

TEMA 5. ESPECTROMETRIA DE MASAS

5.0. CARACTERÍSTICAS Y EQUIPOS DISPONIBLES

5.0.1. Características más importantes

5.0.2. Equipos disponibles en los Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Alicante

5.1. EL ESPECTRÓMETRO DE MASAS

5.1.1. Sistemas de entrada de muestra

5.1.1.1. *Entrada por sonda directa*

5.1.1.2. *Sistemas de entrada cromatográficos*

5.1.2. Fuentes de iones

5.1.2.1. *Fuentes de impacto de electrones (EI)*

5.1.2.2. *Fuentes de ionización química (CI = Chemical ionisation)*

5.1.2.3. *Fuentes de ionización a presión atmosférica (API)*

5.1.2.4. *Fuentes de ionización de campo (FI = Field ionisation)*

5.1.2.5. *Fuentes de desorción de campo (FD = Field desorption)*

5.1.2.6. *Fuentes de bombardeo por átomos rápidos (FAB=Fast Atom Bombardment) o iones (SIMS = Secondary ion MS)*

5.1.3. Sistemas de vacío

5.1.4. Analizadores de masa

5.1.4.1. *Analizadores de sector magnético*

5.1.4.2. *Filtros de masas de cuadrupolo*

5.1.4.3. *Analizador de trampa de iones (IT-MS, ion-trap MS o ITD ion trap detector)*

5.1.4.4. *Analizador de tiempo de vuelo (TOF, time of flight)*

5.1.4.5. *Resonancia ciclotrónica por transformada de Fourier (FT-ICRMS Fourier transform ion cyclotron resonance MS)*

5.1.5. Detectores

5.1.5.1. *Detector de copa de Faraday*

5.1.5.2. *Multiplicador de electrones secundarios*

5.1.5.3. *Detector "Channeltron"*

5.1.5.4. *Detector de conversión fotónica (Detector "Daly" o de centelleo)*

5.1.5.5. *Detectores multicanal*

5.1.6. *Sintonía y calibración de los espectrómetros de masas*

5.2. ESPECTROS MOLECULARES DE VARIAS FUENTES DE IONES

5.2.1. Espectros de impacto de electrones

5.2.2. Espectros de ionización química

5.2.3. Espectros usando otras técnicas de ionización blandas

5.3. APLICACIONES

5.3.1. Análisis cualitativo: identificación de compuestos puros

5.3.1.1. *Determinación del peso molecular*

5.3.1.2. *Determinación de fórmulas moleculares*

5.3.2. Análisis cuantitativo: determinación de concentraciones moleculares

5.0. CARACTERÍSTICAS Y EQUIPOS DISPONIBLES

5.0.1. Características más importantes

Aplicaciones principales: Determinación de la estructura e identidad de compuestos orgánicos.

Fenómeno molecular: Ionización y rompimiento de la molécula en fragmentos de iones.

Ventajas en el análisis cualitativo: Peso molecular preciso, masas de partes integrantes de la molécula, muy alta sensibilidad, detección de impurezas.

Ventajas en el análisis cuantitativo: Alta sensibilidad.

Muestra promedio deseable: <1 mg

Limitaciones del método: No siempre puede diferenciar entre estructuras isómeras.

Limitaciones para la muestra: Ninguna

5.0.2. Equipos disponibles en los Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Alicante

Espectrómetro de masas de alta resolución Finnigan modelo MAT95S (Figura 1) de sector magnético para la medida de masas exactas. Esta medida de la masa se puede realizar mediante calibración magnética o eléctrica ("peak-matching"). La introducción de la muestra puede llevarse a cabo mediante sonda de introducción directa (DIP) a la fuente de iones o bien a través de un cromatógrafo de gases modelo HP6890 que a su vez posee un inyector split/splitless. La ionización se puede realizar por impacto electrónico así como por ionización química positiva y negativa. Además de las técnicas de ionización citadas anteriormente, que son las más comunes, se dispone de "FAB" (Fast Atom Bombardment) y de la posibilidad de detección de iones metaestables.



Figura 1. Espectrómetro de masas de alta resolución. Finnigan MAT95S

Espectrómetro de masas de alta resolución, MICROMASS AUTOSPEC – ULTIMA NT (Figura 2), para el análisis de trazas de dioxinas. Sector Magnético Trisector con geometría EBE, de alta resolución y alta sensibilidad, incluyendo cromatógrafo de gases de alta resolución (HP6890) y muestreador automático de

líquidos (HP 7683). El sistema de inyección del cromatógrafo de gases además de split/splitless dispone de PTV (programación variable de la temperatura) que permite trabajar con más cantidad de muestra y por tanto aumentar la sensibilidad. Se detectan concentraciones de dioxinas y furanos del orden de 20 fg/ml (ppt).



Figura 2. Espectrómetro de masas de alta resolución. MICROMASS AUTOSPEC-ULTIMA NT

Sistema acoplado Desorbedor Térmico o Purga-Trampa – Cromatógrafo de Gases – Espectrómetro de Masas (Figura 3): Cromatógrafo de gases modelo HP/AGILENT TECHNOLOGIES 6890N con inyector para columnas capilares split/splitless e inyector adicional GERSTEL cis 4+(PTV) y sistema de Desorción Térmica Horizontal GERSTEL TDS-2 o sistema de Purga-Trampa TEKMAR DOHRMANN, 3100 Sample Concentrator. Todo el conjunto lleva como detector selectivo un Espectrómetro de Masas modelo AGILENT TECHNOLOGIES 5973N con fuente de ionización por impacto de electrones (EI) y analizador de cuadrupolo (baja resolución). El equipo permite realizar la comparación de nuestro espectro problema con una colección de espectros almacenados en la memoria (librería). Con esta técnica se pueden analizar compuestos volátiles y semivolátiles orgánicos de muestras sólidas, líquidas o gaseosas.



Figura 3. Sistema acoplado Desorción Térmica o Purga Trampa – Cromatógrafo de Gases – Espectrómetro de Masas.

Fisons Instruments modelo MD800 incorporando también de serie un cromatógrafo de gases (split/splitless) modelo GC8000, la fragmentación se produce bien por impacto electrónico o por ionización química positiva o negativa, analizador de cuadrupolo (baja resolución) y también dispone de librería para la identificación de los compuestos. Dispone de un automuestreador AS2000 con capacidad para 90 muestras.

Espectrómetro de masas Agilent, modelo 5973 Network, Mass Selective con introducción directa de la muestra a la fuente iónica por medio de la sonda SIS (Scientific Instrument Services) Direct Insertion Probe. (73DIP-1) (Figura 4). El Espectrómetro de Masas está previsto de una única fuente de impacto electrónico así como de un analizador cuadrupolar. Este es un método universalmente empleado en Espectrometría de Masas para analizar compuestos puros.



Figura 4. Espectrómetro de Masas con sonda

Espectrómetro de masas Agilent 5973N de baja resolución con analizador de cuadrupolo acoplado a un cromatógrafo de gases (Agilent 6890N) para columnas capilares con dos inyectores, uno split/splitless y otro PTV (inyector de temperatura variable). La ionización de las muestras se puede realizar tanto en impacto electrónico como en ionización química positiva o negativa. El equipo incorpora un inyector automático (Agilen 7683) con bandeja muestradora con capacidad para 100 viales. Para la identificación de compuestos se dispone de una librería Wiley.

Sistema de espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo y desorción mediante láser asistida por matriz (MALDI-TOF), BRUKER Daltonics modelo Autoflex (Figura 5). Se utiliza para el análisis de moléculas de peso molecular elevado y termolábiles. El equipo se utiliza para el análisis de macromoléculas y polímeros en general, drogas, metabolitos, péptidos y proteínas



Figura 5. Espectrómetro de Masas MALDI-TOF

Un cromatógrafo líquido de alto rendimiento de Agilent modelo 1100 Series acoplado simultáneamente a un detector de longitud de onda variable visible-UV y a un espectrómetro de masas con analizador de trampa de iones (Agilent modelo 1100 Series LC/MSD Trap SL) con posibilidad de realizar MS/MS y rango de masas de 50 a 3000 u mas. Este equipo dispone también de automuestreador para 100 muestras. La interfase es intercambiable a elegir entre ionización por electroespray (ESI, el proceso de ionización tiene lugar en la fase líquida) o ionización química a presión atmosférica (APCI, el proceso de ionización tiene lugar en la fase gaseosa) dependiendo fundamentalmente de la polaridad del analito y de su peso molecular. Esta técnica LC/MS es ideal en estudios de alimentos, lípidos, proteínas y aminoácidos, vitaminas, metabolismo de fármacos, estabilidad de productos, elucidación de productos naturales, análisis forense,... así como en la determinación del peso molecular y la estructura molecular de compuestos orgánicos e inorgánicos no volátiles o de elevado peso molecular.

Los espectros de masas se obtienen por conversión de los componentes de una muestra en iones gaseosos que se mueven rápidamente y se separan en función de su relación masa-carga. La espectrometría de masas es probablemente de entre todas las herramientas analíticas al alcance del científico la de aplicación más general en el sentido que la técnica es capaz de suministrar información sobre (1) la composición cualitativa y cuantitativa tanto de analitos orgánicos como inorgánicos en muestras complejas, (2) las estructuras de una amplia variedad de especies moleculares complejas, (3) las relaciones isotópicas de los átomos en las muestras y (4) la estructura y composición de superficies sólidas.

La ubicuidad de la espectrometría de masas (MS = Mass spectroscopy) se ilustra en la Tabla .1, que muestra el desarrollo de la técnica desde 1920. Es interesante observar que todas las aplicaciones que se indican todavía se utilizan en los laboratorios modernos.

Desarrollo	Fecha aproximada	Aplicación
Comportamiento de los iones en campos magnéticos descritos.	1920	Determinación de la abundancia isotópica de un elemento.
Doble enfoque.	1935	Se alcanza la resolución de masas elevadas.
Primer espectrómetro de masas comercial.	1950	Análisis cuantitativo de productos del petróleo.
Fuente de chispa.	1955	Análisis cuantitativo elemental.

Tabla 1. Evolución de la espectrometría de masas

En primer lugar, debe señalarse que los pesos atómicos y moleculares utilizados en la bibliografía de espectrometría de masas, y en este capítulo, difieren de los utilizados en la mayoría de los otros métodos analíticos, ya que los espectrómetros de masas discriminan entre la masa de los isótopos, mientras que otros instrumentos analíticos generalmente no lo hacen. Por tanto, se revisarán brevemente algunos términos relacionados con los pesos atómicos y moleculares.

Los pesos atómicos y moleculares se expresan generalmente en términos de unidades atómicas de masa (uma). La unidad atómica de masa se basa en una escala relativa en la que la referencia es el isótopo del carbono ^{12}C , al cual se le asigna una masa de exactamente 12 umas. Así, el uma se define como $1/12$ de la masa de un átomo neutro de ^{12}C . Los espectroscopistas de masas también llaman al uma dalton. Estas definiciones nos llevan a que 1 uma, o 1 dalton, de carbono sea igual a

$$\begin{aligned} 1 \text{ uma} &= 1 \text{ dalton} = 1/12 \cdot (12 \text{ g } ^{12}\text{C}/\text{mol } ^{12}\text{C} / 6.0221 \times 10^{23} \text{ átomos } ^{12}\text{C}/\text{mol } ^{12}\text{C}) \\ &= 1.66054 \times 10^{-24} \text{ g/átom } ^{12}\text{C} = 1.66054 \times 10^{-27} \text{ kg/átom } ^{12}\text{C} \end{aligned}$$

El peso atómico de un isótopo, tal como el ^{35}Cl , se puede relacionar con el átomo de referencia ^{12}C por comparación de las masas de los dos isótopos. Esta comparación revela que el isótopo cloro 35 tiene una masa que es 2.91407 veces mayor que la masa del isótopo del carbono. Así, la masa atómica del isótopo del cloro es

$$\text{masa atómica } ^{35}\text{Cl} = 12.0000 \text{ dalton} \times 2.91407 = 34.9688 \text{ dalton}$$

Debido a que 1 mol de ^{12}C pesa 12.0000 g, el peso atómico del ^{35}Cl es 34.9688 g/mol.

En espectrometría de masas, a diferencia de lo que ocurre normalmente en química, se está a menudo interesado en la masa exacta m de los isótopos de un elemento o en la masa exacta de los compuestos que contienen un grupo particular de isótopos. Así, se puede tener la necesidad de distinguir entre las masas de compuestos tales como

$$^{12}\text{C } ^1\text{H}_4 \quad m = 12.000 \times 1 + 1.007825 \times 4 = 16.031 \text{ dalton}$$

$$^{13}\text{C } ^1\text{H}_4 \quad m = 13.00335 \times 1 + 1.007825 \times 4 = 17.035 \text{ dalton}$$

$$^{12}\text{C } ^1\text{H}_3 \text{ } ^2\text{H}_1 \quad m = 12.000 \times 1 + 1.007825 \times 3 + 2.0140 \times 1 = 17.037 \text{ dalton}$$

Normalmente, en espectrometría de masas, las masas exactas se expresan con tres o cuatro decimales, ya que los espectrómetros de masas de alta resolución tienen esta precisión.

En algunos contextos, se usa el término masa nominal, que implica una precisión de un número entero en una medida de masa. Así, las masas nominales de los tres isómeros antes citados son 16, 17 y 17 daltons, respectivamente.

El peso atómico o el peso atómico promedio (A) de un elemento en la naturaleza viene dada por la ecuación

$$A = A_1p_1 + A_2p_2 + \dots + A_np_n$$

donde A_1, A_2, \dots, A_n son las masas atómicas en daltons de los n isótopos de un elemento y p_1, p_2, \dots, p_n son las abundancias de estos isótopos en la naturaleza. El peso atómico químico es, naturalmente, el peso que interesa a los químicos en la mayoría de las ocasiones. El peso molecular promedio o químico de un compuesto es por tanto la suma de los pesos atómicos químicos para los átomos que aparecen en la fórmula del compuesto. Así, el peso molecular químico de CH_4 es $12.01115 + 4 \times 1.00797 = 16.0434$ daltons.

Otro término que se utiliza a lo largo de este capítulo es la relación masa/carga de un ion atómico o molecular. Este término se obtiene dividiendo la masa atómica o molecular de un ion m por el número de cargas z que tiene el ion. Así, para $^{12}\text{C}^1\text{H}_4^+$, $m/z = 16.035/1 = 16.035$. Para $^{13}\text{C}^1\text{H}_4^{2+}$, $m/z = 17.035/2 = 8.518$. Debido a que la mayoría de los iones en espectrometría de masas tienen una carga unidad, el término masa/carga a menudo se reduce al término más adecuado de masa. Estrictamente hablando, esta abreviatura no es correcta pero se utiliza ampliamente en la bibliografía de espectrometría de masas.

5.1. EL ESPECTRÓMETRO DE MASAS

Los fundamentos de las medidas espectrales de masas son sencillos y fácilmente comprensibles; aunque desafortunadamente, esta simplicidad no se extiende a la instrumentación. Un espectrómetro de masas de alta resolución típico es un montaje electrónico y mecánico complejo que es caro (de 60 000 a 500 000 euros o más) tanto en términos de adquisición inicial como en operación y mantenimiento.

El diagrama de bloques de la Figura 6 muestra los componentes principales de los espectrómetros de masas. El objetivo del sistema de entrada es de introducir una pequeña cantidad de muestra (un micromol o menos) en el espectrómetro de masas, donde sus componentes se convierten en iones gaseosos. A menudo, el sistema de entrada contiene un medio para la volatilización de muestras sólidas o líquidas.

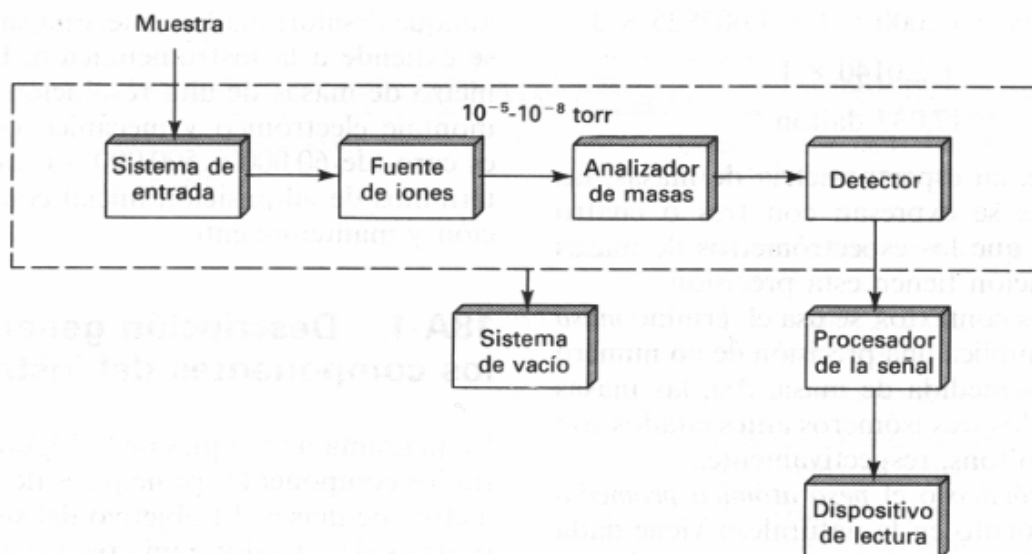


Figura 6. Componentes de un espectrómetro de masas

La fuente de iones de un espectrómetro de masas convierte los componentes de una muestra en iones por bombardeo con electrones, iones, moléculas o fotones. Alternativamente, la ionización se lleva a cabo por energía térmica o eléctrica. En muchos casos el sistema de entrada y la fuente de iones están combinadas en un único componente. En ambos casos, lo que se obtiene es un haz de iones positivos o negativos (frecuentemente positivos) que es entonces acelerado en el analizador de masas.

