

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 664**

51 Int. Cl.:

**G01N 1/40** (2006.01)

**H01J 49/26** (2006.01)

**G01N 33/483** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.02.2010 PCT/CA2010/000136**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.08.2010 WO10085897**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2010 E 10735472 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 2391877**

54 Título: **Método y sistema de desorción ablativa blanda**

30 Prioridad:

**02.02.2009 US 202161 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**11.02.2020**

73 Titular/es:

**LIGHT MATTER INTERACTION INC. (100.0%)  
95 Advance Road  
Toronto M8Z 2S6, CA**

72 Inventor/es:

**MILLER, R.J. DWAYNE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 741 664 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método y sistema de desorción ablativa blanda

**Campo de la invención**

5 La presente invención está relacionada con la desorción de analito desde una muestra para métodos analíticos. Más particularmente, la presente invención está relacionada con métodos de preparación de muestras para espectrometría de masas.

**Antecedentes de la invención**

10 Uno de los problemas más importantes en asistencia sanitaria actualmente es la detección temprana de estados de enfermedad, uno es tratar de detectar el comienzo del cáncer o de una infección viral específica. Las tecnologías de ensayo más corrientes implican microlitros o mililitros de muestra y tienen límites de detección moderados que requieren una concentración significativa de analito. Por otro lado, una única gota de sangre o saliva puede contener una firma química completa de estados particulares de bienestar o enfermedad basada en proteínas u otras moléculas que se expresan durante el estado de angustia se expresan en cantidades de trazas. Para detectar niveles de traza de analito con volúmenes de muestra tan pequeños, se requiere un límite de detección en el intervalo de una única molécula.

15 Con los últimos avances en espectrometría de masas que proporcionan ópticas eficientes de captación de iones y de alta eficiencia de ionización, el estado de la técnica está un paso más cerca de lograr ensayos robustos con límites de detección bajos. Sin embargo, a fin de ofrecer ensayos cuantitativos con límites de detección bajos en el régimen de única molécula, es necesario resolver dos problemas.

20 El primer problema asociado con métodos actuales de espectrometría de masas es que el proceso de ionización no es completamente reproducible. La ionización es una etapa necesaria que ocurre después de la volatilización de las moléculas de interés, pero antes del proceso de detección basado en la ratio masa a carga. Debido a fluctuaciones no lineales en el resultado de ionización entre distintas muestras, se introduce ruido en el proceso de detección que resulta en un límite de detección elevado. Como resultado, los métodos actuales, a pesar de su alta sensibilidad, no se consideran suficientemente cuantitativos para diagnóstico clínica.

25 Los dos métodos más comunes para introducir moléculas a la fase gaseosa son desorción de láser asistida por matriz (MALDI) y electrospray. El mismo acto de ionización es altamente no lineal para ambos métodos de ionización. En caso de MALDI, hay reacciones químicas complejas que implican intercambio de protones que inherentemente no son lineales y ocurren en condiciones de no equilibrio. De manera similar, electrospray implica la carga de gotitas que lleva a fluctuaciones estadísticas que son amplificadas por el consiguiente proceso de explosión de coulomb que separa moléculas de solvente en el método de electrospray. El número de iones generados para una cantidad dada de material introducido a la fase gaseosa por cualquier método es irreproducible debido a la naturaleza altamente no lineal de la etapa de generación de iones. Pequeñas diferencias en las condiciones se traducen en grandes variaciones en las especies detectadas.

35 Para lograr un ensayo de diagnóstico clínico cuantitativo con un bajo coeficiente de variación y un bajo límite de detección, es esencial que cualquier medición sea altamente reproducible. Hasta la fecha, el proceso de ionización no lineal ha impedido que la espectrometría de masas logre límites de detección de única molécula y el nivel requerido de cuantificación a fin de capturar firmas de enfermedad en la fase de desarrollo más temprana posible con cantidades diminutas de tejido o fluidos corporales.

40 Un segundo problema es que el mismo acto de generar una muestra en fase gaseosa del espécimen de interés, según sea necesario para espectrometría de masas puede llevar a extensa fragmentación de la molécula progenitora. Las diversas proteínas en el cuerpo son todas muy similares, al estar compuestas de los mismos nucleótidos y monómeros de aminoácido. Una excesiva fragmentación hace imposible hacer asignaciones únicas a especies moleculares. Siempre que se tenga un componente de ion progenitor, como punto de referencia, patrones de fragmentación pueden ayudar en la identificación de la molécula progenitora.

