

La espectrometría de masas

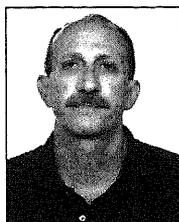
Nacimiento, desarrollo, evolución y aplicaciones modernas

Resumen

La espectrometría de masas es una técnica espectroscópica que permite la determinación funcional y estructural de cualquier tipo de molécula. Hoy en día, y debido a los últimos avances conseguidos, la espectrometría de masas (EM) ocupa una posición de privilegio entre las técnicas espectroscópicas debido a sus extraordinarias características como son una elevadísima sensibilidad, unos límites de detección muy bajos, y sobre todo a la enorme diversidad de aplicaciones que van desde la física de iones en fase gaseosa a la geocronología, pasando por estudios de reacciones ion-molécula, química forense, reconocimiento quiral, secuenciación de aminoácidos en péptidos y proteínas, detección precoz de enfermedades y trastornos metabólicos y determinación de parámetros termodinámicos entre otras muchas aplicaciones. A lo largo de este artículo pasaremos revista al nacimiento y desarrollo de la EM, a su evolución histórica, a la aparición de las nuevas fuentes de ionización lo que ha supuesto una auténtica revolución, y por último haremos referencia a las modernas aplicaciones de esta técnica.

Nacimiento de la espectrometría de masas

Joseph John Thomson (1856-1940) demostró experimentalmente la existencia del electrón al conseguir mediante métodos de deflexión con campos eléctricos y magnéticos medir la relación carga/masa de dicha partícula. Por dichos trabajos recibió el Premio Nobel



Roberto Martínez Alvarez

Departamento de Química Orgánica,
Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad Complutense de Madrid,
E-28040 Madrid

de Física en 1906. Aplicando métodos similares a los empleados para el electrón, pero en este caso estudiando los rayos positivos o "Kanalstrahlen" (así llamados por su descubridor Goldstein en 1886) estableció los fundamentos de la espectrometría de masas. Para ello, introdujo en un recipiente diferentes

gases a baja presión y mediante una descarga eléctrica generaba unos rayos que eran desviados por un campo eléctrico y otro magnético, obligándolos a describir una serie de parábolas que podían observarse mediante el revelado de unas placas fotográficas donde impactaban los rayos desviados. De las parábolas se podía calcular perfectamente la relación e/m de las partículas implicadas. En la figura 1 podemos observar el primer espectrómetro de masas construido por Thomson en 1897. Este investigador llegó a la conclusión de que cada parábola correspondía a un gas diferente en el tubo de descarga por lo cual el método podría servir como análisis químico. Al mismo tiempo, estableció que una señal desconocida en un espectro debería corresponder a una sustancia cuyo peso atómico o molecular podía ser calculado rápidamente lo que le llevó a sugerir ya entonces el enorme potencial analítico

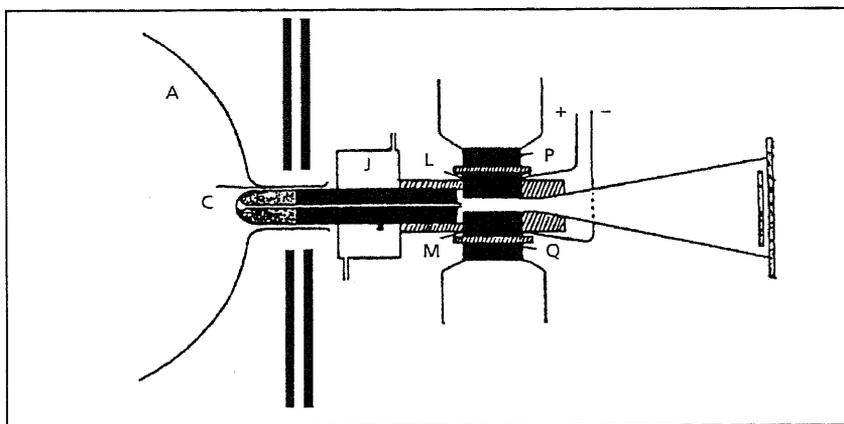


Figura 1. Aparato para el estudio de los rayos positivos construido por Thomson en 1897. El recipiente A contiene un gas a presión reducida y C es el cátodo para producir la descarga eléctrica. Los iones producidos atraviesan las placas L y M de un campo eléctrico y los polos P y Q de un electroimán.

de esta técnica. Mediante experimentos llevados a cabo con muy largos tiempos de exposición, observó señales de especies presentes en muy baja concentración, que no hubieran sido detectadas de otra forma. Además, y dado que no había interferencias entre las parábolas, el método se podía aplicar tanto a muestras puras como a mezclas. Finalmente, y puesto que las especies que se formaban en el tubo de descarga eran detectadas casi al mismo tiempo que su formación, esta técnica posibilitaba el estudio de especies de vida corta.

De esta forma y aprovechando que en el Cavendish Laboratory de la Universidad de Cambridge, donde Thomson trabajaba, se había construido un aparato para la obtención de nitrógeno líquido a partir del aire, Thomson estudió con su primitivo espectrómetro de masas los gases residuales que resultaban de la producción de dicho gas licuado. Llegó a la conclusión de que la cantidad de muestra necesaria para sus experimentos era muy pequeña y que la presión del gas debía ser muy baja, menor de "una centésima parte de un milímetro de mercurio". Cuando estudió la descarga eléctrica en el gas neon, observó dos parábolas que correspondían a los pesos atómicos 20 y 22.¹ Ambas parábolas aparecían siempre junto con otra que correspondía a un peso atómico de 11. Thomson argumentó que la línea correspondiente al peso atómico 22 era debida a la especie NeH_2 , pues era sabido la dificultad en eliminar totalmente el hidrógeno presente, o bien que podría deberse al ion CO_2 con doble carga. Eliminado el dióxido de carbono del tubo de descarga observó que la línea 22 no desaparecía, lo que tampoco sucedía al disminuir la presión en el tubo de descarga evitando así indeseadas reacciones entre iones y moléculas no ionizadas. Se trataba de la primera observación de unos isótopos estables que se realizaba en la historia de la Química. En su libro "Recollections and Reflections" (1936), Thomson definía los isótopos como átomos de pesos diferentes pero de propiedades idénticas.

El trabajo pionero de Thomson fue continuado por uno de sus discípulos, Francis William Aston (1877-1945) que dedicó sus esfuerzos al descubrimiento de nuevos isótopos y a la medida de sus pesos atómicos.² Así, determinó la exis-

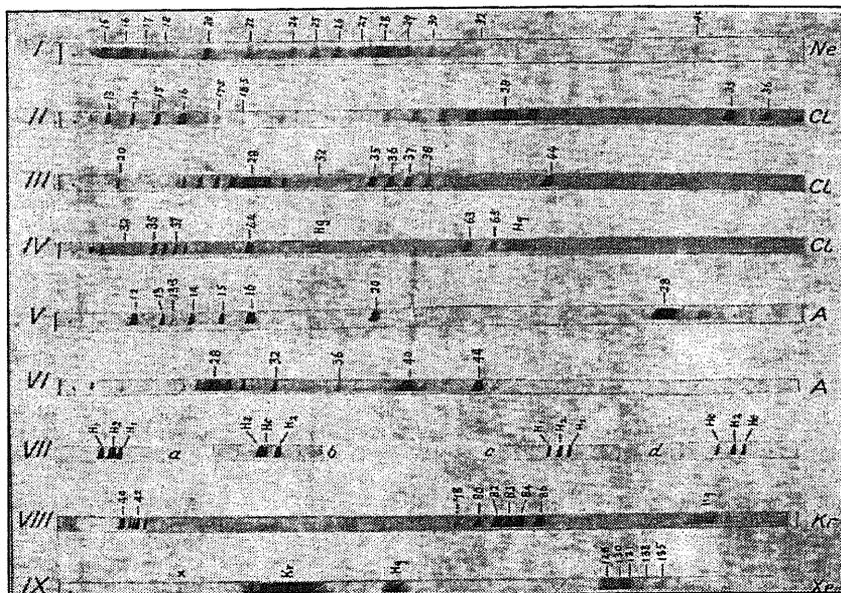


Figura 2. Espectros de masas realizados por Aston para el Ne, Cl, Ar, Kr y Xe.

tencia del ^{35}Cl y del ^{37}Cl midiendo sus respectivos pesos atómicos. Aston recibió el Premio Nobel de Química en 1922, siendo uno de los siete discípulos de Thomson que lograron dicha distinción. En la figura 2 podemos observar una serie de espectros de masas obtenidos por Aston del Ne, Cl, Ar, Kr y Xe.³ Obsérvese que en la mayoría de los espectros se observan las manchas correspondientes (los iones impactaban en placas fotográficas) a los pesos 28, 32 y 44 debidas a la presencia de N_2 , O_2 y CO_2 no totalmente eliminados del tubo de descarga. Como curiosidad, es de destacar la simbología química (A) usada para el argon.