La función del analizador de masas es parecida a la de la rejilla de un espectrómetro óptico. En el primero, sin embargo, la dispersión está basada en las relaciones carga/masa de los iones del analito en vez de en la longitud de onda de los fotones. Existen diversos tipos de espectrómetros de masas, dependiendo de la naturaleza del analizador de masas.

Al igual que en un espectrómetro óptico, un espectrómetro de masas contiene un detector (para iones) que convierte el haz de iones en una señal eléctrica que puede ser entonces procesada, almacenada en la memoria de un ordenador y mostrada o registrada de varias maneras. Un hecho característico de los espectrómetros de masas, que no es común con los instrumentos ópticos (pero que se encuentra en los espectrómetros de electrones), es la necesidad de un sistema de vacío adecuado para mantener bajas presiones (10^{-4} a 10^{-5} torr) en todos los componentes del instrumento excepto el procesador de señal y dispositivo de lectura.

En la discusión que sigue, se describen primero los sistemas de entrada, los sistemas de vacío y los diferentes tipos de fuentes de iones. A continuación se verán los diferentes tipos de analizadores de masas que dan lugar a diferentes tipos de espectrómetros de masas así como detectores. Finalmente se describen los diferentes espectros producidos según el tipo de fuente de iones así como las aplicaciones de la espectrometría de masas.

5.1.1. Sistemas de entrada de muestra

La finalidad del sistema de entrada es la de permitir la introducción de una muestra representativa en la fuente de iones con la mínima pérdida de vacío. Los

espectrómetros de masas más modernos están equipados con dos tipos de entradas capaces de acomodar diversos tipos de muestras, que incluyen sistemas de entrada, de sonda directa y entradas cromatográficas.

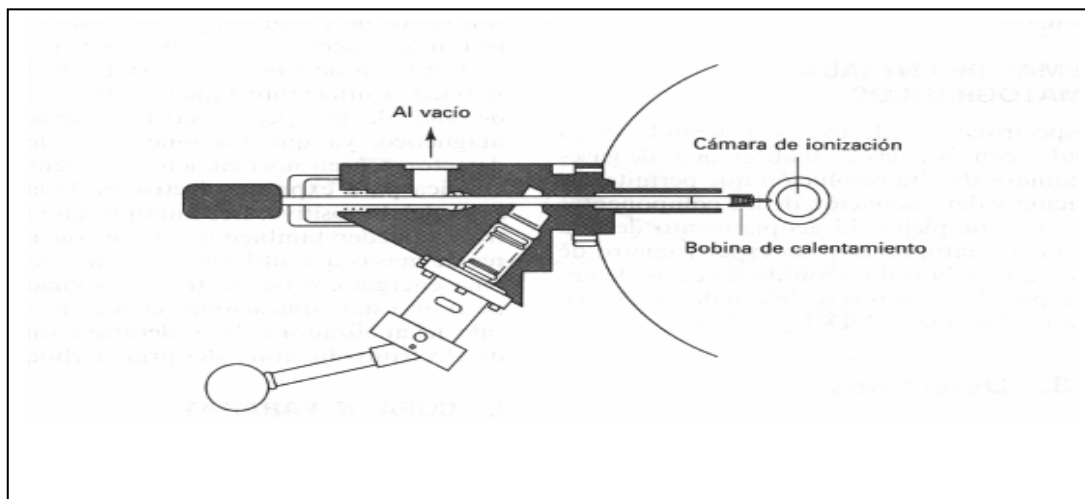


Figura 7. Esquema de un sistema de introducción de muestra por sonda para introducir una muestra en la fuente de iones (DIP).

5.1.1.1. Entrada por sonda directa

Los líquidos y sólidos no volátiles se pueden introducir en la región de ionización mediante un soporte de muestra o sonda, el cual se inserta a través de una cámara intermedia de vacío (véase Figura 7). La cámara intermedia está diseñada para limitar el volumen de aire que puede entrar en la región de ionización durante la inserción de la sonda. Las sondas se utilizan también cuando la cantidad de muestra es limitada. Por tanto, los espectros de masas se pueden obtener a menudo con una cantidad de muestra tan pequeña como unos pocos nanogramos.

En una sonda, la muestra se pone generalmente en la superficie de un vidrio o en un tubo capilar de aluminio, un alambre fino o una copa pequeña y la sonda se coloca a unos pocos milímetros de la fuente de ionización y de la rendija que conduce al espectrómetro.

La baja presión del área de ionización y la proximidad de la muestra a la fuente de ionización a menudo hace posible la obtención de espectros de compuestos inestables térmicamente antes que se descompongan. La baja presión proporciona también una mayor concentración de compuestos relativamente no volátiles en el área de ionización, de modo que, la sonda permite el estudio de materiales no volátiles tales como carbohidratos, esteroides, especies organometálicas y sustancias poliméricas de bajo peso molecular. El requisito principal de la muestra es que alcance una presión parcial de al menos 10^{-8} torr antes que empiece a descomponerse.

5.1.1.2. Sistemas de entrada cromatográficos

Los espectrómetros de masas a menudo están acoplados con sistemas cromatográficos de gases o de líquidos de alta resolución que permiten la separación y determinación de los componentes de mezclas complejas. El acoplamiento de una columna cromatográfica a un espectrómetro de masas requiere la utilización de sistemas de entrada especiales, algunos de los cuales se describen a continuación.

Cromatografía de gases / Espectrometría de masas. Algunos fabricantes de instrumentos ofrecen equipos de cromatografía de gases que pueden acoplarse directamente con distintos tipos de espectrómetros de masas de barrido rápido. El caudal de las columnas capilares en general es suficientemente bajo como para que la salida de la columna pueda introducirse directamente en la cámara de ionización de un espectrómetro de masas. Desde finales de los años setenta han aparecido en el mercado diversos espectrómetros de masas diseñados específicamente como detectores para cromatografía de gases.

Cromatografía HPLC / Espectrometría de masas. Un problema fundamental del acoplamiento de la cromatografía de líquidos con la espectrometría de masas es el enorme contraste que existe entre los volúmenes relativamente grandes de disolvente de la primera y los requerimientos de vacío de la última. Para resolver este problema se han desarrollado diversas interfaces. Algunas de las técnicas de acoplamiento se utilizaron durante un tiempo y hoy están en desuso, como la DLI = Direct Liquid Inlet o la Moving Belt (cinta móvil)

Las técnicas que se usan rutinariamente en la actualidad para la introducción y análisis de muestras líquidas por espectrometría de masas pueden clasificarse en dos grupos: las que solo introducen la muestra líquida en la fuente iónica del instrumento tales como las de haz de partículas (PB, Particle Beam) y las que además consiguen la ionización de la misma (TSP = Thermospray o termonebulización, LC-FAB = Liquid chromatography - Fast Atom Bombardment, ESI= Electrospray Ionization). En la Tabla 2 se muestran algunas de las ventajas e inconvenientes de cada una de ellas.

Tabla 2. Ventajas e inconvenientes de las interfaces LC/MS. Mayor número de estrellas indica mayor rendimiento. Entre paréntesis se indica el rango de la respuesta.

Tipo	Límite de detección	Rango de flujo del LC	Tipos de disolventes	Muestras semivolátiles	Muestras no volátiles / termolábiles	Rango pesos molec.
DLI	**	*	***	****	**	**
Cinta	**	*****	*****	*****	*	*(*)
TSP	**(**)	*****	****	*****	***(*)	***(*)
LC/FAB	**(**)	*	***	****	*****	****
PB	**	***(*)	****	*****	*(*)	*(*)
ESI	****(*)	*	**(*)	****	*****	*****

5.1.2. Fuentes de iones

Históricamente, los iones para análisis de masas se producían por bombardeo de los componentes de muestras gaseosas con electrones de elevada energía. A pesar de ciertas desventajas, esta técnica todavía tiene una gran importancia y es en la que se basan la mayor parte de las bibliotecas de espectros. Sin embargo, durante las dos últimas décadas se han desarrollado varias nuevas fuentes de iones que ofrecen ciertas ventajas sobre la clásica fuente de haz de electrones. La Tabla 3 da un listado de estas nuevas fuentes y de las fechas aproximadas en las que empezaron a utilizarse. Normalmente, la mayoría de los espectrómetros de masas comerciales están equipados con accesorios que permiten el uso de varias de estas fuentes intercambiables.

Tabla 3. Fuentes de espectrometría de masas

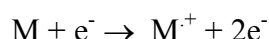
Nombre	Abreviatura	Tipo	Agente ionizante	Fecha de utilización ininterrumpida
Ionización por electrones	EI	Fase gas	Electrones energéticos	1920
Ionización química	CI	Fase gas	Iones reactivos	1965
Ionización por campo	FI	Fase gas	Electrodo de elevado potencial	1970
Desorción por campo	FD	Desorción	Electrodo de elevado potencial	1969
Bombardeo con átomos rápidos	FAB	Desorción	Átomos energéticos	1981
Espectrometría de masas de iones secundarios	SIMS	Desorción	Iones energéticos	1977
Desorción por láser	LD	Desorción	Haz de láser	1978
Desorción por plasma	PD	Desorción	Fragmentos de fisión de elevada energía del ^{252}Cf	1974
Desorción térmica		Desorción	Calor	1979
Ionización electrohidrodinámica	EHMS	Desorción	Campo elevado	1978
Ionización por termovaporización	ES		Cargas positivas aplicadas sobre finas gotitas de la disolución de la muestra	1985

Nótese que las fuentes que se indican en la Tabla 3 pertenecen a dos categorías. La primera corresponde a las *fuentes de fase gas* en las que la muestra es primero volatilizada y a continuación los componentes gaseosos son ionizados de diversas maneras. La segunda categoría de fuentes es la de *fuentes de desorción* en la que se prescinde de la vaporización de la muestra y en consecuencia, esta técnica requiere siempre la utilización de una sonda de muestra. En este caso, la energía se transmite a la muestra sólida o líquida, de maneras muy diversas produciendo la ionización y la transferencia directa de iones de la fase condensada al estado gaseoso iónico. La mayor ventaja de la ionización por desorción es que permite el examen de moléculas no volátiles y térmicamente inestables tales como las que se encuentran normalmente en bioquímica. Las fuentes de iones se clasifican a menudo en *duras o blandas*. La fuente dura más importante es la fuente de impacto de electrones, que se discute a continuación. Las fuentes duras comunican energías elevadas a los iones formados de manera que se encuentran en estados vibracionales y rotacionales excitados. La relajación de estos iones produce una gran cantidad de fragmentación y resultan espectros de masas complejos. Por el contrario, las fuentes blandas, tales como las fuentes de ionización química y la de desorción, producen relativamente poca excitación de los iones, de modo que, tiene lugar poca fragmentación, y los espectros son sencillos. Ambos tipos de espectros son útiles. Los espectros sencillos de las fuentes blandas permiten la determinación exacta del peso molecular del analito, mientras que los modelos espectrales más complejos de las fuentes duras a menudo permiten una identificación inequívoca del mismo. A continuación se hace una pequeña descripción de las fuentes más utilizadas actualmente.

5.1.2.1. Fuentes de impacto de electrones (EI)

Las tres primeras fuentes que se indican en la Tabla 3 requieren la volatilización de la muestra antes de la ionización. Por tanto, las fuentes de fase gas tan sólo se pueden usar para compuestos estables térmicamente que tengan puntos de ebullición menores de aproximadamente 500 °C. En la mayoría de los casos, las fuentes gaseosas están limitadas a compuestos con pesos moleculares menores de aproximadamente 10³ daltons.

La Figura 8 muestra el diagrama de una fuente de iones de impacto de electrones sencilla. Los electrones son emitidos por un filamento caliente de tungsteno o renio y son acelerados por un potencial de aproximadamente 70 V que se aplica entre el filamento y el ánodo. Como se muestra en la Figura 8, las trayectorias de los electrones y las moléculas están en ángulo recto y se cruzan en el centro de la fuente, donde colisionan y tiene lugar la ionización. El producto primario son iones de una única carga positiva que se forman cuando los electrones de elevada energía se acercan suficientemente a las moléculas como para causarles la pérdida de electrones por repulsiones electrostáticas. La ionización por impacto de electrones no es muy eficaz y sólo alrededor de una molécula entre un millón experimenta la reacción primaria:



donde M representa la molécula de analito y M⁺ es su *ion molecular*. Como indica el punto, el ion molecular es un *ion radical* que tiene el mismo peso molecular que la molécula. Los iones positivos producidos en un impacto de electrones son atraídos a través de la rendija hacia la primera placa de aceleración mediante una pequeña diferencia de potencial (normalmente 5 V) que se aplica entre esta placa y los

repulsores que se muestran en la Figura 8. En los instrumentos de sector magnético, se aplican potenciales elevados (10^3 a 10^4 V) a las placas aceleradoras, que permiten a los iones adquirir sus velocidades finales antes que entren en el analizador de masas.

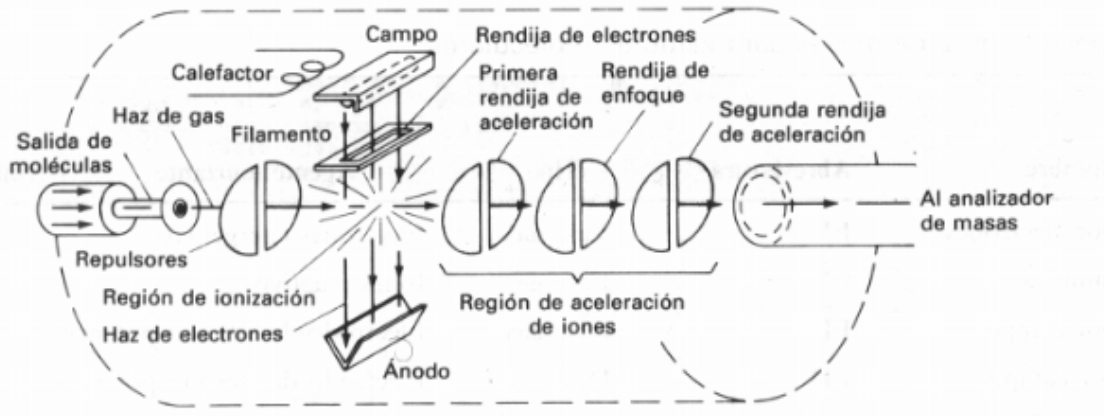


Figura 8. Fuente de impacto electrónico.

Con el objeto de formar un número significativo de iones gaseosos en una proporción reproducible, es necesario que los electrones generados por el filamento de la fuente sean acelerados por un potencial mayor de unos 50 V. La pequeña masa y la alta energía cinética de los electrones resultantes produce aumentos muy pequeños en la energía traslacional de las moléculas con las que chocan. Sin embargo, estas moléculas adquieren estados vibracionales y rotacionales excitados. La subsecuente relajación tiene lugar normalmente mediante una elevada fragmentación, que da lugar a un gran número de iones positivos de varias masas que son menores que (y en ocasiones mayores que) la del ion molecular. Estos iones se llaman *iones descendientes o hijos*. La Tabla 4 muestra algunas reacciones de fragmentación típicas que se producen después de la formación por impacto de electrones de un ion progenitor de una molécula ABCD.

Tabla 4. Algunas reacciones típicas en una fuente de impacto electrónico

Formación del ion molecular	$ABCD + e^- \rightarrow ABCD^+ + 2e^-$
Fragmentación	$ABCD^+ \rightarrow A^+ + BCD$ $\quad \quad \quad \rightarrow A + BCD^+ \rightarrow BC^+ + D$ $\quad \quad \quad \rightarrow CD + AB^+ \rightarrow B + A^+$ $\quad \quad \quad \quad \quad \quad \rightarrow A + B^+$ $\quad \quad \quad \rightarrow AB + CD^+ \rightarrow D + C^+$ $\quad \quad \quad \quad \quad \quad \rightarrow C + D^+$
Reordenamiento seguido de fragmentación	$ABCD^+ \rightarrow ADBC^+ \rightarrow BC + AD^+$ $\quad \quad \quad \quad \quad \quad \rightarrow AD + BC^+$
Colisión seguida de fragmentación	$ABCD^+ + ABCD \rightarrow (ABCD)_2^+ \rightarrow BCD + ABCDA^+$

5.1.2.2. Fuentes de ionización química (CI = Chemical ionisation)

Los espectrómetros de masas más modernos están diseñados para poder intercambiar esta fuente con la de impacto de electrones. En ionización química, las moléculas gaseosas de la muestra (tanto de un sistema discreto como de una sonda caliente) son ionizadas por colisión con los iones producidos por el bombardeo con electrones de un exceso de un gas reactivo. Normalmente se utilizan iones positivos, pero la ionización química de iones negativos se utiliza ocasionalmente con analitos que contienen átomos muy electronegativos. La ionización química es probablemente el segundo de los procedimientos más comunes para la producción de iones en espectrometría de masas.