45 Desafortunadamente, el patrón de fragmentación tiene que ser altamente reproducible y único para una molécula dada. Si hay presente más de una especie molecular posible, entonces la fragmentación lleva a solapamiento de picos de masa y pérdida de identificación. A fin de identificar proteínas dentro de una muestra no purificada o directamente de tejido, la fragmentación de la molécula progenitora se minimiza lo máximo posible para evitar la congestión en los patrones de fragmentación y es necesario introducir la fragmentación de manera controlada y conocida. De otro modo, habrá demasiado solapamiento de fragmentos comunes para descifrar el patrón de fragmentación e identificar la molécula de interés (por ejemplo, una proteína). Los métodos actuales de espectrometría de masas son incapaces de lograr tal control sobre la fragmentación, y por lo tanto requieren las etapas onerosas mencionadas anteriormente de separación preanalítica. Por esta razón, la espectrometría de masas ha sido confinada principalmente a identificación de muestras altamente purificadas.

55 Este problema es exacerbado por la propensión natural de ciertas moléculas a formar agregados, y es particularmente

grave en investigación proteómica donde se está interesado en información cuantitativa sobre la expresión de ciertas proteínas. Sin embargo, estas proteínas a menudo ocurren de manera natural en complejos o una distribución de moléculas aisladas y múltiples complejos con diferentes proteínas que implican equilibrios complicados con otros varios complejos de proteínas. Dentro de un espectrómetro de masas, la ionización de complejos proteicos lleva a patrones de fragmentación o ratios de masa espuria a carga que enmascara la identidad de la(s) molécula(s) de interés.

Por esta razón, la mayor parte del tiempo implicado en realizar un ensayo proteómico implica la purificación preanalítica de las proteínas, que se logra mediante procesamiento por lotes de cantidades relativamente grandes de material y usando diversas etapas complejas y que consumen mucho tiempo (tales como cromatografía y electroforesis) para separar la mezcla inicial hasta componentes proteicos altamente purificados. Las proteínas purificadas se inyectan luego en un espectrómetro de masas para identificación. La etapa de purificación es necesaria para permitir identificación de la proteína al asegurar que todos los fragmentos de masa son de la misma molécula.

Incluso con esta etapa, la cuantificación de la cantidad de proteína presente en la muestra inicial simplemente no es posible, por las razones tratadas anteriormente. Además, la necesidad de purificar proteínas antes de someter la muestra de interés a detección reduce enormemente la eficiencia o el rendimiento de la espectrometría de masas. Como resultado, a pesar de la sensibilidad inherentemente alta de la espectrometría de masas, se requieren grandes volúmenes de muestra a fin de compensar las pérdidas aguas abajo en las etapas de purificación. Para lograr los últimos límites de detección de espectrometría de masas, se requiere aislamiento in situ y separación de especies moleculares de interés.

Por lo tanto lo que es necesario es un método mejorado de preparación de muestras para espectrometría de masas que ofrezca ionización reproducible y mínima fragmentación molecular requerida para ensayos cuantitativos y sensibles.

La patente de Estados Unidos n.º de publicación US2006/0195072 proporciona un método de procesamiento de materiales con láser, específicamente procesos de ablación inducida por láser para retirada con láser de material particularmente importante en aplicaciones médicas y dentales en las que la retirada con láser de material debe hacerse de tal manera que no dañe nada del biomaterial circundante blando o duro. El proceso de ablación se logra por deposición impulsiva de calor (IHD) por excitación directa y específica de fonones o vibraciones de vida corta o del material de tal manera que no genere iones altamente reactivos y dañinos a través de absorción multifotónica. La deposición de calor y el proceso de ablación consiguiente en condiciones prescritas de tiempo y longitud de onda para irradiación con láser se logra más rápido que la transferencia de calor a tejido circundante ya sea por expansión acústica o térmica o difusión térmica que de otro modo llevaría a exceso de daño relacionado con calor. El resultado es que toda la energía de láser depositada es canalizada óptimamente hacia el proceso de ablación en el que las tensiones confinadas inercialmente desde fuerzas fotomecánicas de expansión y transiciones de fase impulsadas térmicamente y cambios de volumen asociados interfieren constructivamente para impulsar el proceso de ablación más eficiente posible con mínimo daño a áreas circundantes ya sea por radiación de ionización o efectos de calor. Al elegir un intervalo específico de longitudes de onda, conformación espacial y temporal de impulsos de láser de infrarrojos, la energía se puede depositar óptimamente de manera que aumente aún más la eficiencia del proceso de ablación con respecto a minimizar el daño colateral.