Definiciones

Una vez descrito el nacimiento y los primeros pasos de la espectrometría de masas, es el momento de hacer un alto en el desarrollo histórico de la técnica, para definir una serie de términos que emplearemos a lo largo de este artículo. En primer lugar definiremos lo que se entiende por espectrometría de masas. Se trata de una técnica analítica mediante la cual una muestra es ionizada en una determinada fuente de ionización y los iones así formados (negativos o positivos) son separados mediante un analizador con objeto de determinar su relación masa/carga que se simboliza como m/z . Este proceso conduce a la obtención de un espectro de masas que no es otra cosa que la representación en

ejes cartesianos de la relación m/z (abscisas) frente a la intensidad o abundancia (frecuentemente normalizada para el ion más abundante en ordenadas) de todos los iones detectados en un determinado período de tiempo.

La unidad de masa atómica se simboliza por u y corresponde a $1.667 \times 10^{-27} \text{ Kg} \pm 0.59 \text{ ppm}$ tomando como referencia el isótopo 12 del carbono. Por ello, es más correcto hablar de masa atómica o molecular relativa. Si la carga de los iones se mide en cargas del electrón (1.6×10^{-19} culombios), y la masa de los iones en u, entonces la relación m/z se mide en Thomson. En ocasiones, y en lugar de emplear la notación correcta de u, es frecuente entre los espectrometristas hablar de Daltons (Da), aunque conviene señalar que no es una unidad del Sistema Internacional de Medidas.⁴⁻⁷

Desarrollo histórico: primera época

Los primeros espectrómetros de masas eran aparatos basados en el diseño original de Thomson (Figura 1). En 1918, Dempster desarrolló una nueva fuente de ionización conocida como fuente de impacto electrónico.⁸ Se trata de la fuente más extendida y usada en la EM. Consiste en una cámara donde se hace llegar la muestra previamente vaporizada (sea cual sea su estado de agregación inicial) y que posee un cátodo incandescente que emite electrones que son acelerados mediante una diferencia

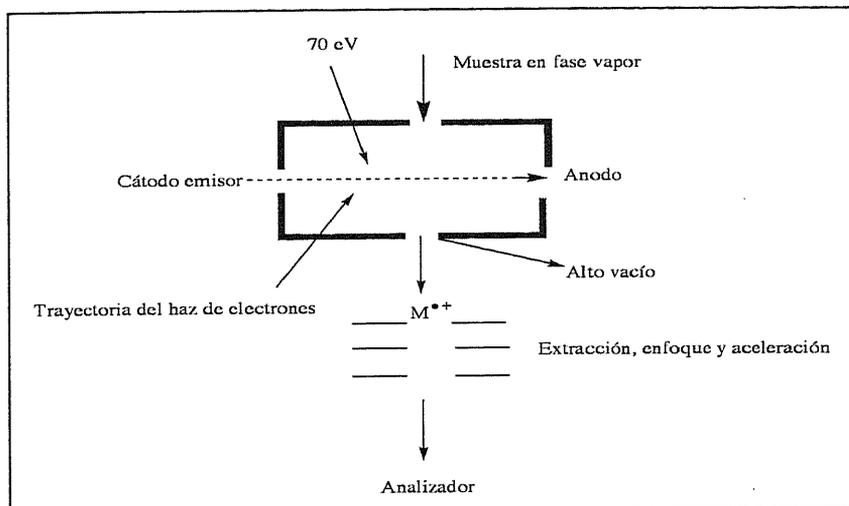


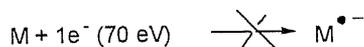
Figura 3. Esquema de una fuente de ionización por impacto electrónico

de potencial aplicada entre el cátodo y un ánodo colocado frente al emisor donde se produce la descarga electrónica (Figura 3).

Dicha diferencia de potencial define la energía de la corriente electrónica ionizante. En general la energía empleada de los electrones es de 70 eV (6753.971 KJ/mol), lo que corresponde a una longitud de onda (λ) de 1.4 Å para la onda asociada. Se ha comprobado que una energía de 70 eV corresponde a un máximo en el rendimiento de la ionización. Dicha energía es suficiente para arrancar un electrón a una molécula produciendo un catión radical. Hoy en día, la mayor parte de las colecciones o bibliotecas de espectros de masas por impacto electrónico, recogen éstos realizados a 70 eV con objeto de poder comparar espectros.

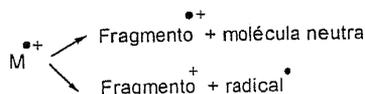


Debido a los valores de las afinidades electrónicas de las moléculas orgánicas, la formación de iones negativos en estas condiciones no se suele producir.



Un sistema de alto vacío es necesario pues por un lado la muestra debe ser ionizada en fase vapor y por otro lado como el rendimiento de la ionización, en general, no es superior al 1 0/00, las moléculas no ionizadas deben ser eliminadas para impedir reacciones ion-molécula no deseadas. El ion molecular $M^{\bullet+}$ posee un exceso de energía que da

lugar a reacciones de fragmentación de sus enlaces. Se puede formar otro catión radical eliminándose una molécula neutra y/o formar un catión eliminando un radical. Dichas fragmentaciones pueden ser tan rápidas que incluso $M^{\bullet+}$ no pueda ser observado.



El empleo de un potencial de ionización menor puede en algunos casos facilitar la detección del ion molecular cuando éste no es detectado en condiciones normales de ionización.

Dado que la mayoría de los elementos naturales son poliisotópicos y dado que un espectrómetro de masas separa los iones según su relación m/z , el espectro de masas de una sustancia químicamente pura será la suma de los espectros de todos los iones presentes, es decir de todas las combinaciones posibles de isótopos. Sin embargo y dado que ciertas abundancias isotópicas son muy bajas, la intensidad de ciertos iones es tan pequeña que éstos no pueden ser observados. A pesar de ello, los iones moleculares o procedentes de fragmentos rara vez dan picos únicos. Los picos isotópicos dan idea tanto del número como del tipo de cada átomo presente en la muestra. En moléculas orgánicas, excepto ^{19}F , ^{31}P y ^{127}I , todos los elementos presentan isótopos en diferentes abundancias. Los elementos se clasifican según el número de isótopos y su diferencia de masas respecto del isó-

topo más abundante. Así, elementos "A" serán H (la contribución de ^2H es despreciable), F, P y I; elementos "A+1" serán aquellos que posean dos isótopos, el más pesado una unidad de masa atómica más que el más abundante como C y N, mientras los elementos "A+2" son aquellos cuyo isótopo pesado pesa 2 u más que el más abundante como Cl, Br y S. Existen también elementos "A+1+2" como el Si. Otros elementos como metales y no metales presentan dificultades para su clasificación según esta terminología dado el gran número de isótopos y sus abundancias semejantes. Luego, tanto los iones como sus abundancias relativas son consecuencia de la proporción de una serie de átomos poliisotópicos. Es decir, el agrupamiento iónico o "cluster" es la huella dactilar de una determinada fórmula molecular. Hoy en día existen programas de ordenador que permiten calcular y dibujar el agrupamiento iónico para cualquier fórmula molecular dada. El espectrometrista experimentado es capaz a la vista de un agrupamiento iónico de determinar que elementos característicos están presentes e incluso el número de átomos de éstos.

Se define como masa nominal (monoisotópica) de un ion la que resulta de sumar los valores enteros de las masas de los isótopos más abundantes de los átomos presentes. La masa monoisotópica exacta resulta de sumar los valores exactos de masa (referenciados al ^{12}C) de los isótopos más abundantes, mientras que la masa promedio emplea los valores promediados (por las abundancias naturales) de los diferentes átomos presentes. En el caso de moléculas sencillas, las diferencias entre los valores de las diferentes masas son mínimas pero cuando el número de átomos presentes es elevado, las diferencias pueden ser importantes. Podemos observar este hecho más fácilmente con dos ejemplos.