Para llevar a cabo experimentos de ionización química, es necesario modificar el área de ionización del haz de electrones que se muestra en la Figura 8 poniendo una bomba de vacío y reduciendo la anchura de la rendija que conduce al analizador de masas. Estas medidas permiten mantener unas presiones de gas reactivo de alrededor de 1 torr en el área de ionización mientras se mantiene la presión en el analizador por debajo de 10^{-5} torr. Con estos cambios, se introduce un reactivo gaseoso en la región de ionización en una cantidad tal que la relación de concentración entre el reactivo y la muestra sea de 10^3 a 10^4 . Debido a esta elevada diferencia de concentraciones, el haz de electrones reacciona casi exclusivamente con las moléculas de reactivo.

Uno de los reactivos más comunes es el metano, que reacciona con electrones de elevada energía para dar varios iones como CH_4^+ , CH_3^+ y CH_2^+ . Los dos primeros predominan y representan alrededor del 90% de los productos de reacción. Estos iones reaccionan rápidamente con moléculas de metano adicionales siguiendo un esquema de reacciones que dan el ion $(M + 1)^+$ o el ion $(M - 1)^+$ de la muestra.

Una gran variedad de reactivos, tales como propano, isobutano y amoníaco, se utilizan para la ionización química y cada uno de ellos produce un espectro diferente con un analito dado.

5.1.2.3. Fuentes de ionización a presión atmosférica (API)

La Ionización a Presión Atmosférica (API) es una técnica de ionización blanda que, al actuar a presión atmosférica, y no en alto vacío como es lo habitual en otras técnicas, consigue un altísimo rendimiento. Como interfase para HPLC, tiene la virtud de aceptar todo el flujo procedente de un cromatógrafo líquido de alta presión convencional, hasta 1 a 4 mL/min., lo que incide favorablemente sobre la sensibilidad del proceso LC-MS. En general, ionizan la muestra a presión atmosférica, eliminan el disolvente, se ioniza el analito y se traslada los iones al MS. En la figura 9 se muestra el mecanismo de evaporación iónica para técnicas a presión atmosférica.

Las dos ionizaciones API más comúnmente utilizadas son el “Electrospray, (ESI)”, y la “Ionización Química a Presión Atmosférica, APcI”.

En la ionización ESI se aplica una tensión de 3-6 KV entre el capilar de entrada de la muestra y el contraelectrodo. Por efecto del intenso gradiente de campo eléctrico presente, la muestra emerge del capilar de entrada en forma de un aerosol de pequeñas gotas, que adquieren una carga eléctrica muy elevada. Al avanzar estas gotas por la cámara de desolvatación, llega un momento en que su tamaño es tan pequeño, que las fuerzas coulombianas de repulsión entre los iones con múltiple carga generados en su interior son capaces de vencer la tensión superficial, momento en que los iones escapan a la fase gaseosa denominándose a este proceso evaporación iónica. Una característica

de esta técnica es que al producir una enorme abundancia de iones con carga múltiple, pueden determinarse masas moleculares de moléculas muy grandes como proteínas.

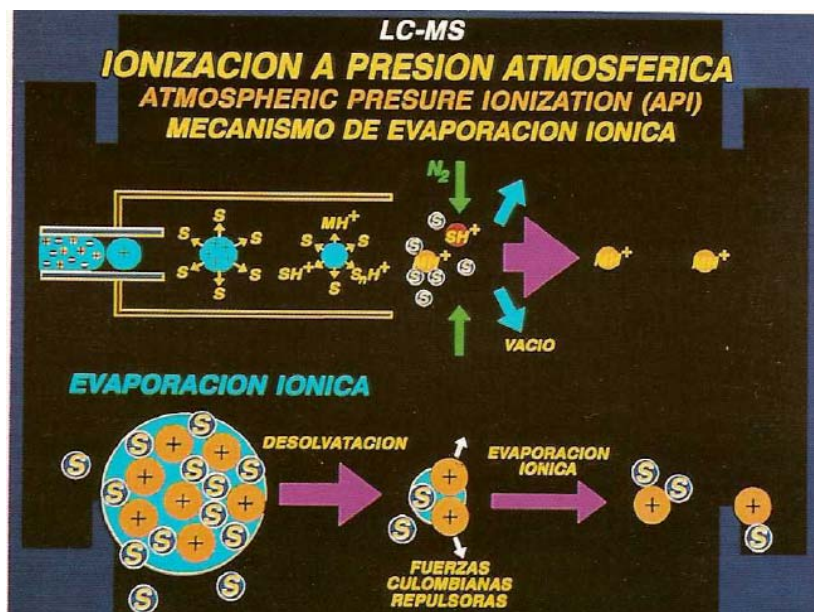


Figura 9. Mecanismo de evaporación iónica para técnicas API.

En la ionización API el procedimiento de formación del spray es el mismo pero ahora lo que se produce es una fuerte descarga en la fuente que produce un plasma de iones reactivos del disolvente que origina el mecanismo de ionización de la muestra por ionización química (CI), normalmente por adición o cesión de un protón. Este mecanismo, que coexiste con el de evaporación iónica, produce abundantes iones $(M+H)^+$ positivos, y $(M-H)^-$ negativos.

5.1.2.4. Fuentes de ionización de campo (FI = Field ionisation)

En las fuentes de *ionización de campo*, los iones se forman bajo la influencia de un campo eléctrico elevado (10^8 V/cm). Tales campos se producen al aplicar altos voltajes (10 a 20 kV) a emisores especialmente contruidos que consisten en numerosas puntas finas que tienen diámetros menores que $1 \mu\text{m}$. Estos emisores a menudo adquieren la forma de un fino hilo de tungsteno ($10 \mu\text{m}$ de diámetro) en el cual se han hecho crecer agujas o pinchos microscópicos de carbón por pirólisis de benzonitrilo en un campo eléctrico elevado. El resultado de este tratamiento es la aparición de centenares de micropuntas de carbón que emergen desde la superficie del hilo.

Los emisores de ionización de campo se montan a una distancia de 0,5 a 2 mm del cátodo, el cual a menudo también sirve de rendija. La muestra gaseosa de un sistema de entrada discreto puede difundirse en el área de campo elevado alrededor de las micropuntas del ánodo. El campo eléctrico se concentra en las puntas emisoras y tiene lugar la ionización vía un mecanismo de mecánica cuántica de túnel en el que los electrones del analito son extraídos por las micropuntas del ánodo. En este caso el analito adquiere poca energía vibracional y rotacional; por lo que tiene lugar poca fragmentación.

5.1.2.5. Fuentes de desorción de campo (FD = Field desorption)

Los métodos de ionización descritos requieren que los agentes de ionización actúen sobre muestras gaseosas. Tales métodos no son aplicables a muestras no volátiles o térmicamente inestables. Se han desarrollado en las dos últimas décadas un número de métodos de *ionización de desorción* para tratar este tipo de muestras (véase Tabla 3). Como consecuencia, actualmente se puede obtener información sobre espectros de masas de especies bioquímicas delicadas y especies que tienen pesos moleculares superiores a 10 000 daltons.

Los métodos de desorción prescinden de la volatilización y de la subsecuente ionización. En su lugar, se suministra energía a la muestra sólida o líquida de diversas maneras de modo que se provoca la formación directa de iones gaseosos. Como consecuencia, los espectros aparecen muy simplificados y a menudo consisten sólo en el ion molecular o el ion molecular protonado. En este apartado y en el siguiente se describen algunos de estos métodos.

En la desorción de campo, se utiliza un emisor con múltiples puntas similar al descrito en la sección anterior. En este caso, el electrodo se monta sobre una sonda que puede separarse del compartimento de muestra y mojarse con una solución de la muestra. Después la sonda se reinserta en el compartimento de la muestra, la ionización tiene lugar por la aplicación de un potencial elevado a este electrodo. Con algunas muestras es necesario calentar el emisor haciendo pasar una corriente. Como consecuencia puede ocurrir una degradación antes de completarse la ionización.

5.1.2.6. Fuentes de bombardeo por átomos rápidos (FAB=Fast Atom Bombardment) o iones (SIMS = Secondary ion MS)

Al bombardear la superficie de una muestra sólida con un haz de iones primarios se origina la emisión de iones secundarios característicos de la muestra. El análisis de estos iones secundarios por medio de un espectrómetro de masas constituye la técnica SIMS muy utilizada para analizar superficies sólidas metálicas. Sin embargo la técnica SIMS no ha sido muy utilizada para analizar muestras orgánicas por razones tales como su carácter destructivo, la aparición de cargas superficiales al ser muestras eléctricamente aislantes, etc.

Al bombardear la superficie de un líquido con un haz de átomos rápidos se produce la desorción continua de iones característicos del líquido. Si se disuelve una muestra en un disolvente, el bombardeo produce iones moleculares positivos y negativos de la muestra. Esta técnica de bombardeo, que es en realidad una variante de la SIMS, se denomina FAB o bombardeo con átomos rápidos.

Las fuentes de bombardeo por átomos rápidos (FAB) han adquirido un papel importante en la producción de iones para el estudio por espectrometría de masas de especies de elevado peso molecular. Con este tipo de fuentes, las muestras en un estado condensado, a menudo en una matriz de una disolución de glicerol, se ionizan por bombardeo con átomos de elevada energía (varios keV) de xenón o argón. Tanto los iones positivos como negativos del analito son expulsados de la superficie de la muestra por un proceso de desorción. Este tratamiento permite un calentamiento muy rápido de la muestra, lo que reduce su fragmentación. La matriz líquida ayuda a reducir la energía reticular, la cual debe ser vencida para que se desorba un ion de la fase condensada y proporcione una manera de eliminar el efecto producido por el bombardeo.

Los haces de átomos rápidos se obtienen haciendo pasar iones acelerados de argón o xenón de una fuente de iones, o una sonda, a través de una cámara que contiene

átomos de argón o de xenón a una presión de aproximadamente 10^{-5} torr. Los iones con elevada velocidad experimentan una reacción de intercambio de electrones en resonancia con los átomos sin que se produzca una pérdida sustancial de energía traslacional, de modo que se forma un haz de átomos de alta energía. Los iones de baja energía resultado del intercambio se eliminan rápidamente al ser desviados electrostáticamente.

El bombardeo de compuestos orgánicos o bioquímicos por átomos rápidos normalmente produce cantidades significantes de iones moleculares (al igual que fragmentos) incluso para muestras de elevado peso molecular y térmicamente inestables.

5.1.3 Sistemas de vacío

Para que el proceso descrito, que se verifica en el interior del espectrómetro de masas, pueda realizarse con éxito, debe hacerse en un ambiente de alto vacío, donde el recorrido libre medio de las moléculas y de los iones formados sea consistente con la longitud de la trayectoria que deben recorrer en su camino hasta el detector. En otras palabras, si un ión formado en la fuente de ionización debe recorrer una trayectoria de un metro para alcanzar el detector, el interior del espectrómetro por donde debe volar el ión debe estar evacuado a un vacío suficiente para asegurar la ausencia de colisiones en su camino.

Los principales tipos de bombas que se utilizan para conseguir el alto vacío en espectrometría de masas son las difusoras y las turbomoleculares sin olvidar las mecánicas o rotatorias que son las que se necesitan para hacer los vacíos preliminares que requieren las difusoras y las turbomoleculares para empezar a trabajar.

El principio de funcionamiento de las bombas difusoras de fraccionamiento se muestra en la figura 10. El aceite depositado en la parte inferior de la bomba es calentado por una placa calefactora. Al producirse la ebullición, los vapores de aceite suben por las “chimeneas” concéntricas hasta encontrarse con una salida lateral escapando en forma de chorro supersónico, yendo a chocar contra las paredes laterales refrigeradas por un circuito de agua, donde condensarán, volviendo a caer al depósito inferior. En su camino hacia la pared atraparán moléculas de aire o cualquier gas presente en el ambiente a evacuar, reduciendo poco a poco la presión. En ciclos sucesivos, el aceite se va fraccionando, quedando la parte más ligera o volátil en la zona exterior, y la más pesada en el interior. Los componentes ligeros que quedan en la zona exterior son fácilmente eliminados por la bomba rotativa de apoyo, mientras que la fracción más pesada y pura del aceite se va concentrando en la zona interior.

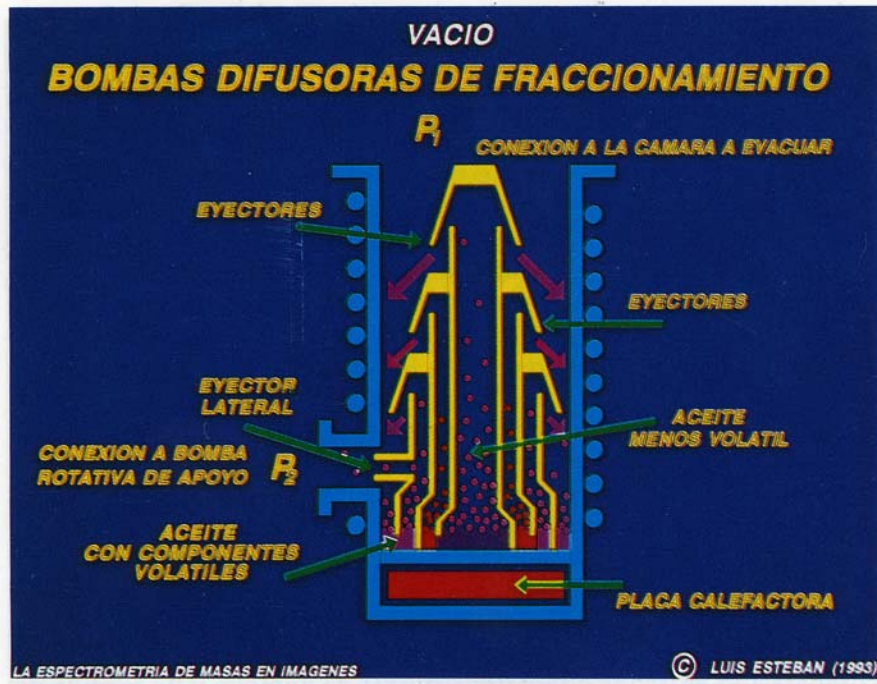


Figura 10. Bombas difusoras de fraccionamiento

En cuanto al funcionamiento de las bombas turbomoleculares, figura 11, las aspas del rotor de la bomba están girando a gran velocidad. Cuando las moléculas gaseosas, procedentes de la cámara que se está evacuando a alto vacío, chocan con las aspas, reciben un componente adicional de velocidad en dirección a la cámara inferior, esta cámara está a su vez evacuada por una bomba rotativa mecánica. Si la velocidad de las astas del rotor es del mismo orden que la velocidad de agitación térmica de las moléculas a evacuar, el proceso será muy eficiente, y se conseguirá una buena relación de compresión entre la zona de prevacío y la de alto vacío.

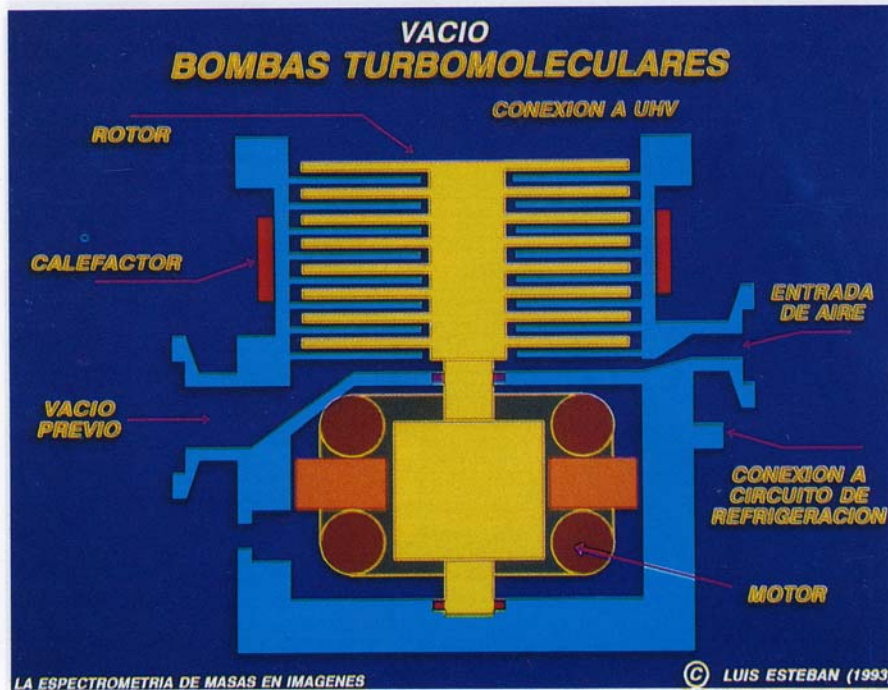


Figura 11. Bombas turbomoleculares

En la figura 12 podemos ver un resumen de las principales ventajas e inconvenientes de estos dos sistemas de bombeo. En cuanto al peligro potencial de contaminación por el aceite de vacío de las bombas difusoras, hoy en día no es un factor a tener muy en cuenta, ya que la utilización de aceites especiales y de sistemas de protección automática contra accidentes de vacío, suministro de corriente eléctrica, o fallos del circuito de refrigeración, hacen de este sistema de bombeo un método muy seguro.