### **Compendio de la invención**

Realizaciones de la presente invención abordan los obstáculos mencionados anteriormente en desorción de muestras y preparación de muestras de espectrometría de masas al proporcionar métodos y sistemas que permiten mejor reproducibilidad y menor límite de detección.

En una realización, la invención proporciona un método para la desorción blanda del analito desde una muestra, en la que un haz óptico absorbido dentro de una zona irradiada de la muestra provoca excitaciones vibratorias de un componente dentro de la muestra. El haz óptico se provee de suficiente energía para supercalentar el componente, en el que excitaciones vibratorias rápidamente transfieren energía a excitaciones traslacionales que conducen el proceso de desorción ablativa. El haz óptico se proporciona durante un intervalo de tiempo que es menor que la duración de tiempo requerida para la pérdida de energía de la zona irradiada debido a difusión térmica y expansión acústica. Como resultado, la energía depositada por el haz óptico se proporciona primaria a movimiento traslacional a través del proceso anterior, dando como resultado la ablación rápida de la muestra dentro de la zona irradiada. Como el lapso para desorción es más rápido que el lapso para transferencia de energía desde el componente al analito dentro de la muestra, el analito es desorbido por medio de un proceso de ablación blanda en la que el analito se entrega a una fase gaseosa sustancialmente sin ionización y fragmentación.

Por consiguiente, en un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para realizar la desorción blanda del analito desde una muestra, el método comprende las etapas de:

irradiar la muestra con un haz óptico; y

excitar ópticamente niveles vibratorios de un componente de la muestra dentro de una zona irradiada;

en donde la muestra es irradiada durante un intervalo de tiempo que es menor que una duración de tiempo requerida para pérdida de energía más allá de la zona irradiada para difusión térmica y expansión acústica; y

en donde energía absorbida del haz óptico por el componente es suficiente para supercalentar el componente y provocar la eyección de una estela de ablación desde la zona irradiada.

- 5 En una realización preferida, la estela de ablación que comprende analito desorbido es ionizada y dirigida hacia la entrada de un dispositivo de análisis de masas tal como un espectrómetro de masas. En una realización, la estela de ablación es ionizada dentro de una región evacuada por un haz óptico ultravioleta de vacío que es dirigido sobre la estela eyectada. En otro aspecto de la invención, la estela de ablación es ionizada por un proceso resonante lineal en el que un haz óptico es dirigido sobre la estela de ablación, donde el haz óptico comprende contenido espectral y un perfil de fase para ionizar selectivamente el analito por proceso resonante de un fotón donde se excitan niveles electrónicos desde un estado inicial a un estado de ionización.
- 10

Por consiguiente, en otro aspecto de la invención, se proporciona un método para preparar una muestra para análisis de masas, el método comprende las etapas de:

irradiar una muestra con un haz óptico; y

- 15 excitar ópticamente niveles vibratorios de un componente de la muestra dentro de una zona irradiada;
- en donde la muestra es irradiada durante un intervalo de tiempo que es menor que una duración de tiempo requerida para pérdida de energía más allá de la zona irradiada para difusión térmica y expansión acústica;
- en donde energía absorbida del haz óptico por el componente es suficiente para supercalentar el componente y provocar la eyección de una estela de ablación desde la zona irradiada;

- 20 ionizar la estela de ablación con medios ionizadores; y

dirigir la estela de ablación ionizada a una entrada de un dispositivo de análisis de masas.

