F. Anal. Chem. 1988, 60, 2299.
- 51. Bahr, U.; Deppe, A.; Kara, M.; Hilenkamp, F.; Giessman, U. Anal. Chem. 1992, 64, 2866.
- 52. Parees, D. M.; Hanton, S. D.; Cornelio Clark, P. A.; Willcox, D. A. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **1998**, 9, 282-291.
- 53. Hanton, S. D.: Cornelio Clark, P. A.; Owens, K. G. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1999, 10,104-111.
- 54. Kassis, C. M.; DeSimone, J. M.; Limton, R. W.; Lange, G. W.; Friedman, R. M. 1997, 11, 1462-1466.
- 55. Liu, J.; Loewe, R. S.; McCullough, R. D. Macromolecules 1999, 32, 5777-5785.
- 56. Yalcin, T.; Dai, Y.; Li, L. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1998, 9, 1303-1310.
- 57. King, R. C.; Goldschmidt, R. J.; Xiong, Y.; Owens, K. G. 43rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Atlanta, GA, **1995**; p 689.
- 58. Zhigilei, L. V.; Garrison, B. J. Appl. Phys. Let. 1999, 74, 1341.
- 59. Mowry, C.; Johnston, M. Rapid Comm. Mass Spectrom. 1993, 7, 569.
- 60. Quist, A. P.,; Huth-Fehre, T.; Sunqvist, B. U. R. Rapid Commun. Mass Spectrom. 1994, 8, 149.
- 61. Linnemayr, K.; Vana, P.; Allmaier, G. Rapid Commun. Mass Spectrom. **1998**, 12, 1344-1350.
- 62. Wong, C. K. L.; So, M. P.; Chan, T.-W. D. Eur Mass Spectrom. 1998, 4, 223-232.
- 63. Wong, C. K. L.; Chan, T.-W. D. Rapid Commun. Mass Spectrom. 1997, 11, 513-519.
- Marino, T.; Russo, N.; Sicilia, E. Selected Topics and Mass Spectrometry in the Biomolecular Science; Caprioli, R. M., Ed.; Kluwer Academic: Netherlands, 1997; pp 163-179.
- 65. Zhu, H.; Yalcin, T.; Li, L. J. Am. Soc Mass Spectrom. 1998, 9, 275-281.

- 66. Guttman, C. M.; Blair, W. R.; Danis, P. O. ANTEC 1998, 2109-2113.
- 67. Wetzel, S. J.; Guttman, C. M.; Girard, J. E. Proceedings of the 47th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Dallas, Tx, **1999**.
- 68. Montaudo, G.; Montaudo, M. S.: Puglisi, C.; Samperi, F. Rapid Común. Mass Spectrom. **1995**, 9, 453-460.
- 69. Goldschmidt, R. J. Ph.D.. Thesis, Drexel University, Philadelphia, PA, 1998.
- 70. Schriemer, D. D.; Li, L. Anal. Chem. 1996, 68, 2721-2725.
- 71. Colby, S. M.; King, T. B.; Reilly, J. P. Rapid Commun. Mass Spectrom. **1994**, *8*, 865-868.
- 72. Montaudo, G.; Montaudo, M. S.; Puglisi, C.; Samperi, F. J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem. 1996, 34, 439-447.
- 73. Van Rooij, G. J.; Duursma, M. C.; de Koster, C. G.; Heeren, R. M. A.; Boon, J. J.; Wijnand Schuyl, P. J.: van der Hage, E. R. E. Anal. Chem. **1998**, 70, 843-850.
- 74. Servaty, S.; Koehler, W.; Meyer, W. H.; Rosenauer, C.; Spickermann, J.; Raeder, H. J.: Wegne, g.; Weier, A. Macromolecules. 1998, 31, 2468-2474.
- 75. Mumma, R. O.; Vastola, R. J. Org. Mass Spectrom. 1972, 6, 1373-1376.
- 76. Cramer, R.; Burlingame, A. L. Mass Spectrometry in Biology and Medicine; Burlingame, A.L., Carr, S.A., Baldwin, M. A., Eds.; Humana: Totowa, NJ, 2000; P 289.
- 77. Wiley, W.C.; McLaren, I. H. Rev. Sci. Instrum. 1953, 26, 1150.
- 78. Knochemuss. R.; Zenobi. R.; Chem. Rev. 2003, 103, 441-452.
- 79. Dreisewerd. K. Chem Rev, 2003, 103, 395-425.