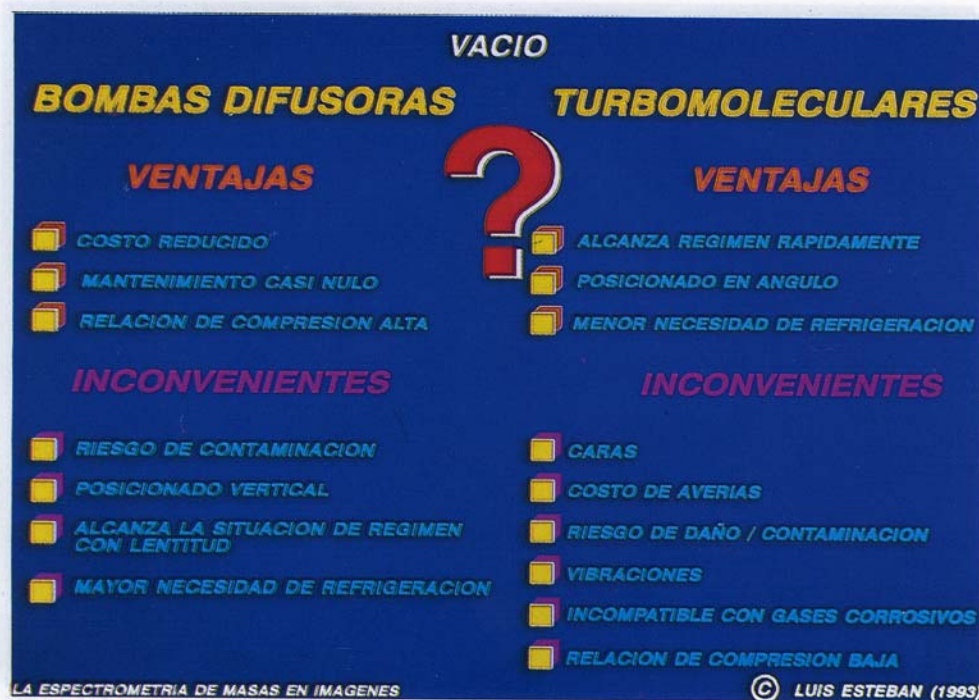


Figura 12. Ventajas e inconvenientes del uso de bombas turbomoleculares o difusoras

Otro tipo de bombas menos utilizadas son las iónicas, las de sublimación de titanio y las criogénicas todas ellas utilizadas para conseguir condiciones de ultra-alto vacío. En todos los equipos de masas de estos servicios los vacíos están en torno a 10^{-6} torr.

5.1.4. Analizadores de masa

Para la separación de iones con diversas relaciones masa/carga son posibles varios métodos. Idealmente, un analizador debería ser capaz de distinguir entre diferencias muy pequeñas de masa. Además, los analizadores deberían permitir el paso del suficiente número de iones para dar lugar a corrientes de iones fácilmente medibles. Sin embargo, estas dos propiedades no son totalmente compatibles y siempre se debe llegar a un compromiso en el diseño.

La capacidad de un espectrómetro de masas de distinguir entre masas se expresa normalmente en términos de su resolución R , que se define como

$$R = m/\Delta m$$

donde Δm es la diferencia entre dos picos adyacentes que están resueltos y m es la masa nominal, masa sin decimales, del primer pico (a veces se utiliza en su lugar la masa media de los dos picos). Dos picos se consideran que están separados si la altura del valle entre ellos no es más que un porcentaje de su altura (a menudo un 10%). Así, un espectrómetro con una resolución de 4000 podrá resolver picos que tengan valores de m/z de 400,0 y 400,1 (o 40,00 y 40,01).

La exactitud de la masa mide la proximidad del valor registrado de m/z a su verdadero valor.

$$\Delta m_{\text{exact}} = m_{\text{verdadera}} - m_{\text{medida}} \quad (\text{miliunidades de masa, mmu})$$

$$\text{ppm}_{\text{exact}} = (\Delta m_{\text{exact}}/m_{\text{medida}}) \cdot 10^6 \quad (\text{partes por millón, ppm})$$

La resolución que se necesita en un espectrómetro de masas depende en gran parte de su aplicación. Por ejemplo para diferenciar entre iones de la misma masa nominal tales como C_2H_4^+ , CH_2N^+ , N_2^+ y CO^+ (todos ellos con 28 daltons de masa nominal pero con masas exactas de 28.0313, 28.0187, 28.0061 y 27.9949 daltons, respectivamente) se necesita un instrumento con una resolución de varios miles. Por otro lado, los iones de bajo peso molecular que difieren en una unidad de masa o más [por ejemplo, NH_3^+ ($m = 17$) y CH_4^+ ($m = 16$)] pueden distinguirse con un instrumento que tenga una resolución inferior a 50. Los espectrómetros comerciales son asequibles con resoluciones que van desde aproximadamente 500 a 500 000.

5.1.4.1. Analizadores de sector magnético

Principio de funcionamiento. Los analizadores de sector magnético utilizan un imán permanente o un electroimán para hacer que el haz de iones de la fuente se mueva en una trayectoria circular de 180, 90 o 60 grados. La Figura 13 muestra un instrumento de sector de 90 grados en el que los iones, formados por impacto de electrones, son acelerados a través de la rendija B hacia el tubo analizador metálico, que se mantiene a una presión interna de alrededor de 10^{-7} torr. Se puede llevar a cabo un barrido de los iones de diferente masa a través de la rendija de salida variando la fuerza del campo del imán, barridos magnéticos, o el potencial de aceleración entre las rendijas A y B, barridos eléctricos. Los iones que pasan a través de la rendija de salida se recogen en un electrodo colector y dan lugar a una corriente de iones que es amplificada y registrada.

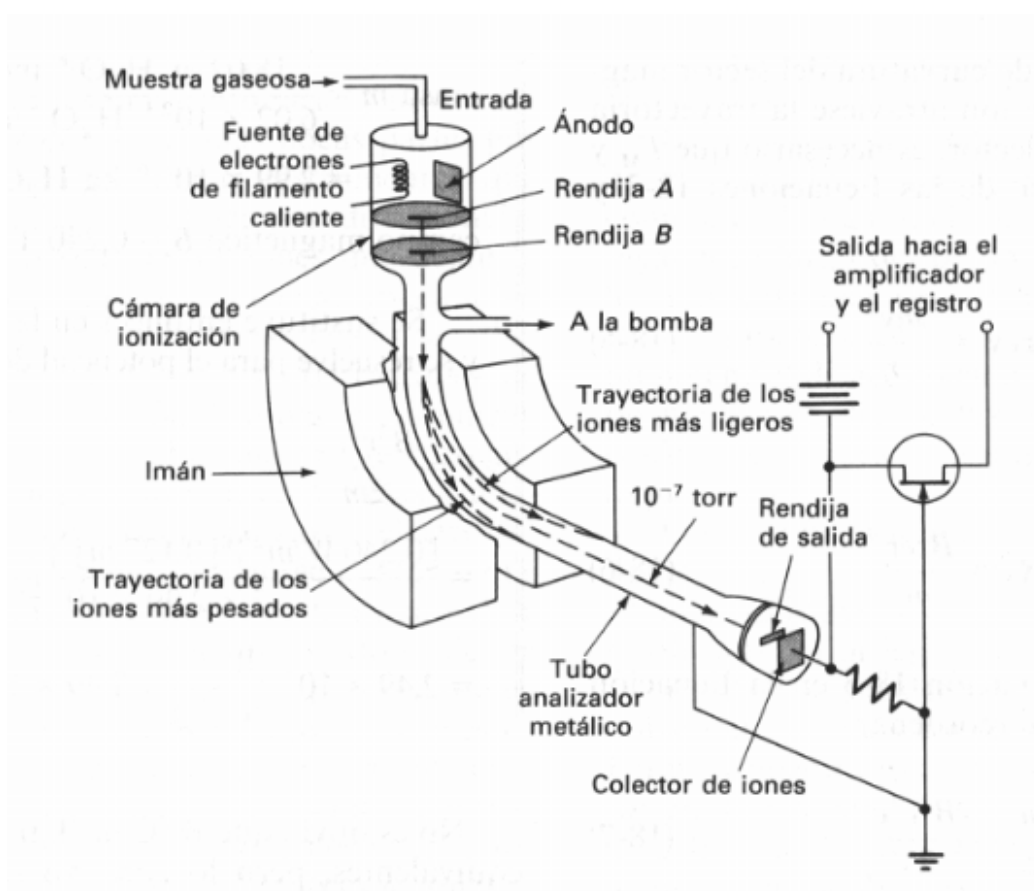


Figura 13. Esquema de un espectrómetro de sector magnético

La capacidad de discriminación de m/z se basa en la variación de la trayectoria de un ión en función del campo magnético de su entorno.

La energía traslacional, o cinética, KE de un ion de masa m y carga z en la rendija de salida B viene dada por

$$KE = zeV = 1/2 mv^2$$

donde V es el potencial entre A y B , v es la velocidad del ion después de la aceleración y e es la carga del ion ($e = 1,60 \cdot 10^{-19}$ C). Nótese que todos los iones que tienen la misma carga z se supone que tienen la misma energía cinética después de la

aceleración independientemente de su masa. Esta suposición sólo es aproximadamente cierta, los iones poseen una distribución estadística de velocidades (rapidez y dirección), que se reflejará en una distribución similar para los iones acelerados. Las limitaciones de esta suposición se discuten en la sección siguiente, que trata de instrumentos de doble enfoque. Debido a que todos los iones que dejan la rendija tienen aproximadamente la misma energía cinética, los iones más pesados deben viajar a través del sector magnético a velocidades menores.

La trayectoria descrita en el sector por los iones de una masa y carga dadas representa un balance entre las dos fuerzas que actúan sobre ellos. La fuerza magnética F_M viene dada por la relación

$$F_M = Bzev$$

donde B es la fuerza del campo magnético. La fuerza centrípeta resultante F_c , viene dada por

$$F_c = mv^2/r$$

donde r es el radio de curvatura del sector magnético. Para que un ion atraviese la trayectoria circular hasta el colector, es necesario que F_M y F_c , sean iguales. Así, resulta

$$Bzev = mv^2/r$$

la cual reordenando y sustituyendo se obtiene

$$v = Bze/m \qquad m/z = B^2 r^2 e / (2V)$$

Está es la ecuación fundamental de la separación magnética. Dicha ecuación revela que los espectros de masas pueden obtenerse variando una de las tres variables (B, V o r) mientras se mantienen las otras dos constantes. Los espectrómetros de masas de sector más modernos contienen un electroimán en el que los iones se separan manteniendo V y r constantes mientras se varía la corriente en el imán y por tanto B, barridos magnéticos o manteniendo constante la corriente del imán, B, y r y variando el potencial V (voltaje de aceleración), barridos eléctricos.

Geometrías especiales. Los instrumentos de sector magnético discutidos en la sección anterior se llaman a menudo espectrómetros de enfoque simple (figura 14). Esta terminología se utiliza porque un conjunto de iones que salen de la fuente con la misma relación masa/carga pero con una distribución direccional algo divergente estarán afectados por el campo magnético de tal manera que se produce una distribución direccional convergente cuando los iones dejan el campo. La habilidad de un campo magnético para conducir iones con orientaciones direccionales diferentes hacia el foco significa que la distribución de energías traslacionales de los iones que dejan la fuente es el factor responsable que limita la resolución de los instrumentos de sector magnético ($R < 2000$).

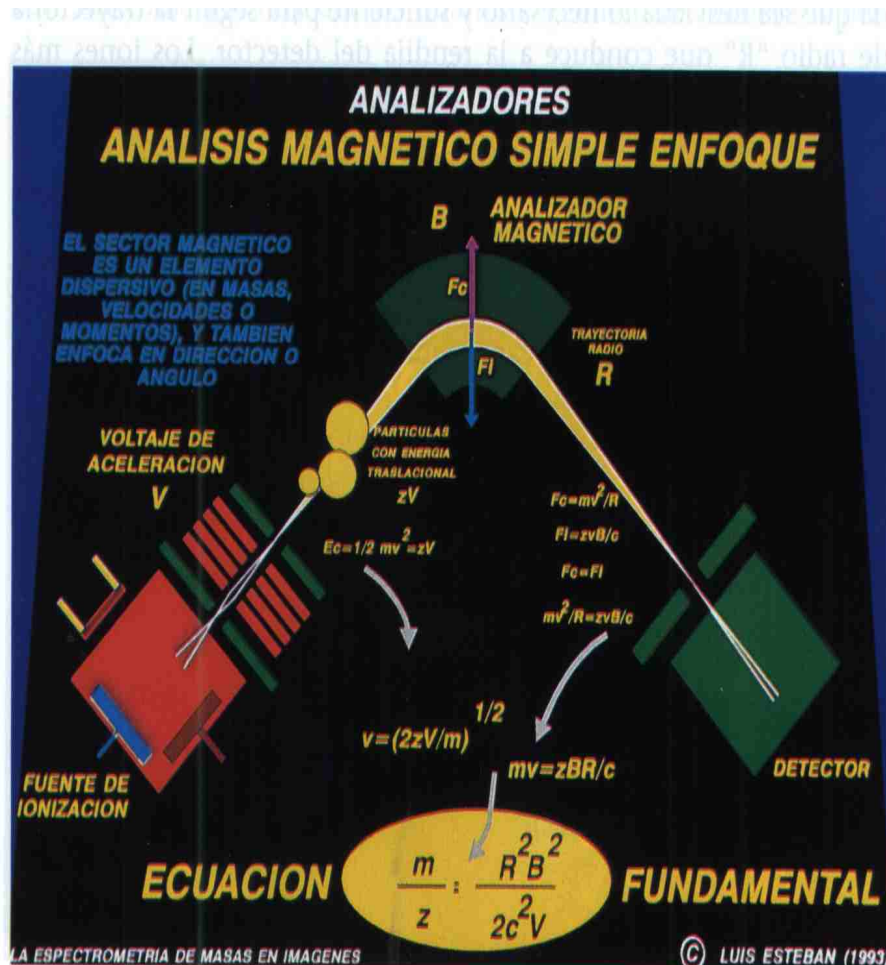


Figura 14. Analizador magnético de simple enfoque

La distribución de energías traslacionales de los iones que dejan la fuente proviene de la distribución de Boltzmann de energías de las moléculas a partir de las que se han formado los iones y de las heterogeneidades en la fuente. La distribución de energías cinéticas produce un ensanchamiento del haz que llega al detector y por tanto una pérdida de resolución. Con el objeto de medir las masas atómicas y moleculares con una precisión de unas pocas partes por millón, es necesario diseñar instrumentos que corrijan tanto las distribuciones direccionales como las de energía de los iones que dejan la fuente. El término *doble enfoque* (Figura 15) se aplica a los espectrómetros de masas en los cuales las aberraciones direccionales y las aberraciones de energía de una población de iones se minimizan simultáneamente. El doble enfoque se consigue utilizando combinaciones seleccionadas cuidadosamente de campos magnéticos (deflectores magnéticos) y electrostáticos (sectores electrostáticos). Normalmente para conseguir alta resolución se coloca antes o después del sector magnético un analizador electrostático que enfoca a la rendija de salida sólo los iones portadores de una energía traslacional en un margen muy cercano a V y rechaza los iones cuyas energías son distintas a V . Los iones de energía correcta describirán una trayectoria de radio “ r ” que les permite atravesar la rendija de salida, mientras que los iones de energía diferente seguirán trayectorias de menor o mayor radio, por lo que serán rechazados. En la geometría de doble enfoque convencional, el analizador electrostático se sitúa en primer lugar, antes del analizador magnético. En el caso contrario, la geometría se denomina “geometría inversa”. Cada una de estas geometrías tiene sus ventajas por lo

que se han desarrollado geometrías de triple sector (figura 16) que permiten reunir en un solo equipo las virtudes de ambas.