	Glucosa	Insulina Humana
Fórmula molecular	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	$\text{C}_{257}\text{H}_{383}\text{N}_{65}\text{O}_{77}\text{S}_6$
Masa nominal	180	5801
Masa exacta	180.063390	5807.799965
Masa promedio	180.16104	5803.637163

Como veremos más adelante, estas diferencias pueden inducir errores graves cuando se trata de espectros de

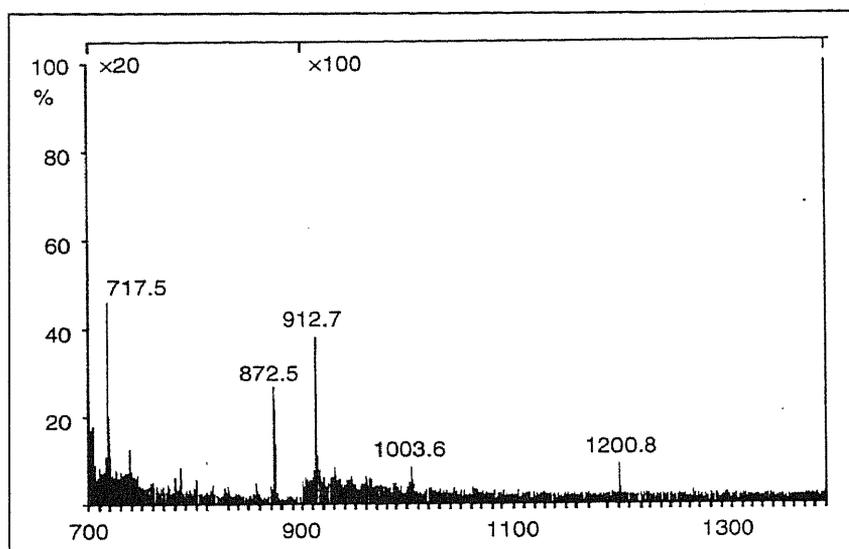


Figura 4. Espectro de masas por ionización FAB de una mezcla de cinco péptidos. Se observa el m/z correspondiente al $[M+H]^+$ de cada uno de los péptidos.

masas de compuestos de muy elevado peso molecular.

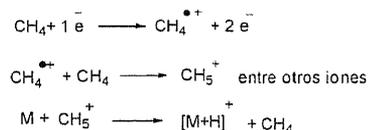
En 1956 Beynon demostró que a partir de la masa exacta de un determinado ion se podía calcular su fórmula molecular.⁹ Para ello editó sus famosas tablas donde en filas y columnas se relacionaban masas y fórmulas moleculares para diferentes combinaciones de C, H, N y O.¹⁰ En 1957 McLafferty describe el primer acoplamiento entre un cromatógrafo de gases y un espectrómetro de masas lo que ampliaba de forma muy significativa el campo de aplicación de la EM.¹¹ A partir de esa fecha y durante los siguientes años, la EM sufre un enorme y gigantesco desarrollo facilitado por la necesidad que la industria petroquímica tiene de disponer de métodos rápidos y fiables de análisis de mezclas complejas de productos orgánicos. Fue la Consolidated Engineering Corporation quien construyó el primer espectrómetro de masas comercial dedicado al análisis orgánico a petición de la Atlantic Refinery Company en 1942. Durante los años 60 y 70 del pasado siglo se determinan las bases teóricas y experimentales de la espectrometría de masas estableciéndose la base teórica para comprender las descomposiciones unimoleculares de los iones (teoría del cuasi-equilibrio y principio RRKM).¹² Asimismo se determinaron los conocidos mecanismos de fragmentación de los iones, lo que posibilita la generalización del análisis de moléculas orgánicas por EM. En dichos años se publican

unas serie de artículos y monografías que constituyen el armazón de lo que hoy en día se conoce como determinación estructural de compuestos orgánicos por espectrometría de masas.¹³⁻¹⁵ Al mismo tiempo se tabulan masas e intensidades de los iones en los espectros de masas de impacto electrónico dando lugar a diferentes colecciones de espectros que serán la semilla de las actuales librerías informatizadas para la comparación digital de espectros.

La revolución en la espectrometría de masas: segunda época

Los avances significativos logrados en la EM (acoplamiento a cromatógrafos de gases, analizadores de doble enfoque y alta resolución en la medida de masas) tropezaban con una importantísima restricción, que era imposible de salvar. La ionización por impacto electrónico precisa que la muestra a analizar sea introducida en la fuente en fase vapor. Este hecho no constituye problema alguno para una gran parte de las moléculas orgánicas de bajo peso molecular y de no muy elevada polaridad pues poseen una adecuada tensión de vapor. Sin embargo, otras moléculas de elevada polaridad (aminoácidos, hidroxiaácidos, alcoholes, polialcoholes, ácidos carboxílicos y derivados) o de elevado peso molecular (péptidos, proteínas, polímeros naturales y sintéticos) no presentan tensiones de vapor adecuadas para ser vaporizadas e incluso descomponen antes de vaporizarse y por tanto no

podían ser analizadas. Se pusieron a punto un número importante de reacciones de derivatización con objeto de obtener derivados volátiles de compuestos que no lo eran: silanización de alcoholes, formación de ésteres metílicos de ácidos carboxílicos, etc... A pesar de todo ello, un gran número de sustancias permanecía inalcanzable para su análisis por EM. Por dicho motivo comenzaron una serie de investigaciones dirigidas a poner a punto una serie de nuevas técnicas de ionización. El primer resultado fue la puesta a punto de una ionización "suave" que permite formar iones moleculares sin exceso de energía y que por tanto sufren fragmentaciones en mucha menor extensión. Debe recordarse que si el ion molecular es inestable o posee un elevado contenido energético, fragmentará muy rápidamente por lo que no podrá ser detectado. Así, en 1966 Munson y Field introducen la ionización química.¹⁷ Esta técnica se basa en la producción de iones a través de reacciones entre la molécula a analizar (M) e iones previamente formados en la fuente. Así, empleando por ejemplo metano como gas de reacción, éste se ioniza previamente mediante un impacto electrónico convencional:



La reacción de ionización es un proceso ion-molécula controlado por las afinidades protónicas de CH_4 y de M. De esta forma se obtienen iones $[\text{M}+\text{H}]^+$ que se denominan pseudomoleculares y que sirven para determinar el peso molecular de la sustancia M. El bajo contenido energético de estos iones induce escasas o ninguna fragmentación.

A pesar de todo ello, esta ionización al seguir precisando la vaporización previa de la muestra, no respondía a las necesidades antes comentadas. En el año 1981 se describe la primera fuente de ionización que no precisa que la muestra se vaporice previamente. Se trata de la técnica conocida por su acrónimo inglés FAB (Fast Atom Bombardment) que consiste en lanzar sobre la muestra, que se encuentra disuelta en una matriz (glicerina, tioglicerina u otros alcoholes no volátiles), un haz de átomos acelerados (Ar o Xe).¹⁸ El cho-

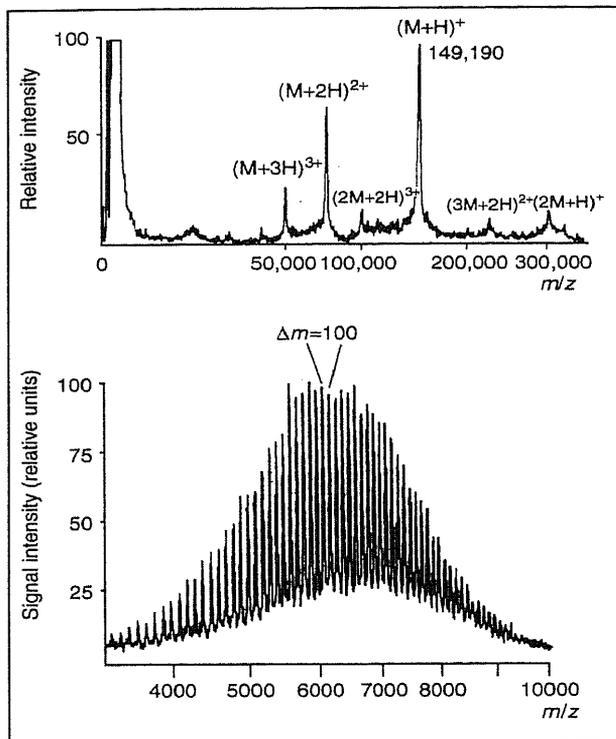


Figura 5. Espectro de masas por ionización MALDI de un anticuerpo monoclonal (arriba). Espectro de masas por ionización MALDI (abajo) de un polimetacrilato de metilo con masa promedio 7100 Da. Se puede observar la separación de masas $\Delta m = 100$ (unidad monomérica) entre las diferentes cadenas poliméricas.

que es suficiente para liberar iones del tipo $[M+H]^+$ o $[M-H]^-$. En la figura 4 podemos observar un espectro FAB de una mezcla de péptidos. Empleando este método de ionización, se consiguió por primera vez en 1982 el espectro de masas de una molécula de elevado peso molecular como es la insulina (5720 Da).¹⁹ Estos hechos son de capital importancia en el desarrollo de la EM. Mientras otras técnicas espectroscópicas como la RMN habían ampliado su campo de aplicación, la EM estaba limitada por el tipo de fuentes de ionización que se empleaban. El desarrollo de nuevas fuentes que permiten analizar cualquier tipo de molécula, sea cual sea su peso y polaridad, hace experimentar a la EM un auge hasta entonces desconocido, convirtiéndola en una técnica espectroscópica de posibilidades nunca antes imaginadas. En años sucesivos se diseñan y comercializan nuevas fuentes de ionización que al igual que el FAB permiten la ionización de moléculas no volátiles. Así, en 1987 se describe la ionización por desorción de una matriz con láser

(MALDI)²⁰ (Figura 5) y en 1988 se implanta la ionización por electrospray o electropulverización (ESI).²¹ Hoy en día, cualquiera de estas nuevas fuentes forman parte de los espectrómetros de masas de los laboratorios de investigación y análisis en todo el mundo.