En otra realización de la invención, se proporciona un sistema para desorber un analito, en donde la muestra comprende un componente que tiene un espectro de excitación que comprende niveles de energía vibratoria, el sistema comprende:

- 25 un aparato óptico para dirigir un haz óptico sobre una muestra e irradiar un volumen de irradiación dentro de la muestra, el haz óptico comprende:

un espectro de frecuencias para excitar ópticamente niveles vibratorios de un componente de la muestra;

una duración de tiempo más corta que es menor que un lapso requerido para pérdida de energía más allá de la zona irradiada para difusión térmica y expansión acústica; y

- 30 suficiente energía para supercalentar el componente y provocar eyección de una estela de ablación desde la zona irradiada.

En una realización preferida, el sistema comprende además medios de ionización para ionizar la estela de ablación y un espectrómetro de masas para realizar análisis de masas del analito ionizado, en donde la muestra se posiciona para dirigir la estela de ablación a través de una entrada del espectrómetro de masas. Más preferiblemente, los medios de ionización comprenden un segundo aparato óptico para fotoionizar la estela de ablación.

35

Un entendimiento adicional de los aspectos funcionales y ventajosos de la invención se puede realizar por referencia a la siguiente descripción y dibujos detallados.

### Breve descripción de los dibujos

- 40 Ahora se describirán realizaciones preferidas de la invención, a modo de ejemplo únicamente, con referencia a los dibujos, en los que:

La figura 1 ilustra el proceso de desorción ablativa blanda, donde (a) muestra el espectro de absorción vibratoria del agua, (b) ilustra los lapsos implicados en acoplamiento entre estados vibratorio y traslacional, y (c) ilustra la ablación de una muestra líquida.

- 45 La figura 2 ilustra el ancho de impulso y la profundidad de absorción de un impulso óptico empleado para desorción ablativa blanda.

La figura 3 ilustra el efecto del perfil espacial del haz óptico en la estela de ablación y el material circundante.

La figura 4 muestra (a) la desorción del analito limitada en un complejo, y (b) el uso de un segundo haz óptico para disociar la desorción de analito ligado en un complejo, y (b) el uso de un segundo haz óptico para disociar un complejo

antes de la desorción. La figura 5 ilustra, secuencialmente a través de fotogramas (a)-(d), el proceso de retroceso para una muestra ópticamente gruesa.

La figura 6 muestra disposiciones para la excitación óptica delantera (a) y trasera (b) de una muestra ópticamente delgada alojada en un porta-muestra.

5 La figura 7 ilustra un alojamiento para encerrar un porta-muestra mientras se proporciona acceso externo a pocillos encerrados.

La figura 8 ilustra un proceso de desorción ablativa en dos etapas en las que analito es (a) desorbido primero hasta un pocillo adyacente que contiene un desnaturalante y (b) posteriormente es desorbido.

10 La figura 9 muestra una realización en la que una muestra es (a) inicialmente desorbida ablativamente hasta una distribución espacial de pocillos, como se muestra en (b), y (c) posteriormente es desorbida en los pocillos.

La figura 10 proporciona un diagrama de flujo que ilustra un método para realizar el proceso de desorción ablativa.

La figura 11 muestra un esquema de un sistema en el que se posiciona un porta-muestra adyacente a una entrada de un espectrómetro de masas.

15 La figura 12 ilustra la fotoionización de una muestra por un haz ultravioleta de vacío para (a) una muestra ópticamente gruesa y (b) muestra ópticamente delgada.

La figura 13 ilustra un sistema en el que una distribución de pocillos se rellenan usando un dispositivo capilar antes de desorción ablativa y subsiguiente detección por un espectrómetro de masas.

La figura 14 compara la inyección de muestra en un espectrómetro de masas según (a) una realización de la presente invención y (b) un proceso de inyección por electrospray.

20 La figura 15 ilustra la fotoionización de una estela de ablación eyectada usando excitación resonante lineal en condiciones ambientales.

La figura 16 ilustra el proceso de fotoionización resonante lineal, que muestra (a) niveles de energía de una molécula, (b) el contenido espectral de un haz de fotoionización, y (c) un espectro de masas resultante.

25 La figura 17 muestra fotoionización lineal no resonante y resonante para la ionización selectiva de una molécula específica (proceso de cromatografía óptica).