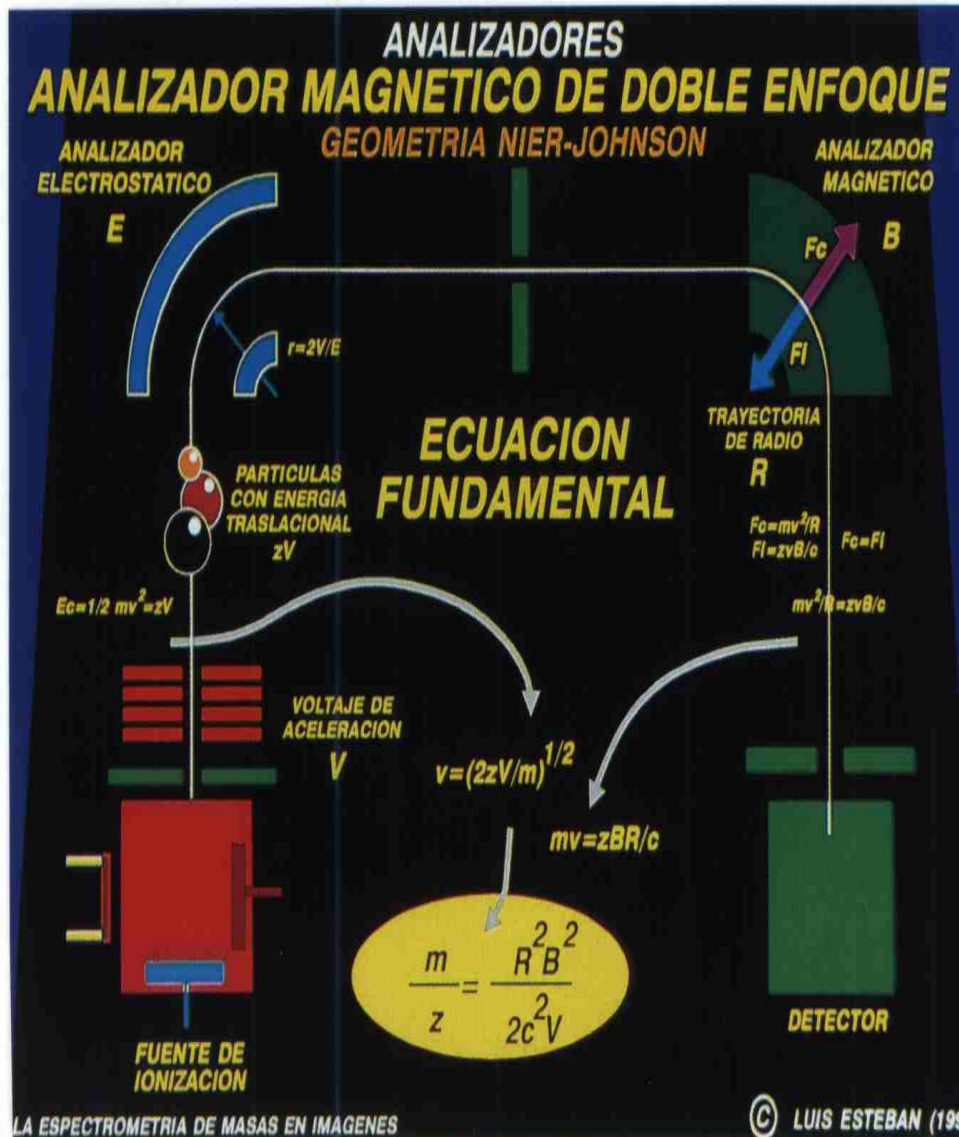


Figura 15. Analizador magnético de doble enfoque

Una amplia variedad de espectrómetros de doble enfoque son asequibles comercialmente. El más sofisticado de estos es capaz de una resolución del orden de 10^5 . También se pueden adquirir instrumentos de doble enfoque más compactos (y más baratos). En estos instrumentos son usuales resoluciones de 2500. A menudo se utilizan como detectores para columnas cromatográficas.

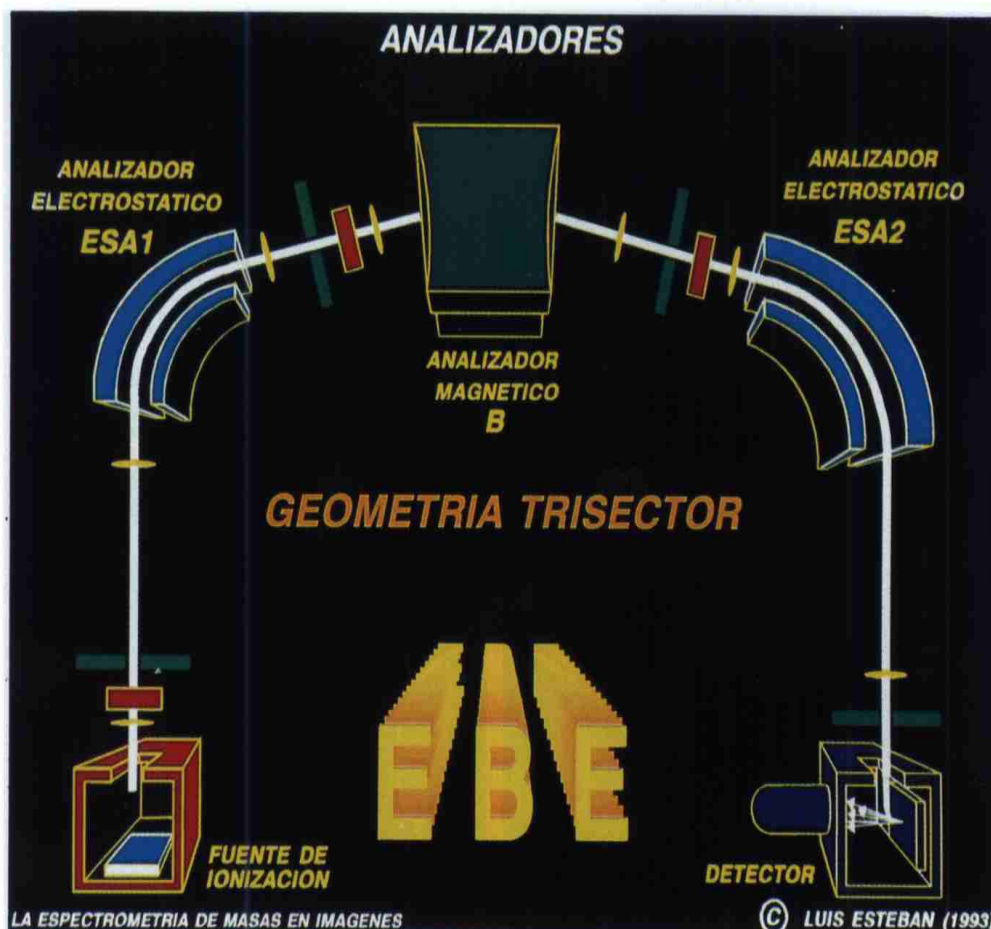


Figura 16. Analizador magnético trisector

5.1.4.2. Filtros de masas de cuadrupolo

Los espectrómetros de masa de cuadrupolo son normalmente más compactos, menos caros y más robustos que los de sector magnético. También ofrecen la ventaja de emplear tiempos de barrido bajos (esto es, < 100 ms), lo que es particularmente útil para realizar barridos de picos cromatográficos a tiempo real. Los analizadores de cuadrupolo son actualmente los de utilización más frecuente.

Un instrumento de sector magnético dispersa simultáneamente todos los iones en función de la relación m/z , de la misma manera que una red de difracción dispersa simultáneamente un espectro de radiación electromagnética en función de la longitud de onda. En contraste, un cuadrupolo es parecido a un filtro de banda estrecha variable, ya que en unas determinadas condiciones de operación transmite sólo iones de un pequeño intervalo de relaciones m/z . Todos los otros iones son neutralizados y eliminados como moléculas sin carga. Variando las señales eléctricas de un cuadrupolo es posible variar el intervalo de valores m/z transmitidos, haciendo así posible el barrido espectral. Debido a que los cuadrupolos funcionan por eliminación selectiva de iones, se llaman a menudo filtros de masas, en vez de analizadores de masas.

La Figura 17 muestra un diagrama simplificado de un espectrómetro de masas de cuadrupolo. La parte más importante del instrumento es el conjunto de cuatro barras cilíndricas de metal que sirven de electrodos del filtro de masas. Los iones de la fuente son acelerados por un potencial de 5 a 15 V e introducidos en el espacio entre las barras.

Las barras opuestas se conectan eléctricamente, un par al polo positivo de una fuente variable de corriente continua y el otro par a la terminal negativa. Además, se aplican a cada par de barras potenciales variables de corriente alterna de radiofrecuencia, que están desfasados 180 grados. Las barras cilíndricas son normalmente de 6 mm de diámetro y raramente tienen más de 15 cm de longitud. Están sujetas rígidamente sobre soportes cerámicos construidos con precisión que proporcionan una buena estabilidad mecánica aunque cambie la temperatura.

Para entender la capacidad de filtración de un cuadrupolo, es necesario considerar el efecto de los potenciales de corriente continua y de corriente alterna sobre la trayectoria de los iones cuando pasan a través del canal entre las barras. Las ecuaciones diferenciales que se necesitan para describir el comportamiento de los iones de distinta masa en un cuadrupolo son complejas y difíciles de tratar analíticamente y están fuera del alcance de este texto. Por ello debe bastar entender que para que un ion atraviese el cuadrupolo hasta el detector, debe tener una trayectoria estable en los dos planos formados por cada par de electrodos opuesto. El ión debe de ser suficientemente pesado para no ser eliminado por el filtro de paso de masa elevada en uno de los planos y suficientemente ligero para no ser eliminado por el filtro de masa baja en el otro plano. El cuadrupolo total transmite una banda de iones que tienen un intervalo limitado de valores de m/z . El centro de esta banda puede variarse ajustando los potenciales de corriente alterna y continua.

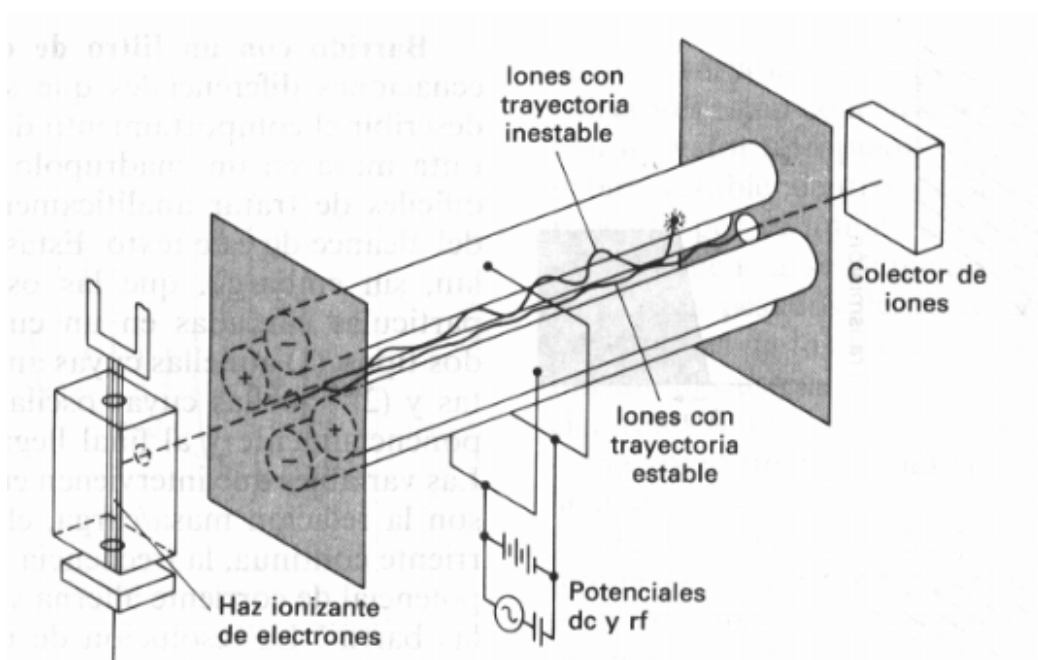


Figura 17. Espectrómetro de masas de cuadrupolo

La aplicación a cada par de barras opuestas de un voltaje y una radiofrecuencia posibilita un control de la trayectoria de los iones. Esto permitirá al ión m/z seguir una trayectoria rectilínea y cruzar el túnel alcanzando el detector, mientras que las demás masas, al ser inestables sus trayectorias, no alcanzan el detector, siendo desviadas fuera del conjunto de barras.

Diversas casas comerciales fabrican los espectrómetros de masas de cuadrupolo. Estos instrumentos resuelven fácilmente iones que tienen una diferencia de masas de la unidad. Las ventajas de los espectrómetros con analizador de cuadrupolo respecto a los

de sector magnético son su menor coste, facilidad de uso y barrido rápido. Sus desventajas son su menor sensibilidad y resolución.

5.1.4.3. Analizador de trampa de iones (IT-MS, ion-trap MS o ITD, ion trap detector)

Una trampa de iones es un dispositivo en el que los cationes o aniones gaseosos pueden ser formados y confinados durante largos períodos de tiempo por la acción de campos eléctricos y/o magnéticos. Se han desarrollado varios tipos de trampas de iones que en general son cuadrupolos pero en el espacio que lo que hacen es manipular iones y permitir hacer masas/masas.

La Figura 18 muestra la sección longitudinal de una trampa de iones sencilla asequible comercialmente. Consiste en un electrodo anular y un par de electrodos colectores. Se aplica al electrodo anular un potencial de radiofrecuencia variable mientras que los dos electrodos colectores están conectados con tierra. Los iones con un valor apropiado de m/z circulan en una órbita estable dentro de la cavidad que está rodeada por el anillo. Cuando el potencial de radiofrecuencia se aumenta, las órbitas de los iones más pesados llegan a estabilizarse, mientras que las de los iones más ligeros se desestabilizan, lo que causa colisiones con la pared del electrodo anular. Cuando este dispositivo funciona como un espectrómetro de masas los iones quedan atrapados en el interior de la trampa mediante la aplicación de los voltajes y radiofrecuencias adecuados, pudiéndose de esta forma hacer experimentos con ellos. Se sacan los iones que no interesan de la trampa y dejamos el que nos interesa estudiar que chocaría con el He y así se haría el masas/masas.

Los espectrómetros de trampa de iones son robustos, compactos y más económicos que los instrumentos de sector o de cuadrupolo. Sin embargo sufre de limitaciones en cuanto a su capacidad de resolución y otras relacionadas con la alta probabilidad de que puedan producirse interacciones ión molécula durante el prolongado tiempo de residencia de los iones en la cavidad.

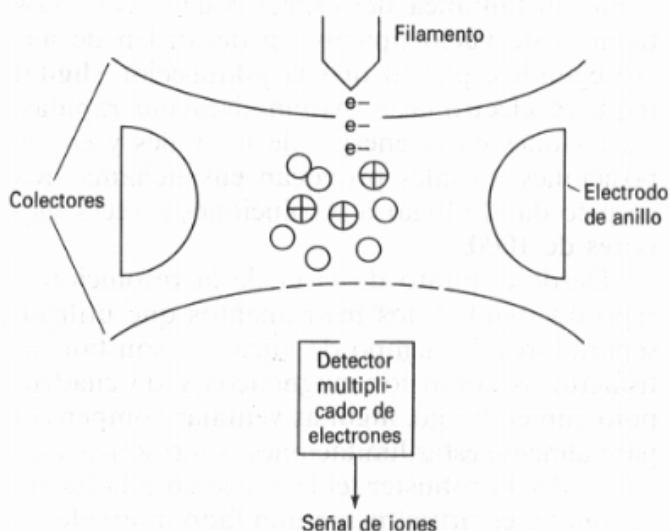


Figura 18. Espectrómetro de masas de trampa de iones

5.1.4.4. Analizador de tiempo de vuelo (TOF, time of flight)

En los instrumentos de tiempo de vuelo (TOF), los iones positivos se producen periódicamente por bombardeo de la muestra con impulsos de electrones, de iones secundarios o de fotones generados por láser. Estos impulsos tienen normalmente una frecuencia de 10 a 50 kHz y un tiempo de vida de 0,25 μ s. Los iones producidos de esta manera son acelerados por un impulso de campo eléctrico de 10^3 a 10^4 V que tiene la misma frecuencia, pero retrasada, que el impulso de ionización. Las partículas aceleradas pasan entonces a un *tubo analizador* de un metro de longitud sobre el que no actúa ningún campo. Debido a que todos los iones que entran en el tubo tienen idealmente la misma energía cinética, sus velocidades en el tubo deberán variar de modo inverso a sus masas, y por tanto las partículas ligeras llegarán antes al detector que las pesadas. Los tiempos de vuelo típicos están entre 1 y 30 μ s.

Desde el punto de vista de la resolución y reproducibilidad, los instrumentos que utilizan separadores de tiempo de vuelo no son tan satisfactorios como los magnéticos y de cuadrupolo. Sin embargo, algunas ventajas compensan parcialmente estas limitaciones como son la simplicidad y la robustez, el fácil acceso a la fuente de iones y el virtualmente ilimitado intervalo de masas. Varios fabricantes de instrumentos ofrecen actualmente instrumentos de tiempo de vuelo que en la actualidad se emplea rutinariamente en el campo del análisis de biomoléculas, desde azúcares de menos de 1000 Da, hasta proteínas de más de 300KDa, empleando técnicas de ionización por desorción con láser tipo MALDI-TOF (Matriz Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight), (Figura 19).