Consecuencias de las nuevas fuentes de ionización

Las nuevas fuentes de ionización plantearon una serie de nuevos problemas. Así, la ionización de moléculas de muy elevado peso molecular genera unos iones de enorme tamaño que precisan para su análisis de nuevos detectores. Al mismo tiempo se precisaban nuevas interfases que permitieran el acoplamiento de cromatógrafos líquidos a las nuevas fuentes de ionización.

W. Paul y H. S. Steinwell patentaron en 1953 un nuevo analizador de iones con el nombre de jaula o trampa de iones. Posteriormente, una variante de esta trampa iónica da lugar al detector conocido como cuadrupolo.²² Este nuevo analizador permitió que en 1975 se consiguiera el primer acoplamiento de un

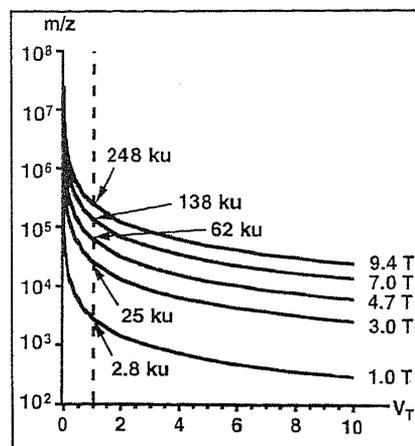


Figura 6. Relación entre el límite de masas detectable y la intensidad de campo magnético en analizadores FTICR

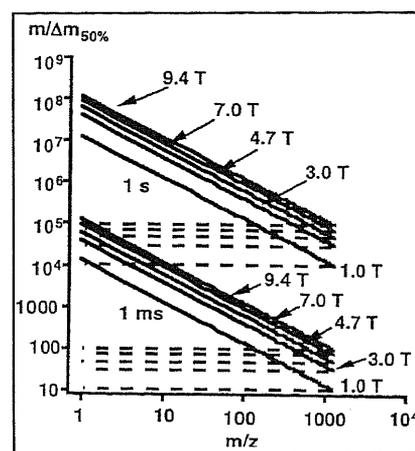


Figura 7. Relación entre el poder de resolución $m/\Delta m$ y la intensidad de campo magnético de un analizador FTICR. Aunque el aumento de m/z rebaja el poder de resolución, el aumento del tiempo de detección elimina este inconveniente.

cromatógrafo de gases con columnas capilares a un espectrómetro de masas. Las investigaciones de Paul fueron premiadas con el Nobel de Física en 1989. Posteriormente es McLafferty (sin duda el más brillante y prolífico de los espectrometristas de masas) quien describe el primer acoplamiento entre un cromatógrafo de líquidos HPLC y un espectrómetro de masas.²³ En las mismas fechas, se pone a punto un nuevo analizador de iones conocido por las siglas FTICR (resonancia de ion-ciclotrón por transformada de Fourier) basado en el confinamiento de los iones en un campo magnético muy intenso y en su excitación y detección mediante pulsos de radiofrecuencia al igual que se hace en la RMN.²⁴

La posibilidad de realizar espectrometría de masas de iones previamente seleccionados, es decir espectrometría en tandem o MS^n se hace realidad con la comercialización por parte de Finnigan del primer triple cuadrupolo en serie en 1982. El acoplamiento de la electroforesis capilar (CE) a la EM se consigue por primera vez en 1987.²⁵

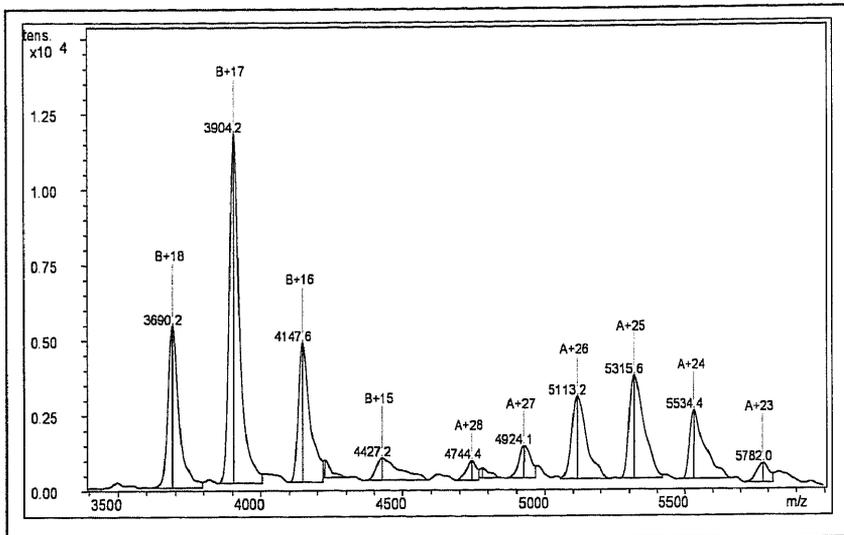


Figura 8. Espectro de masas ESI de la albúmina bovina monómero B y dímero A. El ion más abundante de B corresponde a $[B+17H]^{17+}$ mientras que para A el ion más abundante corresponde a $[A+25H]^{25+}$

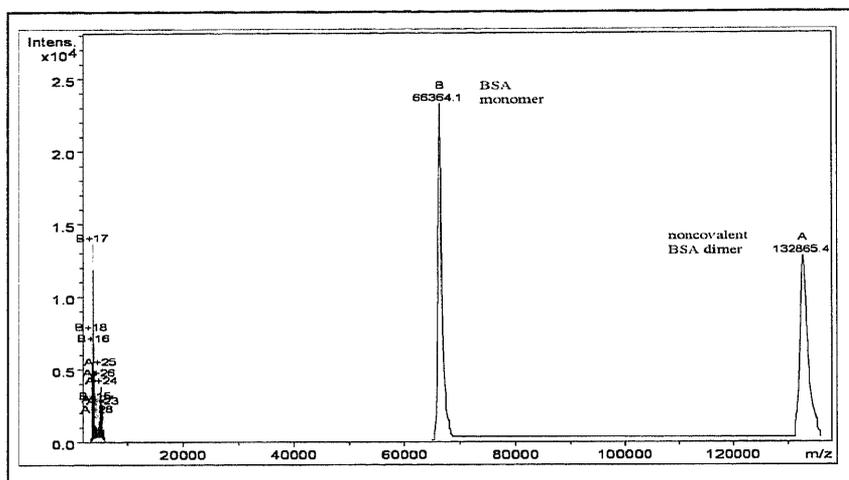


Figura 9. Espectro de masas de los iones multicarga de la figura 8 deconvolucionados para determinar los pesos moleculares del monómero y del dímero de la insulina

El analizador llamado de tiempo de vuelo (TOF) dotado de reflectrón, lo que posibilita vuelos sucesivos de los iones y no un único vuelo, demuestra su utilidad en el análisis de péptidos y proteínas.²⁶

Paralelamente al desarrollo de estos avances, se plantean una nueva serie de necesidades como son las de poder establecer con exactitud (masas exacta) los pesos moleculares elevados, así como de ampliar el límite de detección de masas para poder analizar los iones provenientes de moléculas de elevado peso molecular. El poder de resolución (R) de un analizador se define como el inverso en el error relativo en la medida