La figura 18 muestra un esquema de un sistema para la desorción ablativa blanda y análisis de masas de una muestra.

### Descripción detallada de la invención

30 Sin limitación, la mayoría de los sistemas descritos en esta memoria se dirigen a un proceso que implica la desorción ablativa blanda de un analito. Según sea necesario, en esta memoria se describen realizaciones de la presente invención. Sin embargo, las realizaciones descritas son meramente ejemplares, y se debe entender que la invención puede ser plasmada en muchas formas diversas y alternativas.

35 Las figuras no están a escala y algunos rasgos pueden estar exagerados o minimizados para mostrar detalles de elementos particulares mientras elementos relacionados pueden haber sido eliminados para impedir enturbiar aspectos novedosos. Por lo tanto, los detalles estructurales y funcionales específicos descritos en esta memoria no deben interpretarse como una limitación, sino como una base para las reivindicaciones y como una base representativa para la enseñanza a un experto en la técnica de cómo emplear de manera variable la presente invención. Por motivos de enseñanza y no limitación, las realizaciones ilustradas se dirigen a la desorción ablativa blanda de un analito, en particular cuando la desorción ablativa se logra con agua como propelente ablativo.

40 Como se emplea en esta memoria, el término "aproximadamente", cuando se usa conjuntamente con intervalos de dimensiones, temperaturas u otras propiedades o características físicas se pretende que cubra ligeras variaciones que pueden existir en los límites superior e inferior de los intervalos de dimensiones para no excluir realizaciones donde de media la mayoría de las dimensiones se satisfacen pero donde pueden existir dimensiones estadísticamente fuera de esta región.

45 Como se emplea en esta memoria, el término "óptico" significa ondas electromagnéticas que se propagan a alta frecuencia, incluidas, pero sin limitación a estas, visibles, infrarrojos, ultravioleta y radiación ultravioleta de vacío.

50 En una primera realización, la presente invención proporciona un único método de preparación de muestras para la desorción en fase gaseosa de analito, donde el analito se eyecta desde la muestra en un estado que está sustancialmente libre de fragmentación, ionización y excitación. Antes de proceder con la descripción de realizaciones de la invención, a continuación se proporciona una exposición de la novedad y utilidad del método de desorción ablativa blanda para preparación de muestras que subyace en varias realizaciones preferidas de la invención.

Hasta hace poco, generalmente se creía que el único método para lograr ablación por láser de un material sin dañar el material circundante era usar impulsos láser los más cortos posibles. La patente de EE.UU. N.º 5.720.894 de J. Neev et al. es un ejemplo primordial de esta enseñanza en la técnica. Esta patente describe el uso de impulsos ultracortos de láseres desde femtosegundos a picosegundos para realizar ablación de materiales a través de la excitación de electrones, efectos de avalancha de electrones que crean absorción no lineal para localizar la absorción de luz, y subsiguiente formación de plasma. En este escenario, los impulsos láser están típicamente en longitudes de onda de infrarrojos cercanos y visibles por las que la absorción de luz promueve electrones a niveles electrónicos superiores de la molécula o bandas en materiales en estado sólido. Eficazmente, los impulsos láser se usan para depositar suficiente energía a través de estos electrones excitados para ionizar altamente el material y crear un plasma. El plasma a su vez ya no está en un estado ligado de la materia y experimenta liberación ablativa, conducido por fuerzas de Coulomb así como el exceso de energía depositada para generar iones.

En condiciones de excitación de láser fuerte de femtosegundos, la absorción de luz está confinada a unos pocos cientos de nanómetros a través de absorción no lineal por el material y electrones casi libres resultantes. La deposición de energía mediante este método sube la temperatura de retícula a varios miles de grados para crear el estado de materia de plasma desligado y la subsiguiente ablación. Este método requiere absorción muy fuerte de la luz láser para localizar la deposición de energía de modo que se use la cantidad mínima de energía para conducir la ablación.

También es importante reconocer que en el proceso mencionado anteriormente de ablación por láser en femtosegundos, la energía se deposita en los electrones. La energía en última instancia debe ir desde los electrones altamente excitados a fonones de retícula o vibraciones mecánicas del medio anfitrión y posteriormente hasta movimientos traslacionales del propio proceso de ablación. Este proceso global tarda muchos picosegundos para obtener temperaturas de retícula suficientemente altas para lograr ablación.