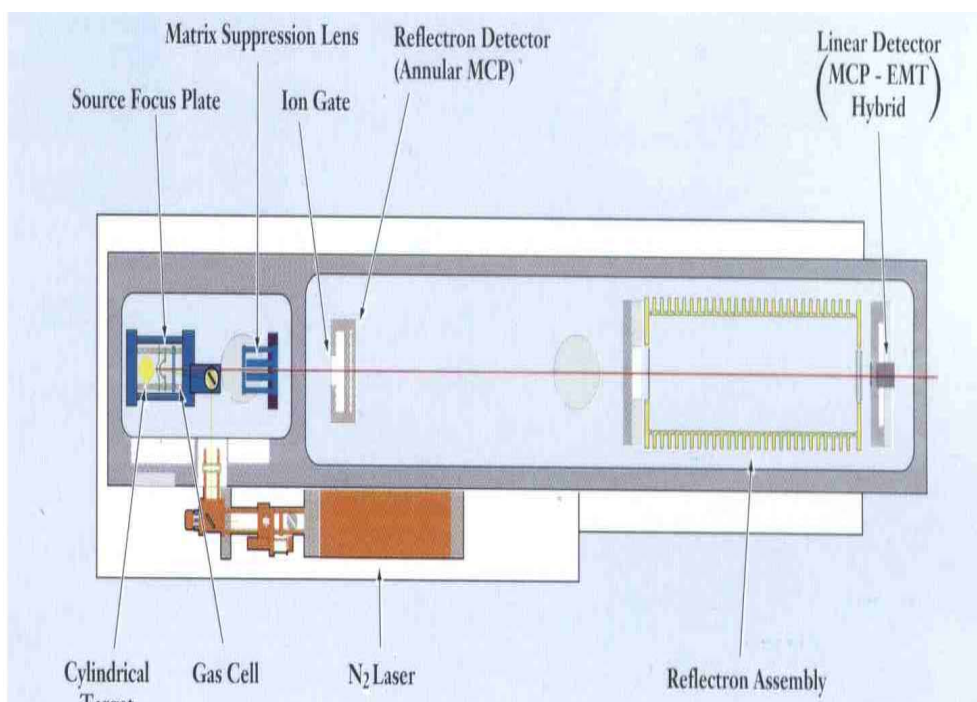


Figura 19. Esquema del MALDI-TOF

5.1.4.5. Resonancia ciclotrónica por transformada de Fourier (FT-ICRMS Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer)

Los espectrómetros de masas de transformada de Fourier proporcionan relaciones señal/ruido superiores, velocidades mayores y sensibilidad y resolución elevadas. Los espectrómetros de masas de transformada de Fourier comerciales aparecieron en el mercado a principios de 1980 y actualmente los ofrecen diversos fabricantes. La parte esencial de un instrumento de transformada de Fourier es una trampa de iones en la cual los iones circulan en órbitas bien definidas durante largos períodos. Tales cavidades se construyen aprovechando el *fenómeno de resonancia de ion ciclotrón*.

Cuando un ión gaseoso es arrastrado o se forma en un campo magnético fuerte, su movimiento llega a ser circular en un plano que es perpendicular a la dirección del campo. La frecuencia angular de este movimiento se llama *frecuencia del ciclotrón*, ω_c ,

$$\omega_c = v/r = zeB/m$$

Nótese que en un campo fijo, la frecuencia del ciclotrón depende sólo de la inversa del valor m/z . Los aumentos en la velocidad de un ion irán acompañados por el correspondiente aumento en el radio de rotación del ion. Un ión atrapado en una trayectoria circular en un campo magnético es capaz de absorber energía de un campo eléctrico de corriente alterna siempre que la frecuencia de campo sea igual a la frecuencia del ciclotrón. La energía absorbida aumenta entonces la velocidad del ión (y por tanto su radio de giro). El movimiento circular coherente de los iones resonantes crea una llamada *corriente imagen* que puede ser observada convenientemente al finalizar la señal de frecuencia.

Los espectrómetros de transformada de Fourier son instrumentos caros. La resolución en espectrometría de masas de transformada de Fourier está limitada por la precisión en la medida de la frecuencia mas que en las rendijas o en las medidas de campo. Ya que las medidas de la frecuencia se pueden hacer con elevada precisión, es posible una resolución extremadamente elevada (superior a 10^6).

5.1.5. Detectores

Comercialmente son asequibles varios tipos de detectores para espectrómetros de masas. En los primeros años predominaban los multiplicadores de electrones de detección puntual situados en el ambiente de alto vacío del espectrómetro. Mas tarde fueron apareciendo nuevos desarrollos para detección puntual, como los detectores "Channeltron" de bajo coste y uso general, y los sistemas de conversión fotónica mas sofisticados, sensibles y duraderos. También han aparecido sistemas de detección simultánea, tales como baterías de micromultiplicadores multicanal (Microchannel Plate o Multichannel Multiplier Array Detector), combinadas normalmente con posterior centelleo o conversión fotónica, cuya aportación a los nuevos desarrollos instrumentales en Espectrometría de Masas ha sido importante.

5.1.5.1. *Detector de copa de Faraday*

Consiste en un simple electrodo, normalmente en forma de copa o caja, que recibe el impacto de los iones a detectar. Los iones se neutralizan por transferencia de electrones, y la señal se mide como una corriente analógica igual o superior a la corriente iónica original, dependiendo de la forma del electrodo.

Es un detector de baja sensibilidad y gran sencillez. Puede trabajar a presiones relativamente altas, del orden de 10^{-4} mbar, y posee una gran linealidad de respuesta. La mínima corriente detectable es del orden de 10^{-14} A.

Se utiliza principalmente en sistemas para análisis de gases permanentes, en muestras ambientales, reactores, gases residuales, etc., normalmente combinado con un SEM (Multiplicador de Electrones Secundarios = Secondary Electron Multiplier), usándose uno u otro según la sensibilidad requerida y el vacío disponible.

También tiene aplicación en los espectrómetros de masas para medida de Relaciones Isotópicas (IRMS = Isotopic Ratio Mass Spectrometer). En estos equipos se utilizan colectores múltiples, formados por una batería de copas de Faraday, cada una de las cuales se dedica a la detección de una única masa.

5.1.5.2. *Multiplicador de electrones secundarios*

Uno de los detectores que han sido más utilizados en espectrometría de masas, es el multiplicador de electrones de dínodos. El cátodo y los sucesivos dínodos tienen superficies de Cu/Be de las que se emiten ráfagas de electrones al ser alcanzadas por iones o electrones de elevada energía. Su funcionamiento puede verse en la figura 20a. El ión a detectar choca con el primer dínodo, provocando la emisión de un elevado número de electrones, que van a incidir sobre el segundo dínodo. El proceso de multiplicación se repite sucesivamente en los demás dínodos, obteniéndose al final del sistema una amplificación de señal del orden de 10^6 a 10^8 .

Es un detector mucho más sensible que el de copa de Faraday, con una señal mínima detectable del orden de 10^{-18} A. Requiere alta tensión y un mayor vacío para operar, del orden de 10^{-6} mbar o mejor. Es un detector de vida limitada, pues se va desgastando con el uso, por lo que su ganancia va cambiando con el tiempo y requiere calibración frecuente. Es muy sensible a subidas de presión, pudiendo destruirse prácticamente si se produce una ruptura o accidente de vacío.

La velocidad de respuesta del multiplicador de electrones, típicamente inferior a 50 ns, es mucho más rápida que la del detector Faraday, lo que permite mayores velocidades de barrido en el espectrómetro de masas.

5.1.5.3. *Detector "Channeltron"*

Este detector es uno de los más utilizados hoy en día en espectrometría de masas para uso general. Es similar al multiplicador de electrones clásico, con la principal diferencia de que no tiene múltiples dínodos discretos, sino que está formado por un tubo de vidrio en forma de corneta, a veces terminado en forma de espiral o caracol (figura 20b), cuyo interior está recubierto por un óxido de plomo semiconductor de composición y características especiales.

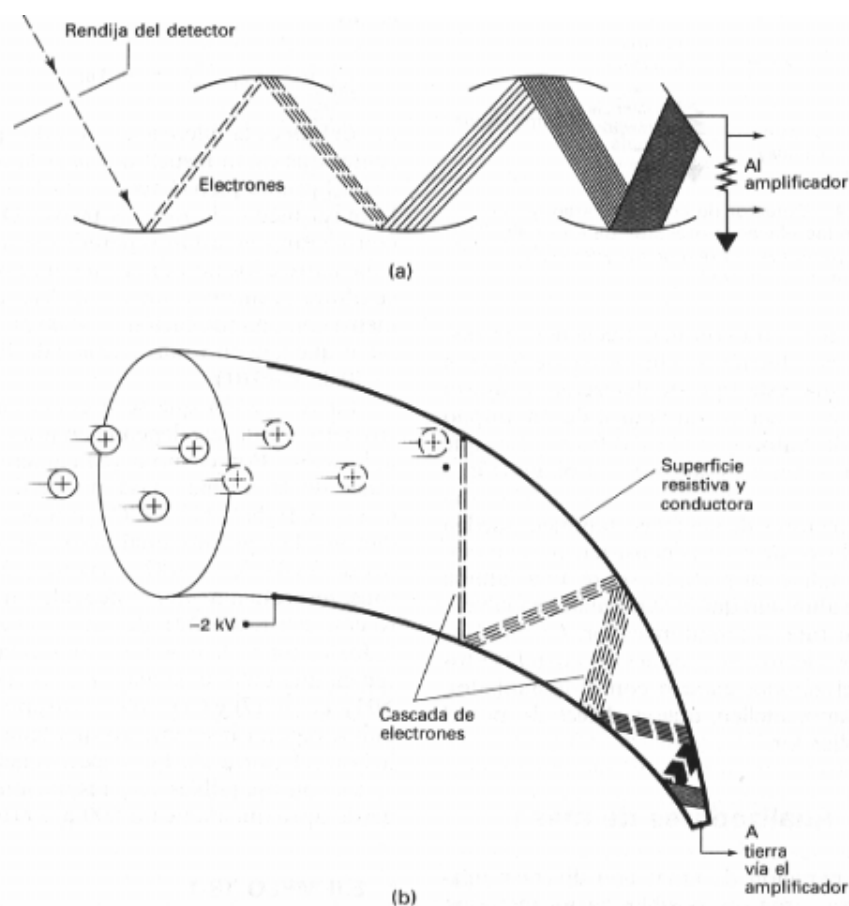


Figura 20. (a) Multiplicador de electrones de díodos discreto. (b) Channeltron

Si se desea detectar iones positivos, se aplica un potencial negativo en la boca del detector para que los iones procedentes del espectrómetro de masas, desviados de su trayectoria por una placa repulsora con potencial positivo sean atraídos a su interior y choquen con la cara interna, produciendo la emisión de un cierto número de electrones. El final del tubo del detector se sitúa a un potencial cercano a tierra, con lo que existirá un gradiente continuo de potencial desde la boca al fondo del detector. Debido a esto, los electrones arrancados en el impacto inicial del ion volarán en la dirección de los potenciales menos negativos, hacia potencial cero, produciéndose una gran cantidad de impactos en el camino, en cada uno de los cuales se multiplicará el número de electrones, con lo que se puede conseguir un efecto multiplicador del orden de 10^8 .

Al final del recorrido del tubo multiplicador se encuentran un cono colector con la electrónica de preamplificación y amplificación asociada.

Si se desean detectar iones negativos, en principio basta con cambiar el signo de los potenciales aplicados a la placa repulsora y a la boca del channeltron. Por tanto, este detector es susceptible de ser empleado tanto para detectar iones positivos como negativos.

El hecho de situar el detector fuera del "eje óptico" del espectrómetro, produce una ventaja importante, además de permitir la detección selectiva de iones positivos o negativos, como es la de evitar que alcancen el detector partículas o radiaciones no deseadas, tales como fragmentos neutros o fotones procedentes del filamento de la fuente, que podrían incrementar el ruido de fondo y originar señales parásitas.

Otra ventaja de los "Channeltron" es que pueden exponerse a presión atmosférica sin ningún problema, siempre que el alto voltaje haya sido desconectado, lo que permite romper vacío en el sistema sin complicaciones. Requieren un vacío mínimo de trabajo del orden de 5×10^{-5} torr, lo que no debe ser problema en espectroscopía de masas donde es habitual trabajar con vacíos mejores que 10^{-1} torr en el analizador.

La vida de un detector "Channeltron", aunque superior a la de los multiplicadores de díodos discretos, es también limitada y depende de la carga total acumulada, es decir, del voltaje aplicado y del número de iones detectados. A medida que la superficie interior se va agotando, se va haciendo necesario incrementar el alto voltaje aplicado para conseguir una señal adecuada. Cuando este fenómeno se acelera, es síntoma evidente de que el final de la vida útil del detector se acerca.

5.1.5.4. Detector de conversión fotónica (Detector "Daly" o de centelleo)

Este detector es uno de los más eficientes, sensibles y de más larga vida disponibles para detección puntual.

Los iones procedentes del tubo de vuelo del espectrómetro de masas son desviados de su trayectoria mediante un potencial eléctrico. El voltaje aplicado es de signo contrario a la carga de los iones que se quieren detectar, para provocar su atracción y choque sobre el dínodo inicial. Este choque produce múltiples electrones que son atraídos, a su vez, por un voltaje más positivo que el del dínodo, y aplicado sobre una pantalla fosforescente. Al recibir el impacto de los electrones, la pantalla de centelleo emite un gran número de fotones, los cuales se dirigen a un fotomultiplicador convencional sellado a vacío, produciéndose la consiguiente cascada de electrones que multiplica la señal. La señal es detectada al final de su recorrido por el interior del tubo fotomultiplicador, siendo posteriormente de nuevo amplificada, digitalizada y elaborada mediante circuitos electrónicos, para su manipulación por el sistema de tratamiento de datos del espectrómetro de masas.

Una ventaja de este detector sobre los clásicos "Channeltron", aparte de su mayor sensibilidad y estabilidad, es su extraordinaria duración, ya que el elemento que envejece principalmente es el fotomultiplicador, que sufre en todo caso menos deterioro, pues recibe el impacto de fotones y electrones que causan menor daño que el impacto directo de los iones. Además, la sustitución del multiplicador no es nada costosa, ya que se trata de un componente normal, disponible en el mercado a bajo precio.

5.1.5.5. Detectores multicanal

Existen varios tipos de detectores que pueden incluirse en esta denominación de multicanales. Se basan en la utilización de una o dos capas de baterías de micromultiplicadores, seguidas de un sistema de detección mas o menos sofisticado y eficiente, encargado de detectar simultáneamente todas las señales.

Este tipo de detectores reúnen la ventaja de los antiguos sistemas de fotoplacas, de ser capaces de detectar simultáneamente una amplia zona espectral, lo que aumenta enormemente el tiempo de observación de cada ion, con la mayor sensibilidad, estabilidad, capacidad de amplificación, etc., de los modernos sistemas multiplicadores. Ello conduce a una sensibilidad aumentada en muchos órdenes de magnitud. Existen distintas denominaciones de este tipo de detectores tales como: *Multiple Channel Detector* o *Multiple Channel Detector/Multiplier Array Detector/Microchannel Multipliers - Multichannel Photo Diode Array*

5.1.6 Sintonía y calibración de los espectrómetros de masas

Con el fin de disponer de picos de masas conocidas se utilizan sustancias de referencia, de espectro bastante complejo pero muy bien conocido, para realizar la calibración de la escala de masas del espectrómetro. Lo que se hace es ajustar las distintas lentes y rendijas de la fuente para conseguir los valores óptimos de los iones fragmento del compuesto de referencia de los cuales se conoce su masa exacta así como las abundancias relativas de cada uno. A este proceso se le denomina “TUNE” (sintonía).

Las sustancias de referencia más utilizadas son heptacosa (perfluoroterbutilamina) para la calibración de las masas en equipos de baja resolución y el PFK (perfluorkeroseno) para los de alta.

En los espectrómetros de masas de baja resolución conviene hacer un tune a la semana para asegurarse del buen funcionamiento del mismo. Normalmente lo que se hace es abrir la válvula de fuga para conseguir un flujo de heptacosa hacia la fuente iónica que provoca la presencia permanente del espectro de esta sustancia con lo que el equipo compara el espectro de masas detectado con el que tiene almacenado en la memoria del ordenador. Lógicamente cuando se acaba la calibración se cierra la válvula.

En los espectrómetros de masas de alta resolución, el procedimiento es parecido, utilizando PFK, pero además en todo momento está entrando esta referencia a la fuente incluso a la vez que la muestra problema a analizar. El ordenador es capaz de separar el espectro de la muestra del de la sustancia de referencia y, mediante la comparación de los picos respectivos, asignar masas precisas a los picos de interés

5.2. ESPECTROS MOLECULARES DE VARIAS FUENTES DE IONES

5.2.1. Espectros de impacto de electrones

El aspecto de los espectros de masas para una especie molecular dada depende en gran parte del método utilizado para la formación de los iones. Los complejos espectros de masas que se obtienen en la ionización por impacto de electrones son útiles para la identificación de compuestos. Además, para cierto tipo de moléculas, la fragmentación es tan efectiva que no queda ningún ion molecular y por tanto la información más importante para la determinación del peso molecular del analito se pierde.