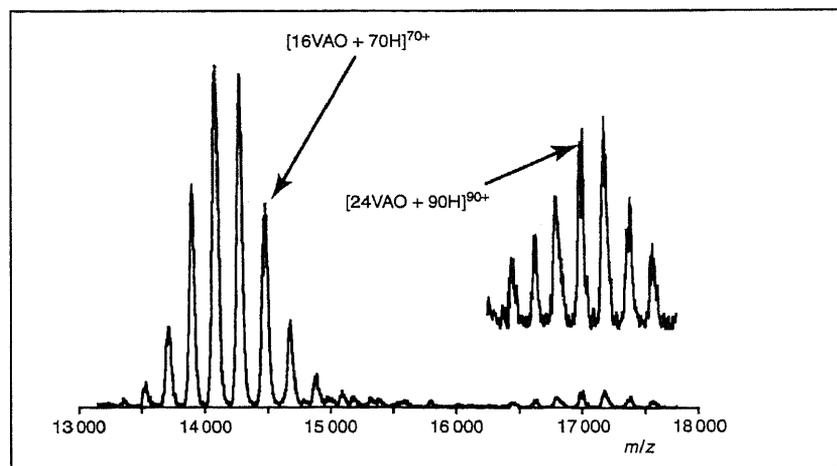


Figura 10. Espectro de masas ESI con detector Q-TOF de la enzima oxidasa del alcohol vanilílico.

de una determinada masa, $R = m/\Delta m$. Thomson en 1913 con su primer espectrómetro llegó a un poder de resolución $R = 13$. Aston en 1913 medía masas con $R = 130$ mientras que en 1937 llegó a realizar medidas con un $R = 2000$. Hoy en día los analizadores FTICR permiten medir masas con un $R = 8 \times 10^6$ mientras que el límite de masas detectables se encuentran en los 250 ku (m/z , para $z = 1$) para espectrómetros con imanes de 9.4 Teslas.²⁷

Aplicaciones modernas de la espectrometría de masas actual

Iones multicarga

La ionización por electrospray (ESI) de moléculas con varios centros potenciales de ionización (átomos polares), como es el caso de péptidos y proteínas, da lugar a la formación de iones multicarga. En general y de forma aproximada, una proteína es capaz en el proceso de electrospray de captar o perder un protón por cada 1000 Da de peso. De esta forma se generan iones del tipo $[M+nH]^{n+}$ o $[M-nH]^{n-}$. Como los iones se detectan (sea cual sea el analizador) como m/z estos iones multicarga rebajan el límite de detección de masas del analizador lo que posibilita su estudio con analizadores sencillos como la trampa iónica o el cuadrupolo. Sin embargo, es necesario proceder a la deconvolución de los picos, es decir a calcular el número de cargas ($n+$ o $n-$) de cada pico para poder proceder al cálculo del peso molecular.

En la figura 8 se puede observar el

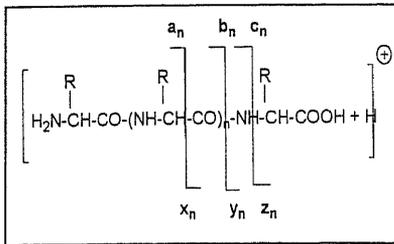


Figura 11. Fragmentaciones y fragmentos más comunes originados en la espectrometría de masas de péptidos y proteínas (clasificación de Biemann)

espectro ESI de la albúmina bovina (BSA) tanto en forma monomérica (B) como dímero (A). La deconvolución de los picos (Figura 9) permite calcular primeramente el número de cargas (z) y a continuación determinar el peso molecular para el monómero (66364.1 u) y para el dímero (132865.4 u). Obsérvese como el monómero formó un cluster con iones de $z = 18, 17, 16$ y 15 mientras el dímero forma picos multicarga de $z = 28, 27, 26, 25, 24$ y 23 .

Esta ventaja que poseen los picos multicarga de rebajar el valor de m/z necesario para su detección permite la observación de iones de altísimo peso molecular. Así, la enzima oxidasa del alcohol vanilílico forma un agrupamiento iónico de 24 unidades que da lugar a un superior de 1.53×10^6 Da con 90 cargas que se observa como $[24M + 90H]^{90+}$. En el mismo espectro se observó un agrupamiento de 16 unida-

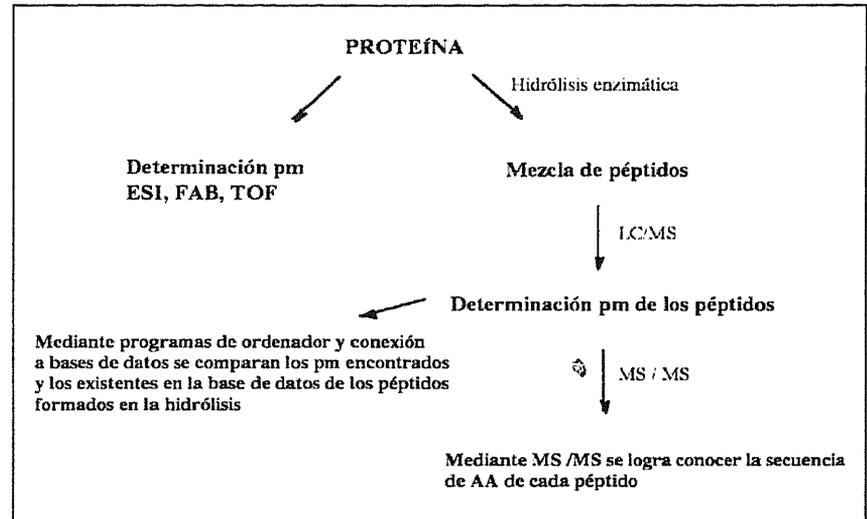


Figura 12. Estrategia en la identificación y secuenciación de proteínas mediante EM

des que se detectó como $[16M + 70H]^{70+}$. Este ejemplo está considerado hasta la fecha como el récord en la determinación de pesos moleculares.²⁸

Péptidos y proteínas. Secuenciación de aminoácidos

Los péptidos y proteínas son combinaciones de los veinte aminoácidos esenciales unidos por enlaces denominados peptídicos. Además existen toda una serie de modificaciones estructurales llamadas postraslacionales como la glicosidación, la formación de puentes disulfuro, la fosforilación, etc., que modifican substancialmente el peso molecular de péptidos y proteínas. Se han descrito más de doscientas

modificaciones que pueden alterar el peso molecular de la proteína original desde -79 Da hasta $+1039$ Da.²⁹ Sirva este dato como exponente de la enorme dificultad que plantea el análisis de este tipo de moléculas mediante la espectrometría de masas.

En principio, la fragmentación de péptidos y proteínas puede producirse en tres enlaces diferentes (figura 11). Los enlaces fisionables son el $C_{\alpha}-C$, $C-N$ y $N-C_{\alpha}$, lo que da lugar a la posible formación de seis fragmentos diferentes llamados a_n , b_n y c_n cuando la carga queda en el extremo N-terminal y denominados x_n , y_n y z_n cuando la carga queda en el extremo C-terminal. El subíndice indica el número de aminoácidos contenidos en cada fragmento.³⁰ Dado que se encuentran tabuladas todas las diferencias de masas posibles entre iones consecutivos de las mismas series anteriormente mencionadas, ello permite conocer la identidad de los aminoácidos vecinos y por tanto la secuencia de éstos en la cadena peptídica. Para ello el ion molecular de la molécula investigada se somete a sucesivas fragmentaciones mediante la técnica de aislamiento-fragmentación. Cuando esta técnica no es posible aplicarla o bien cuando los resultados no son lo suficientemente clarificadores, se procede a una digestión enzimática de la proteína y al análisis por HPLC-MS (Figura 12). Los diferentes enzimas empleados dan lugar a productos de hidrólisis diferentes que son separados y analizados. La comparación de los resultados con los

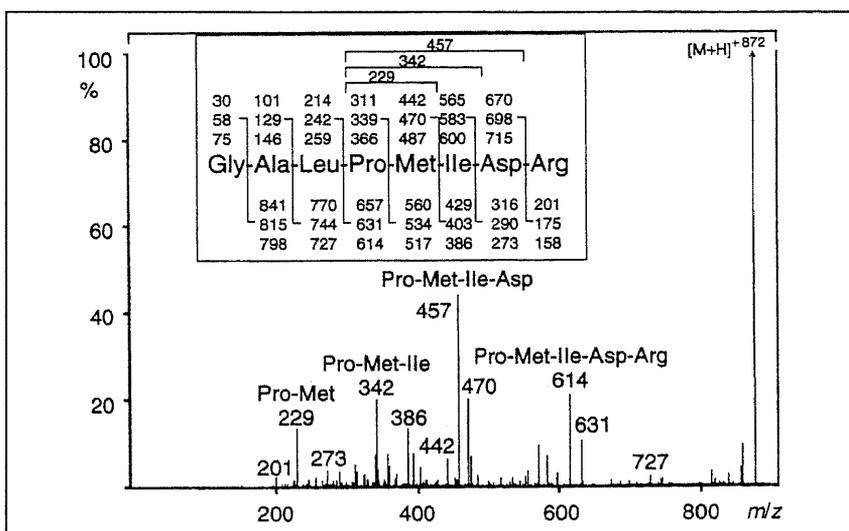


Figura 13. Secuenciación de un péptido $[M+H]^+ = 872$ por MSn. Los fragmentos obtenidos permiten conocer la secuencia de aminoácidos.