Además, el uso de transiciones electrónicas en condiciones de excitación fuerte lleva necesariamente a ionización multifotónica, como parte inherente de la fuerte localización de la absorción de luz. La absorción multifotónica genera indiscriminadamente densidades muy altas de iones altamente reactivos en la formación del estado de plasma, ionizando todo, y acompañado por desintegración casi completa del material. Esta ionización indiscriminada y fragmentación masiva, a átomos casi desnudos, lleva a pérdida completa de identidad molecular y hace que este mecanismo de ablación por láser sea inútil para aplicaciones en espectrometría de masas. Como tal, la formación de plasma puede alterar significativamente la repetibilidad y la cuantificación en aplicaciones de espectrometría de masas.

El proceso mencionado anteriormente, que implica la generación de electrones altamente excitados para conducir la ionización y la ablación, es realmente más lento que la relajación de energía vibratoria del agua hacia traslaciones. La transferencia de energía desde electrones a fonones ocurre a través de un proceso conocido como acoplamiento electrón-fonón y ocurre en lapso de picosegundos - en un orden de magnitud más lento que la relajación de energía vibratoria hasta movimientos traslacionales del agua.

Esta distinción importante fue realizada por los presentes inventores y adaptada para uso como método para procesamiento de material ablativo con láser, como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. n.º de serie 11/321.057 correspondiente a la patente de EE.UU. n.º de publicación 20060190572, titulada "Laser Selective Cutting by Impulsive Heat Deposition in the IR Wavelength Range for Direct-Drive Ablation". En este contexto, se describió que el uso de excitación por infrarrojos de modos vibratorios del agua puede depositar energía eficazmente directamente en grados de libertad ablativos y significativamente más rápido que incluso la ablación en frío acuñada para el procesamiento con láser en femtosegundos anterior que explota la excitación de electrones y electrones casi libres.

La presente invención surge de la comprensión y el descubrimiento de que el método ablativo de procesamiento de material mencionado anteriormente, cuando se aplica a muestras que contienen analito molecular de interés, se podría usar para desorber moléculas de analito sin ionización o fragmentación.

Por consiguiente, al explotar el acoplamiento eficiente de energía absorbida en los modos de infrarrojos a traslacional, es posible vencer las deficiencias del uso de ablación por láser en femtosegundos basado en transiciones electrónicas y obtener un proceso de desorción ablativa blanda sustancialmente libre de efectos de radiación ionizantes.

Según realizaciones de la presente invención, se aprovecha explícitamente el espectro vibratorio específico de modo de un componente de la muestra, tal como agua, para depositar selectivamente energía en unas vibraciones intramoleculares que eficazmente van directamente a los modos traslacionales requeridos para ablación y desorción. Este método se puede aplicar igualmente a otras moléculas que también experimentan relajación de energía vibratoria a movimientos traslacionales. El agua es el ejemplo primordial ya que es el mayor constituyente de la mayoría de muestras biológicas y experimenta la conversión de energía más rápida. Si bien la descripción precedente se enfoca principalmente en el agua como componente de muestra que conduce la desorción ablativa a través de absorción vibratoria, se tiene que entender que otros componentes moleculares que tienen excitaciones vibratorias dentro de un material también pueden servir como componente para conducir la desorción ablativa blanda según realizaciones de la invención. Por ejemplo, en un ejemplo no limitativo, se pueden usar vibraciones de amida, bandas de fosfato, tramos/combinaciones de C-H.

En una realización preferida de la invención, se deposita energía desde un haz óptico a agua dentro de una muestra, provocando la eyección de una estela de ablación que propulsa moléculas muy grandes hacia la fase gaseosa en lapsos más rápidos que lo que se puede transferir energía desde las moléculas de agua caliente al analito de interés y así introduce moléculas de analito a la fase gaseosa con la menor cantidad posible de exceso de energía. Como resultado, este método de absorción ablativa blanda (preferiblemente conducido por un láser u otra fuente óptica intensa) es un método leve para desorber biomoléculas grandes hasta la fase gaseosa.