La Figura 21 muestra los espectros de impacto de electrones de tres moléculas orgánicas sencillas: el etilbenceno, el cloruro de metileno y el 1-pentanol. En cada caso los picos del ion molecular aparecen a la masa correspondiente al peso molecular del analito. Así, se observan picos de iones moleculares a 106 para el etilbenceno, 84 para el cloruro de metileno y 88 para 1-pentanol. El pico del ion molecular es, naturalmente, de gran importancia en las determinaciones estructurales, debido a que su masa proporciona el peso molecular del analito. Desafortunadamente, no es siempre posible identificar el pico del ion molecular, dado que, con ionización por impacto de electrones, ciertas moléculas no dan pico de ion molecular (vease Figura 22b).

Como se ha dicho antes, el pico más grande en un espectro de masas se llama pico *base*. Nótese que en cada espectro de la Figura 21, el pico base corresponde a un fragmento de la molécula, que tiene una masa significativamente menor que el peso

molecular del compuesto original. Para el etil benceno, el pico base aparece a una masa de 91, que corresponde al ion formado por la pérdida de un grupo CH_3 . De forma similar, para el cloruro de metileno, el pico base aparece a la masa 49, que corresponde a la pérdida de un átomo de ^{35}Cl y para el 1-pentanol, el pico base se encuentra a una m/z de 44, que es la del ion hijo CH_2CHOH^+ . Normalmente, los picos base en espectros de impacto de electrones corresponden a fragmentos como estos y no al ion molecular.

Picos de isótopos. Es interesante señalar en los espectros mostrados en la Figura 21 que aparecen picos a masas que son mayores que la del ion molecular. Estos picos se pueden atribuir a iones que tienen la misma fórmula química, pero diferentes composiciones isotópicas. Por ejemplo, para el cloruro de metileno, las especies isotópicas más importantes son $^{12}\text{C}^1\text{H}_2^{35}\text{Cl}_2$ ($m = 84$), $^{13}\text{C}^1\text{H}_2^{35}\text{Cl}_2$ ($m = 85$), $^{12}\text{C}^1\text{H}_2^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}$ ($m = 86$), $^{13}\text{C}^1\text{H}_2^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}$ ($m = 87$) y $^{12}\text{C}^1\text{H}_2^{37}\text{Cl}_2$ ($m = 88$). Los picos de cada una de estas especies se pueden ver en la Figura 21b. El tamaño de los diferentes picos depende de la abundancia natural relativa de los isótopos. La Tabla 5 da un listado de los isótopos más comunes de los átomos que aparecen normalmente en los compuestos orgánicos. Hay que señalar que el flúor, el fósforo, el yodo y el sodio aparecen sólo como un único isótopo.

El pequeño pico del etilbenceno a la masa 107 en la Figura 21a se debe a la presencia de ^{13}C en alguna de las moléculas. Las intensidades de los picos debidos a la incorporación de uno o más átomos de ^{13}C en el etilbenceno se puede pronosticar con una buena precisión pero son tan pequeños que no son detectables debido a la poca probabilidad de que haya más de un átomo de ^{13}C en una molécula de pequeño tamaño. Como se verá posteriormente, los picos de los isótopos a menudo proporcionan un medio útil para la determinación de la fórmula de un compuesto.

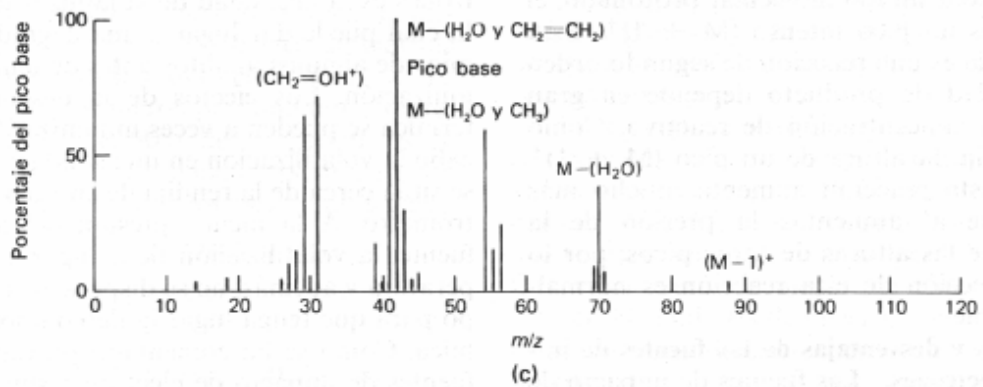
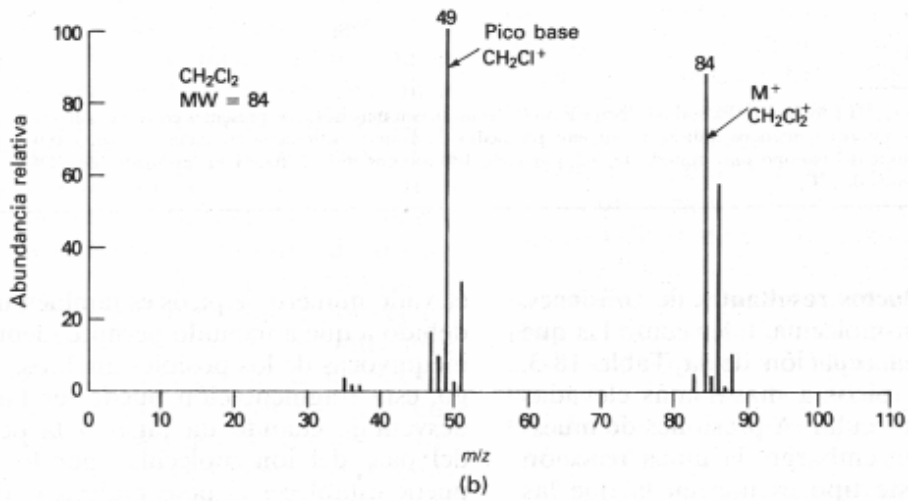
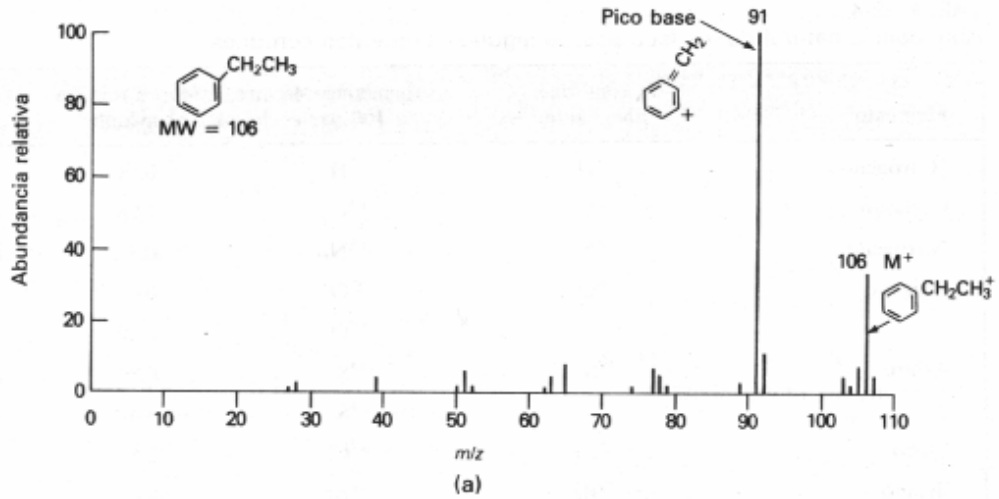


Figura 21. Espectros de masas de impacto electrónico de a) etilbenceno, b) cloruro de metileno y c) 1-pentanol.

Tabla 5. Abundancia natural de los isótopos de algunos elementos comunes

Elemento ^a	Isótopo más abundante	Abundancia de otros isótopos relativa a 100 partes del más abundante ^b	
Hidrógeno	¹ H	² H	0,015
Carbono	¹² C	¹³ C	1,08
Nitrógeno	¹⁴ N	¹⁵ N	0,37
Oxígeno	¹⁶ O	¹⁷ O	0,04
		¹⁸ O	0,20
Azufre	³² S	³³ S	0,80
		³⁴ S	4,40
Cloro	³⁵ Cl	³⁷ Cl	32,5
Bromo	⁷⁹ Br	⁸¹ Br	98,0
Silice	²⁸ Si	²⁹ Si	5,1
		³⁰ Si	3,4

^a Flúor (¹⁹F), fósforo (³¹P), sodio (²³Na) e yodo (¹²⁷I) no tienen más isótopos presentes en la naturaleza.
^b Los valores numéricos indican el número promedio de átomos isotópicos presentes por cada 100 átomos del isótopo más abundante; así, por cada 100 átomos de ¹²C habrá un promedio de 1,08 átomos de ¹³C.

Picos de productos resultantes de colisiones. Las colisiones ion-molécula, tales como las que muestra la última ecuación de la Tabla 4, pueden producir picos a masas más elevadas que la del ion molecular. A presiones de muestra ordinarias, sin embargo, la única reacción importante de este tipo es una en la que las colisiones transfieren un átomo de hidrógeno al ion para dar un ion molecular protonado; el resultado es un pico intenso $(M + 1)^+$. Esta transferencia es una reacción de segundo orden y la cantidad de producto depende en gran parte de la concentración de reactivo. Como consecuencia, la altura de un pico $(M + 1)^+$ debido a esta reacción aumenta mucho más rápidamente al aumentar la presión de la muestra que las alturas de otros picos; por lo que, la detección de esta reacción es normalmente posible.

Ventajas y desventajas de las fuentes de impacto de electrones. Las fuentes de impacto de electrones para el uso y producción de corrientes de iones elevadas, dan buenas sensibilidades. La extensa fragmentación y consecuentemente el elevado número de picos es también una ventaja debido a que a menudo permite identificaciones inequívocas de los posibles analitos. Sin embargo, esta fragmentación puede ser también una desventaja cuando da lugar a la desaparición del pico del ion molecular por lo que no se puede establecer el peso molecular del analito. Otra limitación de la fuente de impacto de electrones es la necesidad de volatilizar la muestra, lo cual puede dar lugar a una degradación térmica de algunos analitos antes de tener lugar la ionización. Los efectos de la descomposición térmica se pueden a veces minimizar llevando a cabo la volatilización en una sonda caliente que se sitúa cerca de la rendija de entrada del espectrómetro. A la menor presión del área de la fuente, la volatilización tiene lugar a baja temperatura y además, no se dispone de tanto tiempo para que tenga lugar la descomposición térmica. Como se ha comentado previamente, las fuentes de impacto de electrones son sólo aplicables para aquellos analitos que tienen pesos moleculares más pequeños de aproximadamente 10^3 daltons.

5.2.2. Espectros de ionización química

La Figura 22 compara los espectros de ionización química y de impacto de electrones para el 1-decanol. El espectro de impacto de electrones (Figura 22b) pone de manifiesto la fragmentación elevada y rápida del ion molecular. Así, no se observan picos detectables por encima de la masa 112, que corresponde al ion $C_8H_{16}^+$. El pico base lo proporciona el ion $C_3H_5^+$ a la masa 41 y otros picos para varias especies C_3 se agrupan alrededor del pico base. Unas series similares de picos a 14, 28 y 42 unidades de masa superiores, corresponden a los iones con uno, dos y tres grupos CH_2 adicionales.

Comparado con el espectro de impacto de electrones, el espectro de ionización química que se muestra en la Figura 22a es muy simple y consiste en el $(M - 1)^+$, un pico base correspondiente al ion molecular que ha perdido un grupo OH y una serie de picos que difieren uno de otro en 14 unidades de masa. Como en el espectro de impacto de electrones, estos picos surgen de los iones formados por rotura de enlaces carbono-carbono adyacentes. Como ya se ha dicho, los espectros de ionización química generalmente contienen picos $(M + 1)^+$ o $(M - 1)^+$ bien definidos que resultan de la adición o substracción de un protón en presencia del ion reactivo.

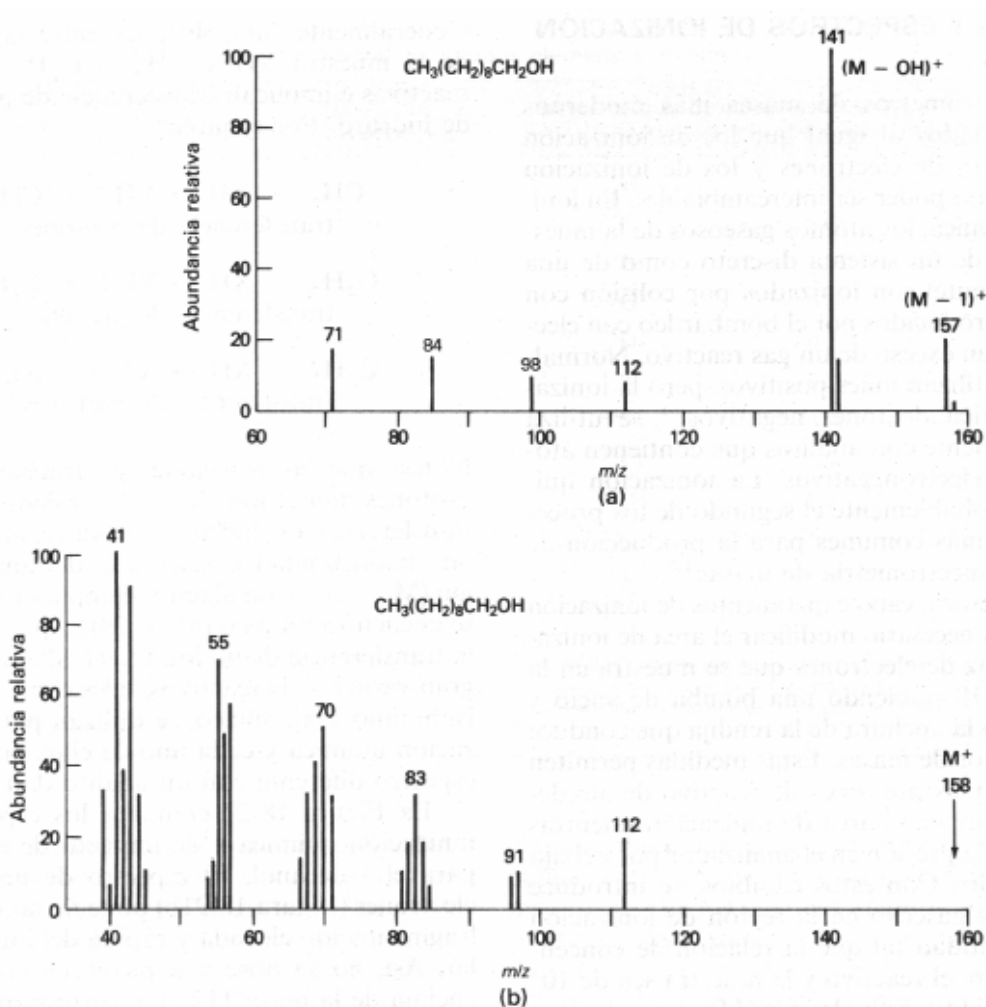


Figura 22. Espectros de masas del 1-decanol: a) ionización química con isobutano como reactivo gaseoso; b) impacto de electrones a 70 eV.

5.2.3. Espectros usando otras técnicas de ionización blandas.

La Figura 23 muestra los espectros para el ácido glutámico obtenidos por (a) ionización de impacto de electrones y (b) ionización de campo. En el espectro de impacto de electrones, el pico del ion progenitor a 147 no es detectable. El pico de masa más elevada observable (masa 129) se debe a la pérdida de agua del ion molecular y el pico base a una masa 48 se obtiene a partir de la pérdida de agua más un grupo $-\text{COOH}$. Otros numerosos fragmentos se encuentran también a masas más bajas. Por el contrario, el espectro de ionización de campo es relativamente simple, con un pico fácilmente distinguible $(M + 1)^+$ a la masa 148.

Una limitación de la ionización de campo es su sensibilidad, que es al menos un orden de magnitud inferior que la de las fuentes de impacto de electrones.

La Figura 23c muestra un espectro de desorción de campo del ácido glutámico. Es incluso más simple que el espectro de ionización de campo y se observa tan sólo el pico del ion molecular protonado a la masa 148 y el de un isótopo a la masa 149.

Como se ha mencionado anteriormente cabe destacar también en este apartado los espectros de masas obtenidos por ionización API o MALDI-TOF. Estos espectros son totalmente diferentes a los conseguidos por otras técnicas de ionización, y consiste en una serie de señales discretas a lo largo de todo el dominio espectral, que corresponden, cada una de ellas, a una molécula intacta cargada con diferente número de cargas, y con un cierto número de protones añadidos. A modo de ejemplo en la figura 24 se muestra el espectro de masas del poliestireno.