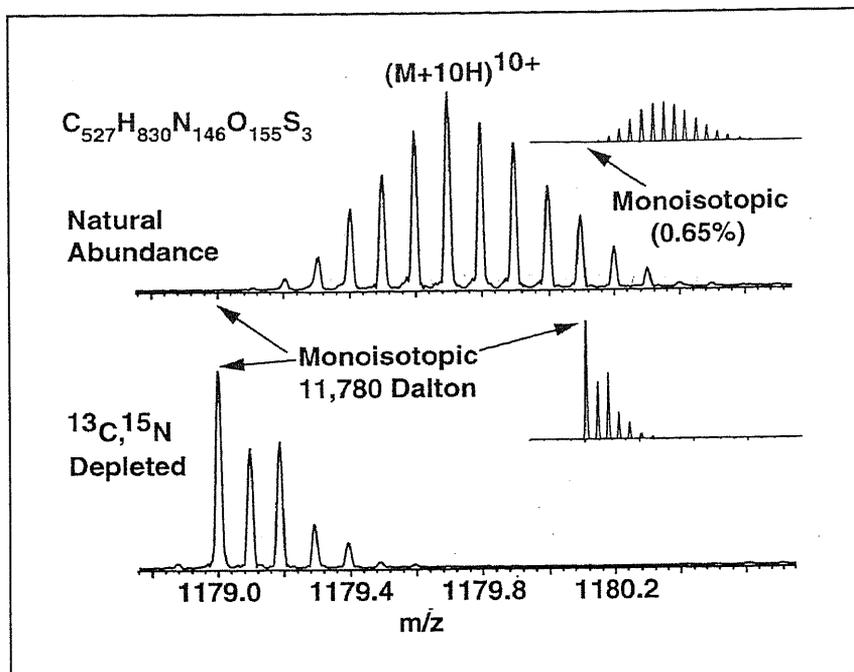


Figura 14. Cluster iónico del ion molecular de una proteína de fórmula $C_{527}H_{830}N_{146}O_{155}S_3$. El cluster iónico del ion molecular cuando la proteína ha sido obtenida de un medio empobrecido en ^{13}C y ^{15}N es más sencillo y permite el cálculo exacto de la masa.

datos almacenados en bases de datos adecuadas suele ser suficiente para identificar la molécula investigada y determinar la secuencia de aminoácidos como se puede observar en la figura 13. La Proteómica se puede definir como el análisis sistemático de proteínas para determinar su identidad, cantidad y función. El análisis proteómico se realiza combinando la electroforesis de gel bidimensional (2DE) y la EM. Los problemas derivados de la detección de proteínas de baja abundancia en la mezcla se pueden obviar empleando la LC/MS/MS.³¹

Fórmulas moleculares

El uso de la masa exacta para la determinación de la correspondiente fórmula molecular fue puesto a punto por Beynon.^{9,32} Se basa en el hecho de que para cada masa existe una fórmula molecular diferente. Sin embargo, este método está limitado a moléculas pequeñas ($pm < 300$ Da), pues para pesos superiores existen más de una composición elemental para cada masa, incluso si ésta se puede determinar con errores del orden de 1 ppm. En algunos casos, la resolución de los picos isotópicos puede ayudar pero

esta técnica se basa en abundancias relativas y no en el cálculo de la masa exacta.

Para obviar estos inconvenientes, especialmente en la espectrometría de masas de biopolímeros, se han puesto a punto dos métodos basados en el enriquecimiento y empobrecimiento isotópico respectivamente. Así, la diferencia de masa entre el peso observado para una molécula con abundancia isotópica natural y el peso de la misma molécula isotópicamente enriquecida en ^{13}C o ^{15}N permite conocer el número de átomos de estos dos elementos, lo que reduce drásticamente el número de fórmulas moleculares posibles.

Como ejemplo, tomaremos la determinación de la fórmula molecular de un anión fosforilado de un derivado de inositol.³³ Se determina el peso molecular con una exactitud de ± 10 ppm obteniéndose un valor de 861.5499 Da. Esta masa puede corresponder a más de 2500 posibles combinaciones de C, H, O y P. Si se trata de un biopolímero, como es en nuestro caso, el contenido en carbono biológicamente correcto elimina muchas de las combinaciones que no cumplen dicho requisito, dejando "solamente" unas 394 fórmu-

las posibles. La muestra procede de la bacteria *Rhodococcus rhodochrous* que ahora se desarrolla en un medio de cultivo donde la abundancia en ^{13}C es del 99%. El espectro de masas de la nueva muestra así obtenida muestra un ion molecular nuevo a mayor masa ($\Delta m = + 45$), lo que significa que la molécula debe contener al menos 45 átomos de carbono. Este dato permite reducir el número de posibles fórmulas a 19. Procediendo al estudio de los diferentes fragmentos de ambas moléculas (normal y enriquecida en ^{13}C) se llega finalmente al resultado de que la fórmula buscada era $C_{45}H_{82}O_{13}P$.

En otros casos, aunque se determine el peso molecular con exactitud (± 5 ppm) es preciso comparar la abundancia isotópica observada con la correspondiente a la fórmula molecular calculada. Para pesos elevados el cluster iónico del ion molecular es tan complejo y extenso (se extiende sobre decenas de Da) que es fácil cometer errores pues el ion que corresponde a la masa monoisotópica es extraordinariamente poco abundante (Figura 14). Con objeto de simplificar el cluster, si la muestra tiene un origen biológico se obtiene ésta en un medio de crecimiento empobrecido en ^{13}C y en ^{15}N . De esta forma la presencia única de ^{12}C y de ^{14}N simplifica el cluster iónico permitiendo un cálculo más sencillo y exacto del peso molecular al hacer visible el ion correspondiente a la masa monoisotópica.³⁴

Medidas de relaciones isotópicas

La información química disponible en los organismos vivos puede clasificarse en tres grupos: la proveniente de macromoléculas, la de moléculas pequeñas y la que se obtiene de las relaciones isotópicas. En general, el estado fisiológico de un organismo se puede determinar a partir de un análisis cuali y cuantitativo tanto de macromoléculas como de moléculas pequeñas. La Genómica y la Proteómica son excelentes aproximaciones al análisis de macromoléculas con objeto de establecer estados fisiológicos que puedan provenir de alteraciones genéticas. Sin embargo, está demostrado que pequeñas variaciones en las proporciones de las abundancias isotópicas naturales

pueden proporcionar una enorme información sobre determinados estados fisiológicos y las alteraciones de éstos. Las variaciones en las proporciones de abundancia isotópica son pequeñas y se expresan en unidades δ en tanto por mil ($^0/00$): $\delta [^0/00] = (R_m/R_r - 1) \times 1000$, siendo R_m el valor de relación isotópica de la muestra y R_r el valor de referencia. Existen una serie de escalas donde se encuentran tabulados los valores R_r dependiendo del material natural usado para establecer los valores de referencia R_r . Debido a que estas variaciones de abundancia relativa son muy pequeñas se precisan aparatos de alta resolución para las correspondientes medidas.

La espectrometría de masas de relaciones isotópicas (IRMS) se ha revelado como una poderosa herramienta para la detección de alteraciones fisiológicas y metabólicas. Así, por ejemplo la relación de abundancia ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) demuestra como los lípidos están empobrecidos en ^{13}C respecto de proteínas e hidratos de carbono del mismo origen. Una variación de dicha relación pone de manifiesto un problema en la biosíntesis de dichos lípidos. Se ha observado asimismo como las posiciones C3 y C4 de la glucosa están enriquecidas en ^{13}C respecto de C2, C5 y C6 debido a la reacción catalizada por la aldolasa fructosa-1,6-difosfato de la glucosa. Una alteración pone de manifiesto un problema en el metabolismo de los hidratos de carbono. La biosíntesis de ácidos grasos basada en unidades de acetato se caracteriza porque los valores $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ varían dependiendo del número (par o impar) de átomos de carbono del correspondiente ácido graso.^{35,36} Alteraciones en dicha biosíntesis dan lugar a variaciones en la relación isotópica mencionada.