Este aspecto es importante, porque en muchas técnicas analíticas es preferible depositar cantidades mínimas de energía en el analito antes de la detección, ya que la deposición de grandes cantidades de energía en el analito puede a menudo llevar a fragmentación no controlada y pérdida de la capacidad para identificar el analito, especialmente en una mezcla de moléculas diferentes.

Por ejemplo, en aplicaciones que implican análisis de masas, en las que el analito es ionizado posteriormente, la presencia del llamado ion progenitor (la molécula original menos un único electrón) es muy importante la identificación apropiada de moléculas. El patrón de fragmentación también es importante pero debe ser tan estrecho como una distribución como sea posible para evitar solapamiento con otras posibles especies.

La absorción extremadamente fuerte de agua es otro aspecto importante de métodos según la invención. Este rasgo lleva a fuerte localización de la energía absorbida, lo que es útil para minimizar el exceso de efectos de calentamiento. Por consiguiente, se requiere muy poca energía por impulso para supercalentar agua muy por encima de su punto de vaporización y hacer que experimente un proceso de ablación por impulsos. Por ejemplo, energías de impulso usando tan solo 100 microjulios por impulso para un foco de 100 micrómetros son suficientes para conducir moléculas a la fase gaseosa debido a las inherentes secciones transversales grandes de absorción en la parte de infrarrojos del espectro de absorción y la baja temperatura de transición de fase gaseosa del agua. En este escenario, la energía permanece principalmente en las moléculas de agua altamente excitadas. En un aspecto igualmente importante, el proceso de ablación se puede controlar fácilmente para que no implique ionización multifotónica. Eficazmente, se deposita energía selectivamente en agua para que actúe como propelente para conducir las moléculas a la fase gaseosa.

Cabe señalar que la mayoría de muestras biológicas comprenden una concentración significativa de agua (los seres humanos están constituidos por un 60% de agua), y de toda la materia constituyente humana, el agua tiene el punto de ebullición o la transición de fase a fase gaseosa más bajos. El agua por lo tanto es un componente preferido para actuar como propelente para la desorción ablativa blanda. Tiene un proceso de deposición de energía increíblemente rápido a los grados de libertad correctos para ablación como se ha tratado anteriormente. El hecho de que tiene un punto de ebullición bastante bajo significa que el agua se puede conducir por impulsos hasta la fase gaseosa, propulsando todas las moléculas dentro del volumen calentado también a la fase gaseosa, a temperaturas de redícula suficientemente bajas como para evitar daño colateral o que se queme el material adyacente. La publicación "Ultrafast Memory Loss and Energy Redistribution in the Hydrogen Bond Network of Liquid H<sub>2</sub>O", Nature 2005, 434(7030), 199-202, de M.L. Cowan, B.D. Bruner, N. Huse, J.R. Dwyer, B. Chugh, E.T.J. Nibbering, T. Elsaesser, y R.J.D. Miller, describe la dinámica de distribución de energía del H<sub>2</sub>O y la pérdida de correlaciones de frecuencia en agua pura. Se ha aprendido que movimientos vibratorios del agua se acoplan fuertemente a libraciones (dificultar rotaciones) y flujos de energía desde las vibraciones a grados de libertad traslacionales, rotaciones dificultadas y velocidades moleculares en un lapso increíblemente rápido, de 100 femtosegundos. La comprensión clave fue que esta relajación rápida va hacia los movimientos muy iguales implicados en ablación en un lapso de 100 femtosegundos. El acoplamiento de energía lumínica a movimiento traslacional es más rápido en agua que en cualquier otro material.

Por consiguiente, en una primera realización de la invención, se proporciona un método de preparación de muestra en el que se desorbe un analito de una muestra. De manera única, la presente realización desorbe el analito usando un proceso de desorción ablativa blanda que genera analito en fase gaseosa que está sustancialmente no fragmentado y no cargado a partir de una muestra sólida o líquida. Como se tratará en detalle más adelante, el método de desorción según realizaciones de la presente invención difiere de métodos de la técnica anterior por varias distinciones fundamentales.