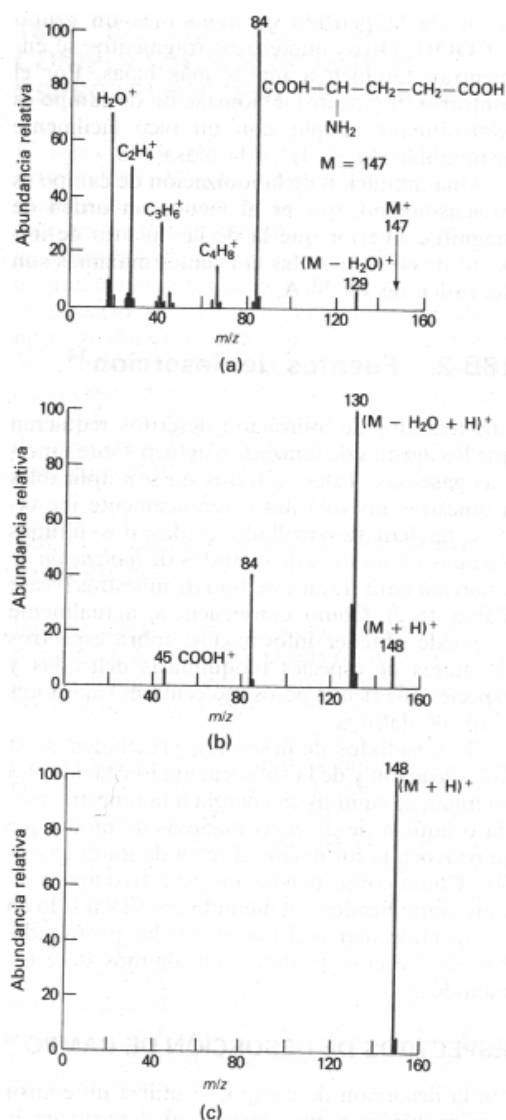


Figura 23. Espectros de masas del ácido glutámico: a) ionización de impacto de electrones, b) ionización de campo y c) desorción de campo

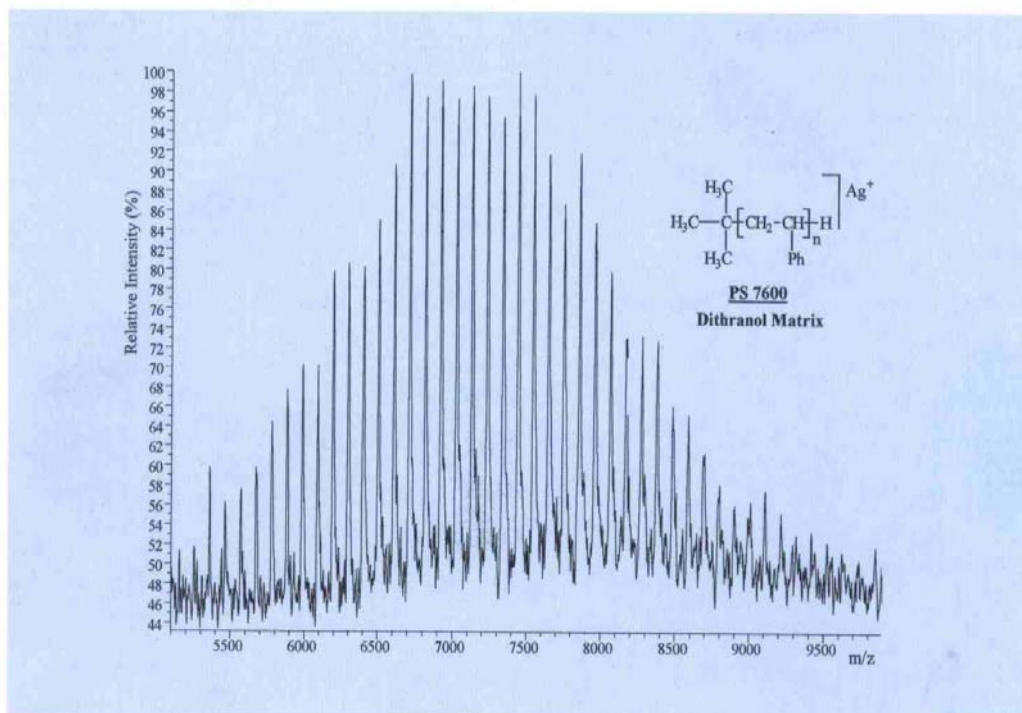


Figura 24. Espectro de masas del poliestireno 7,600 obtenido por MALDI-TOF

5.3. APLICACIONES

5.3.1. Análisis cualitativo: identificación de compuestos puros

El espectro de masas de un compuesto puro proporciona diversos tipos de datos que son útiles para su identificación. El primero es el peso molecular del compuesto y el segundo es su fórmula. Además, el estudio de los modelos de fragmentación que se pone de manifiesto en el espectro de masas a menudo proporciona información sobre la presencia de varios grupos funcionales. Finalmente, la identidad real de un compuesto puede establecerse a menudo por comparación de su espectro de masas con los de compuestos conocidos hasta llegar a una total coincidencia.

5.3.1.1. Determinación del peso molecular

Para aquellos compuestos que pueden ionizarse por uno de los métodos descritos anteriormente, dando el ion molecular o un ion molecular protonado, el espectrómetro de masas es una herramienta insuperable para la determinación del peso molecular. Esta determinación, naturalmente, requiere la identificación del pico del ion molecular, o en algunos casos, del pico $(M + 1)^+$ o $(M - 1)^+$. La localización del pico en la abscisa da entonces el peso molecular con una precisión que no puede alcanzarse por ningún otro método.

Una determinación del peso molecular por espectrometría de masas requiere conocer con seguridad la identidad del pico del ion molecular. Por esta razón es siempre aconsejable ser precavido, en particular con fuentes de impacto de electrones, donde el pico del ion molecular puede estar ausente o ser pequeño en relación con los picos

debidos a impurezas. Cuando existen dudas, son particularmente útiles los espectros adicionales usando otras técnicas blandas de ionización.

5.3.1.2. Determinación de fórmulas moleculares

Las fórmulas moleculares se pueden determinar a partir del espectro de masas de un compuesto, siempre que el pico del ion molecular pueda ser identificado y su masa exacta determinada.

Fórmulas a partir de instrumentos de alta resolución. A menudo puede asignarse una única fórmula para un compuesto a partir de la masa exacta del pico del ion molecular. Esta aplicación, sin embargo, requiere instrumentos de alta resolución capaces de detectar diferencias de masas de unas pocas milésimas de unidad de masa. Considérese, por ejemplo, las relaciones masa/carga de los siguientes compuestos: purina, $C_5H_4N_4$ ($m = 120.044$); benzamidina, $C_7H_8N_2$ ($m = 120.069$); etiltolueno, C_9H_{12} ($m = 120.096$) y acetofenona, C_8H_8O ($m = 120.058$). Si la masa medida del pico del ion molecular es $120.070 (\pm 0.005)$, entonces todos menos $C_7H_8N_2$ deben excluirse como fórmulas posibles. Han sido compiladas tablas que listan todas las combinaciones razonables de C, H, N y O para un peso molecular que varía en la tercera o cuarta cifra decimal. En la Tabla 6 se muestra una pequeña porción de una compilación de este tipo.

Fórmulas a partir de relaciones isotópicas. Los datos de un instrumento de baja resolución que puede sólo discriminar entre iones que difieren en masa por un número entero de masa pueden dar información útil sobre la fórmula de un compuesto, con tal que sólo el pico del ion molecular sea suficientemente intenso para que su altura y las alturas de los picos de los isótopos $(M + 1)^+$ y $(M + 2)^+$ puedan determinarse con precisión.

El uso de las alturas relativas de los picos de isótopos para la determinación de fórmulas moleculares se facilita mucho con tablas, una pequeña parte de las cuales se muestra en la Tabla 6. En la última, se da un listado de todas las combinaciones razonables de C, H, O y N para los números de masa 83 y 84 (las tablas originales se extienden hasta el número de masa 500). Están tabuladas las alturas de los picos $(M+1)^+$ y $(M + 2)^+$ dadas como porcentajes de la altura del pico M^+ . Si se puede llevar a cabo una determinación experimental con una precisión razonable, se puede determinar fácilmente una fórmula probable. Por ejemplo, un pico de ion molecular a la masa 84 con valores de $(M + 1)^+$ y $(M + 2)^+$ de 5.6 y 0.3% de M^+ sugiere un compuesto que tenga la fórmula C_5H_8O .

Tabla 6. Abundancia isotópica y pesos moleculares para varias combinaciones de C, H, O y N

Abundancia, % M altura de pico					
	Fórmula	M + 1	M + 2	Peso molecular	
M = 83	C ₂ HN ₃ O ³	3,36	0,24	83,0120	
	C ₂ H ₃ N ₄	3,74	0,06	83,0359	
	C ₃ HNO ₂	3,72	0,45	83,0007	
	C ₃ H ₃ N ₂ O	4,09	0,27	83,0246	
	C ₃ H ₅ N ₃	4,47	0,08	83,0484	
	C ₄ H ₃ O ₂	4,45	0,48	83,0133	
	C ₄ H ₅ NO	4,82	0,29	83,0371	
	C ₄ H ₇ N ₂	5,20	0,11	83,0610	
	C ₅ H ₇ O	5,55	0,33	83,0497	
	C ₅ H ₉ N	5,93	0,15	83,0736	
	C ₆ H ₁₁	6,66	0,19	83,0861	
	M = 84	CN ₄ O	2,65	0,23	84,0073
		C ₂ N ₂ O ₂	3,00	0,43	83,9960
C ₂ H ₂ N ₃ O		3,38	0,24	84,0198	
C ₂ H ₄ N ₄		3,75	0,06	84,0437	
C ₃ O ₃		3,36	0,64	83,9847	
C ₃ H ₂ NO ₂		3,73	0,45	84,0085	
C ₃ H ₄ N ₂ O		4,11	0,27	84,0324	
C ₃ H ₆ N ₃		4,48	0,08	84,0563	
C ₄ H ₄ O ₃		4,46	0,48	84,0211	
C ₄ H ₆ NO		4,84	0,29	84,0449	
C ₄ H ₈ N ₂		5,21	0,11	84,0688	
C ₅ H ₈ O		5,57	0,33	84,0575	
C ₅ H ₁₀ N		5,94	0,15	84,0814	
C ₆ H ₁₂		6,68	0,19	84,0939	
C ₇		7,56	0,25	84,0000	

* Tomado de R. M. Silverstein, G. C. Bassler y T. C. Morrill, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 4.ª ed., pág. 49. New York: Wiley, 1981.

La relación isotópica es particularmente útil para la detección y estimación del número de átomos de azufre, cloro y bromo en una molécula debido a la gran contribución que tienen sobre el $(M + 2)^+$ (vease Tabla 6). Por ejemplo, la presencia de un $(M + 2)^+$ que es alrededor del 65% del pico M^+ indica que la molécula tiene dos átomos de cloro; por otro lado, un pico $(M + 2)^+$ del 4% sugeriría la presencia de un átomo de azufre.

Veamos un ejemplo de cómo calcular la relación isotópica para el cloroformo (Cl₃CH) cuyo peso molecular es $35 \times 3 + 12 + 1 = 118$ umas. Sabemos que la abundancia relativa del isótopo de ³⁵Cl, al que llamaremos A, es del 100% y la del isótopo ³⁷Cl, al que llamaremos B, es del 33%. Las distintas posibilidades serían:

$$A A A \quad 1 \times 1 \times 1 = 1$$

Total de 3 átomos de A = 100%

$$A A B \quad 1 \times 1 \times 0.33 = 0.33$$

$$A B A \quad 1 \times 0.33 \times 1 = 0.33$$

$$B A A \quad 0.33 \times 1 \times 1 = 0.33$$

Total de 2 átomos de A y 1 de B = 0.99 100%

$$B B A \quad 0.33 \times 0.33 \times 1 = 0.09$$

$$B A B \quad 0.33 \times 1 \times 0.33 = 0.09$$

A B B $1 \times 0.33 \times 0.33 = 0.09$
 Total de 2 átomos de B y 1 de A = 0.27 27%

B B B $0.33 \times 0.33 \times 0.33 = 0.03$
 Total de 3 átomos de B = 3%

118	120	122	124
M ⁺	M ⁺²	M ⁺⁴	M ⁺⁶
100%	100%	27%	3%

Información estructural a partir de modelos de fragmentación. Los estudios sistemáticos de modelos de fragmentación para sustancias puras han desembocado en el establecimiento de ciertas guías que permiten predecir los mecanismos de fragmentación y una serie de reglas generales que son una ayuda en la interpretación de espectros. Rara vez es posible (o deseable) explicar todos los picos del espectro. Sin embargo, si que se utilizan los modelos característicos de fragmentación.

Identificación de compuestos por comparación de espectros. Generalmente, después de la determinación del peso molecular del analito y del estudio de su distribución isotópica y de la aplicación de los modelos de fragmentación, a un espectroscopista de masas experimentado le es posible reducir las posibles estructuras a unas pocas. Cuando son aseguibles compuestos de referencia, la identificación final se basa entonces en una comparación de los espectros de masas del analito con los espectros de muestras patrón de los compuestos esperados. El procedimiento se basa en suponer que (1) los modelos de fragmentación son únicos y (2) que las condiciones experimentales se pueden controlar lo suficiente como para producir espectros reproducibles. La probabilidad que tienen compuestos diferentes de dar el mismo espectro se hace cada vez menor a medida que aumentan los picos espectrales. Por esta razón, la ionización por impacto de electrones es el método elegido para comparar espectros.

Desafortunadamente, las alturas de los picos de los espectros de masas dependen en gran parte de variables tales como la energía del haz de electrones, la localización de la muestra con respecto al haz, la presión de la muestra y la temperatura. En consecuencia, se observan variaciones significantes en la abundancia relativa para espectros obtenidos en diferentes laboratorios y con diferentes instrumentos. Sin embargo, ha sido posible en un número remarcablemente elevado de casos identificar analitos a partir de espectros de biblioteca obtenidos con diversos instrumentos y condiciones de trabajo. Generalmente, sin embargo, es deseable confirmar la identidad de un compuesto por comparación de su espectro con el espectro de un compuesto auténtico obtenido con el mismo instrumento y bajo idénticas condiciones.

Sistemas de búsqueda en bibliotecas computarizados. A pesar que las bibliotecas de datos espectrales de masas son aseguibles en forma de textos, los espectrómetros de masas más modernos están equipados con sistemas de búsqueda en biblioteca computarizados muy eficaces. Normalmente se encuentran dos tipos de bibliotecas: unas muy extensas y otras más pequeñas pero específicas. Las bibliotecas de espectros de masas más extensas (> 150 000 espectros) son aseguibles comercialmente. Las bibliotecas pequeñas normalmente contienen de unos pocos cientos a unos pocos miles de espectros para aplicación a una determinada área, tal

como residuos de pesticidas, drogas o muestras forenses. Las bibliotecas pequeñas forman parte a menudo del grupo de paquetes ofrecidos por los fabricantes de instrumentos y es casi siempre posible para el usuario del instrumento generar una biblioteca o hacer adiciones sobre una biblioteca existente.

En el caso de un gran número de espectros, como los obtenidos cuando un espectrómetro de masas se acopla con un cromatógrafo para la identificación de los compuestos de una mezcla, el ordenador del instrumento puede adaptarse para que lleve a cabo una búsqueda en biblioteca en todos, o en cualquier subgrupo, de los espectros de masas que se obtienen con una muestra particular. Los resultados se muestran al usuario y, si lo desea, los espectros de referencia se pueden visualizar en un monitor o se pueden imprimir para una comparación visual.

5.3.2. Análisis cuantitativo: determinación de concentraciones moleculares

La espectrometría de masas ha sido ampliamente utilizada en la determinación cuantitativa de uno o más componentes en sistemas complejos orgánicos (y a veces inorgánicos) tal como los que se encuentran en las industrias del petróleo, farmacéutica y en estudios de problemas ambientales. Normalmente, tales análisis se llevan a cabo pasando la muestra a través de una columna cromatográfica y por el espectrómetro. Con el espectrómetro se obtiene un valor adecuado de m/z , entonces se registra la corriente de iones en función del tiempo. Esta técnica se llama registro selectivo de iones. La gráfica de los datos, llamada cromatograma de masas, consiste en una serie de picos cromatográficos apareciendo cada pico a un tiempo que es característico de uno de los diversos componentes de la muestra que da iones del valor o valores elegidos para m/z . Generalmente, las áreas bajo los picos son directamente proporcionales a las concentraciones del componente y por tanto sirven como parámetro analítico. En este tipo de procedimiento, el espectrómetro de masa simplemente sirve como un detector selectivo sofisticado para el análisis cromatográfico cuantitativo.

En el segundo tipo de espectrometría de masas cuantitativa para especies moleculares, las concentraciones de analito se obtienen directamente de las alturas de los picos espectrales de masas. Para mezclas simples, es a veces posible encontrar para cada componente picos a un valor m/z único. En estas circunstancias, se pueden preparar curvas de calibrado de las alturas de los picos frente a la concentración y utilizarlas para el análisis cuantitativo. Sin embargo, se pueden obtener resultados más precisos incorporando una cantidad fija de una sustancia estándar interno tanto en las muestras como en los patrones. La relación de la intensidad de pico de las especies de analito y los estándares internos se representa entonces en función de la concentración de analito. El estándar interno tiende a reducir las imprecisiones que surgen de la preparación y en la introducción de la muestra. Con las pequeñas cantidades de muestra que se necesitan en espectrometría de masas, estas incertidumbres son a menudo la mayor fuente de errores indeterminados.