En otro orden de cosas podemos citar como la relación $^2\text{H}/^1\text{H}$ y $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ pueden servir para determinar el origen del agua (agua de lluvia o agua subterránea).³⁷ Cabe destacar que la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ se ha empleado en el estudio de la migración de la mariposa monarca (*Danaus plexippus*) desde México hasta Norteamérica.³⁸

Identificación de bacterias

Después de los ataques con ántrax (*Bacillus anthracis*) contra el Congreso y Senado USA mediante cartas infecta-

das con dicha bacteria, ha cobrado actualidad la identificación de bacterias y/o cepas mediante la EM. En principio la pirólisis de bacterias y el estudio del pirolizado mediante GC/EM permite en algunos casos la identificación de bacterias. Investigadores israelitas han utilizado la espectrometría de masas MALDI-TOF para caracterizar los biomarcadores del *Bacillus anthracis*. Dichos biomarcadores identificados por sus pesos moleculares exactos (entre 2.5 y 3.5 kDa) y sus correspondientes fragmentaciones específicas no han sido encontrados en otras bacterias de la especie *Bacillus* (*B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. mycoides*) lo que parece demostrar la utilidad del método de análisis, ideal para prealertas rápidas ante ataques de guerra biológica.³⁹

Estudio de fragmentos neutros.

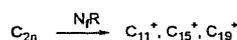
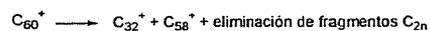
Aplicaciones.

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) se usa tanto para el análisis estructural como en estudios de la física de iones en estado gaseoso. La información que proporciona esta técnica se basa en las reacciones entre un ion seleccionado y un gas inerte con el que colisiona dando lugar a un proceso de fragmentación o disociación. Dicha reacción genera un fragmento iónico y un fragmento neutro o un radical. El fragmento iónico se detecta en el analizador pero el fragmento neutro o el radical no pueden detectarse, con lo cual el conocimiento de su estructura se basa en una detección indirecta basada en los conocidos mecanismos de fragmentación pero no en su observación directa.

Hoy en día existe la posibilidad de aislar dichos fragmentos neutros e ionizarlos de forma que se puedan detectar de forma directa y así determinar su estructura de forma precisa e inequívoca. Esta técnica que recibe el nombre de reionización de fragmentos neutros (NFR) fue ideada por McLafferty.⁴⁰ Esta nueva variante de la EM ha dado lugar a una serie de resultados espectaculares.

Así, es conocido que la fragmentación del ion molecular del acetato de metilo $[\text{CH}_3\text{COOCH}_3]^{\bullet+}$ por fragmentación sencilla en α respecto del carbonilo (fragmentación inducida por el electrón desapareado del ion radical) conduce a la formación del catión acetilo $[\text{CH}_3\text{CO}]^+$ y a la eliminación de radical metoxilo

OCH_3^{\bullet} . La reionización de fragmentos neutros ha demostrado que junto al radical metoxilo se forma una cantidad importante de radical hidroximetilo HOCH_2^{\bullet} lo que sugiere un nuevo mecanismo de fragmentación no tan sencillo como el postulado hasta ahora. Aplicando esta técnica a la descomposición de iones positivos provenientes de péptidos, se ha demostrado que la ruptura del enlace peptídico forma como fragmentos neutros aminoácidos o pequeños péptidos a partir del extremo C-terminal mientras que el extremo N-terminal genera la formación de aziridinonas y dicetopiperazinas. También se ha empleado esta técnica en la química del fullereno C_{60} para determinar su mecanismo de fragmentación.



Estos clusters de número impar de átomos de carbono son similares a los detectados en la ablación del grafito mediante láser. Se ha determinado que la mezcla C_{2n} eliminada como fragmento neutro en la fragmentación del ion C_{60}^+ está compuesta por pequeñas agrupaciones en las cuales $2n < 30$ y que a su vez fragmentan por pérdidas consecutivas de unidades C_1 y C_3 .⁴¹

Química forense

Hoy en día el análisis de sustancias prohibidas por EM es uno de los campos de la química forense. Para la detección de dichas sustancias se han de poner a punto diferente métodos de recolección de muestra, preparación de ésta, aislamiento y finalmente análisis. Como ejemplos más recientes citaremos el análisis por GC/MS de la ecdysterona en la orina humana. Se trata de un esteroide presente en fármacos preparados a partir de *L. Carthamoides* y empleados en el tratamiento de neurosis, neurastenias e hipotensión debido a sus efectos tónicos y anabólicos. Estudios llevados a cabo han demostrado que también posee acción sobre el crecimiento muscular sin presentar los inconvenientes de los otros esteroides anabolizantes. La detección de ecdysterona se ha puesto a punto por el Laboratorio del Centro Olímpico de Atenas con objeto de incluir esta sustancias entre las prohibidas en la próxima Olimpiada a celebrarse en Atenas en

2004. Asimismo se ha puesto también a punto la detección de dos de los metabolitos del esteroide, la 2-desoxicdysterona y la desoxicdysona.⁴² respectivamente.

Por otro lado, el UCLA Olympic Analytical Laboratory ha desarrollado un sistema de análisis para la detección vía GC/MS de un nuevo fármaco que modifica la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. El RS13, ácido (2-[4-[(3,5-dimetilanilino)carbonil]metil]fenoxi]2-metilpropiónico incrementa de forma notable la capacidad máxima de inhalación de oxígeno ($VO_2 \text{ max}$) lo que lo hace atractivo para el doping de deportistas pues aumenta espectacularmente la capacidad aeróbica. El RS13 se detecta mediante la monitorización de dos iones [m/z 485 ($M^{\bullet+}$) y m/z 470 ($M-CH_3$)⁺]. El límite de detección (LOD) es inferior a 2ng/mL en orina. En estos momentos las autoridades deportivas consideran la posibilidad de incluir al RS13 en la lista de sustancias dopantes.⁴³

Este mismo año, el UCLA Olympic Analytical Laboratory ha detectado en la orina de ciertos atletas un esteroide anabolizante llamado norboletona, sintetizado en 1966 y administrado a humanos para el tratamiento del enanismo y raquitismo. Nunca fue anteriormente hallado por ningún laboratorio antidoping. Lo más interesante del caso es que no existe en este momento en el mercado ningún fármaco que contenga dicha sustancia, lo que ha llevado a las autoridades deportivas a sugerir que existe una fuente clandestina y no detectada de norboletona.⁴⁴

Química supramolecular y reconocimiento quiral

Las interacciones no covalentes entre una molécula grande (anfitrión) y otra molécula pequeña (huésped) se pueden estudiar mediante espectrometría de masas gracias al desarrollo de métodos de ionización suaves que consiguen que la supermolécula acepte una o varias cargas y pase de la disolución a la fase gaseosa. Como ejemplo del estudio de las asociaciones supramoleculares y su aplicación al reconocimiento quiral citaremos los complejos de inclusión de las ciclodextrinas.

Las ciclodextrinas (CD) son oligómeros cíclicos de glucosa con forma de toroide y que se distinguen por el número de unidades de glucosa. Así, la α -CD contiene 6 unidades de glucosa con unión α -1,4, la

β -CD contiene 7 unidades mientras la γ -CD contiene 8 unidades de glucosa. Los diámetros internos de las cavidades permiten la entrada de huéspedes adecuados formando complejos de inclusión estables.^{45,46}

Estudios recientes han demostrado que la ionización de dichos complejos de inclusión (CI) mediante técnicas ESI o FAB permite la detección de éstos por EM poniendo de manifiesto que el complejo detectado es un auténtico complejo de inclusión y no el resultado de una agregación electrostática.⁴⁷ Empleando aminoácidos quirales como huéspedes se ha demostrado que el CI formado reacciona de forma enantioespecífica en una reacción de intercambio de huésped. El mismo método e idénticos resultados se han obtenido empleando éteres corona como huéspedes.⁴⁸

Otro ejemplo de aplicación es el estudio realizado sobre los antibióticos glicopeptídicos del grupo de la vancomicina. Estas sustancias actúan uniéndose a la pared celular bacteriana en péptidos que contengan la subestructura [D-Ala-D-Ala]. Dicha interacción inhibe el crecimiento celular bacteriano. Para estudiar las constantes de asociación de diferentes antibióticos se emplea la espectrometría de masas.⁴⁹ Así, se estudian los espectros obtenidos a partir de mezclas equimoleculares de vancomicina ($M = 1447$ Da) con diferentes péptidos que contengan las subunidades requeridas para la asociación. En los espectros se observa la señal de la vancomicina a $m/z = 725$ correspondiente al ion $[M+2H]^{2+}$ junto con señales correspondientes a los diferentes complejos formados entre la vancomicina y los péptidos ensayados. A partir de las intensidades de los picos y empleando ecuaciones sencillas para los equilibrios implicados se calculan las constantes de asociación y se puede determinar la estabilidad del complejo y por tanto determinar el mecanismo de asociación. Los valores así calculados son coherentes con los valores calculados por otras técnicas como la RMN y la microcalorimetría.

Química medioambiental

En 1974 se detectó mediante la EM la presencia en el agua potable de cloroformo procedente del empleo de cloro en la potabilización del agua como producto de desinfección (DBP). El cloroformo se forma a partir de la reacción de los productos de cloración del agua

cuando ésta contiene sustancias húmicas. Antes de 1970 solamente se habían detectado unos 100 compuestos orgánicos en el agua. En 1976 y gracias al empleo de la EM se habían identificado 1500 sustancias diferentes en el agua potable. Desde entonces la EM se ha utilizado profusamente para el análisis de todo aquello relacionado con la química del medio ambiente. El estudio de aerosoles y la presencia de compuestos orgánicos volátiles (VOCs), el análisis de agua potable, aguas de superficie y suelos se llevan a cabo mediante la EM. La presencia de pesticidas (que son los contaminantes más estudiados) se determina por LC/MS o bien por GC/MS así como el estudio de sus procesos de degradación. Los hidrocarburos poliaromáticos (PAHs) y los bifenilos policlorados (PCBs), dos de las familias de contaminantes más peligrosos, también se analizan por EM. La presencia de dioxinas y furanos formados en procesos de combustión se establece a partir de datos de EM, al igual que la presencia de otros contaminantes peligrosos como los colorantes para textiles y los surfactantes. Ya hemos hablado de los DBP y debemos mencionar su actividad como sustancias cancerígenas y su influencia en el aumento observado en el número de abortos. La EM ha permitido la detección entre otros compuestos del conocido como "MX" que es la [3-cloro-4-(diclorometil)-5-hidroxi-2(5H)]furanona, uno de los agentes de mayor poder mutagénico. La EM permite también la detección de sustancias de carácter inorgánico como anión perclorato, arsénico, selenio y diferentes metales tanto en alimentos como en aguas.⁵⁰ Por último señalar que la EM se ha empleado con éxito en la identificación de microorganismos en el agua como virus y bacterias demostrando que los métodos de ionización suaves como el ESI son capaces de conservar la estructura biomolecular durante el proceso de ionización.⁵¹

Agradecimientos

El autor quiere agradecer al Prof. A. García Martínez sus enseñanzas sobre la espectrometría de masas y sobre la importancia de esta técnica en el análisis estructural de compuestos orgánicos. Asimismo agradezco a Bruker Española S. A. su autorización para la reproducción de imágenes y espectros.

Bibliografía

- 1.-J. J. Thomson, "Rays of Positive Electricity and their Application to Chemical Analysis", Longmans Green, Londres, 1913.
- 2.-F. W. Aston, "Mass Spectra and Isotopes", 2ª ed. Erward Arnol & Co., Londres. 1942.
- 3.-I. W. Griffiths, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 2.
- 4.-P. Price, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1991**, *2*, 336.
- 5.-A. Mallet, "Mass Spectrometry Glossary of Terms", <http://www.spectroscopy.now>, 2000.
- 6.-J. F. J. Todd, *Pure and Applied Chemistry*, **1991**, *63*, 154
- 7.-I. Mills, K. Homamm, T. Cvitas, N. Kallay, K. Kuchitsu, "Magnitudes, Unidades y Símbolos en Química Física", Real Sociedad Española de Química, Madrid, 1999.
- 8.-A. J. Dempster, *Phys. Rev.* **1918**, *11*, 316.
- 9.-J. Beynon, *Mikrochim. Acta* **1956**, 437.
- 10.-J. Beynon, "Mass Spectrometry and its Applications to Organic Chemistry", Elsevier, Amsterdam, 1960.
- 11.-F. W. McLafferty, *Appl. Spectrosc.* **1957**, *11*, 148.
- 12.-R. A. Marcus, *J. Chem. Phys.* **1952**, *20*, 359.
- 13.-F. W. McLafferty, "Interpretation of Mass Spectra", W. A. Benjamin Inc, Nueva York, 1966. La última edición de este clásico está firmada por F. W. McLafferty y F. Turecek, 4ª ed., University Science Books, Mill Valley, California, 1995.
- 14.-H. Budzikiewicz, C. Djerassi, D. H. Williams, "Interpretation of Mass Spectra of Organic Compounds", Holden-Day, San Francisco, 1964.
- 15.-J. Beynon, R. A. Saunders, A. E. Williams, "The Mass Spectra of Organic Molecules" Elsevier, Amsterdam, 1968.
- 16.-K. Biemann, "Mass Spectrometry: Organic Chemical Applications", McGraw-Hill, Nueva York, 1962.
- 17.-M. S. B. Munson, F. H. Field, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 2681.
- 18.-M. Barber, R. S. Bardoli, R. D. Sedwick, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, *15*, 325.
- 19.-R. D. McFarlane, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 2948.
- 20.-M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1987**, *78*, 53.
- 21.-J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, *Science* **1989**, *246*, 64.
- 22.-W. Paul, H. S. Steinwell, *Z. Naturforsch.* **1953**, *8a*, 448. W. Paul, H. P. Reinhard, U. Zahn, *Z. Phys.* **1958**, *152*, 143.
- 23.-P. J. Arpino, M. A. Balwin, F. W. McLafferty, *Biomed. Mass Spectrom.* **1974**, *1*, 80.
- 24.-M. B. Comisarov, A. G. Marshall, *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *25*, 282.
- 25.-J. A. Olivares, N. T. Nyugen, C. R. Yonker, *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 1230.
- 26.-B. Gamen, Y. T. Li, J. D. Henion, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6294.
- 27.-A. G. Marshall, L. Christopher, L. Hendrickson, G. S. Jackson, *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, *17*, 1.
- 28.-W. J. H. van Berkel, R. H. H. van den Heuvel, C. Verluis, *Protein Sci.* **2000**, *9*, 435.
- 29.-<http://www.chemie.fuberlin.de/chemistry/bio/aimo-acids.html>.
- R. Krishna, F. Wold, "Protein Structure. A practical Approach", 2ª ed., T. E. Creighton (Ed.), Oxford University Press, Nueva York, 1997.
- 30.-K. Biemann, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1989**, *18*, 945.
- 31.-J. Peng, S. P. Gygi, *J. Mass Spectrom.* **2001**, *36*, 1083.
- 32.-J. H. Beynon, A. E. Williams, "Mass Spectrometry and Abundance Tables for Use in Mass Spectrometry" Elsevier, Nueva York, 1963.
- 33.-R. P. Rodgers, E. N. Blumer, C. L. Hendrickson, A. G. Marshall, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 835.
- 34.-A. G. Marshall, M. W. Senko, W. Li, S. Dillon, S. guan, T. M. Logan, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 433.
- 35.-J. T. Brenna, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 1252.
- 36.-R. A. Werner, W. A. Brand, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 501.
- 37.-T. E. Dawson, J. R. Ehlinger, *Nature* **1991**, *350*, 335.
- 38.-L. I. Wassenaar, A. K. A. Hobson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, 15436.
- 39.-E. Elhanany, R. Barak, M. Fisher, D. Kobiler, Z. Altbourn, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 2110.
- 40.-F. W. McLafferty, P. J. Todd, D. C. McGilvery, M. A. Baldwin, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 3360.
- 41.-M. J. Polce, S. Beranová, M. J. Nold, C. Wesdemiotis, *J. Mass Spectrom.* **1996**, *31*, 1073.
- 42.-C. Tsitsimpikou, G. D. Tsamis, P. A. Siskos, M-H. E. Spyridaki, C. G. Georgapoulos, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 1796.
- 43.-A. Breidbach, D. H. Catlin, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 2379.
- 44.-D. H. Catlin, B. D. Ahrens, Y. Kuchero, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 1273.
- 45.-S. Li, W. C. Purdy, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1457.
- 46.-J. Szejtli, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743.
- 47.-J. Rámirez, S. Ahn, C. Grigorean, C. B. Lebrilla, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6884.
- 48.-D. V. Dearden, Y. Liang, J. B. Nicoll, *J. Mass Spectrom.* **2001**, *36*, 989.
- 49.-A. J. R. Heck, *Spectroscopy Europe* **1999**, *11*, 15.
- 50.-S. D. Richardson, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 211.
- 51.-G. Siuzdak, B. Bothner, M. Yeager, C. Brigidou, C. Fauquet, K. Hoey, C. M. Chang, *Chem. Bio.* **1996**, *3*, 45.