El analito se desorbe de la muestra mediante un proceso de ablación blanda en la que se dirige un haz óptico sobre la muestra, donde el haz óptico es absorbido por la muestra, provocando la excitación vibratoria directa de un componente de la muestra. Esto se logra al seleccionar el contenido espectral del haz óptico para que se solape con una o más absorción vibratoria del componente dentro de la muestra. El componente de la muestra está presente preferiblemente en una concentración suficientemente alta como para provocar absorción vibratoria fuerte dentro de una zona irradiada local.

A diferencia de métodos de la técnica anterior, el haz óptico es dirigido sobre la muestra durante un intervalo de tiempo que es menor que la duración de tiempo en la que se pierde energía más allá de la zona irradiada para difusión térmica y expansión acústica. Además, el haz óptico se provee de suficiente intensidad como para provocar que el componente de la muestra se supercaliente y para acoplar rápidamente la energía vibratoria absorbida hasta movimiento traslacional antes de que se pueda perder energía fuera de la zona irradiada. El componente supercalentado conduce a la eyección de una estela de ablación desde la zona irradiada, y analito dentro de la zona irradiada es desorbido rápidamente hasta la fase gaseosa.

La ablación rápida del material de muestra dentro de la zona irradiada tiene el beneficio importante de conducir el analito hasta la fase gaseosa en un estado sustancialmente no fragmentado, en el que su estado de carga eléctrica nativa se preserva en gran medida. Además, la rapidez de la etapa de ablación produce analito en fase gaseosa antes de que haya transcurrido suficiente tiempo para que el componente produzca calentamiento y excitación del analito, proporcionando de ese modo analito desorbido con energía muy baja.

Preferiblemente, el haz óptico es proporcionado por un láser o láser amplificado que entrega un impulso óptico intenso a la muestra. Como la mayoría de las bandas vibratorias absorben potencia óptica en el espectro de infrarrojos, la fuente óptica es preferiblemente una fuente de infrarrojos sintonizada a la absorción vibratoria del uno o más componentes dentro de la muestra.

En el caso específico y no limitativo en el que el componente absorbente de la muestra es agua, el haz óptico se usa para producir moléculas de agua supercalentadas por encima de la transición de fase gaseosa que a su vez sirve como propelente para conducir moléculas dentro del ambiente acuoso de la muestra hasta la fase gaseosa intacta o el estado cargado original para iones moleculares. El mecanismo de desorción ablativa blanda se emplea preferiblemente usando impulsos láser de infrarrojos en el intervalo de 100 femtosegundos a 1 nanosegundo, en cuyo caso el proceso de desorción ablativa ocurre más rápido que la transferencia de energía sustancial o completa puede ocurrir desde las moléculas de agua calientes a los biomarcadores de interés para minimizar lo máximo posible la fragmentación térmica.

El mecanismo y los conceptos básicos subyacentes a esta realización se representan en las figuras 1 a 3. Las figuras 1(a), 1(b) y 1(c) muestran los rasgos generales de la primera realización, en la que moléculas de analito se desorben a la fase gaseosa a través de ablación blanda. Esta figura ilustra el proceso general de desorción ablativa blanda, en el que una estela bien definida de moléculas gaseosas se genera por relajación ultrarrápida de energía vibratoria hasta grados de libertad traslacionales que siguen excitación vibratoria directa con un haz de fuente óptica.

Específicamente, la figura 1(a) muestra el espectro de agua como objetivo de molécula ejemplar incluso no limitativo para deposición de energía selectiva hasta excitaciones vibratorias. Esta figura identifica claramente las bandas vibratorias clave que se pueden excitar directamente por medio de una fuente óptica de infrarrojos, tal como un láser de infrarrojos o sistema láser amplificado de infrarrojos. Los lapsos para conversión de la energía localizada inicialmente en vibraciones moleculares a movimientos traslacionales necesarios para ablación se muestran en la figura 1(b) para el caso de agua. La relajación es a escala de femtosegundos, que ilustra que la temperatura de agua puede ser conducida muy por encima de la temperatura de transición de fase y el punto de estabilidad, permitiendo al agua actuar como propelente para desorber analito en el agua hasta la fase gaseosa. Particularmente, debido al lapso extremadamente rápido en el que la energía depositada se convierte directamente a energía traslacional del componente de muestra que actúa como propelente (es decir, agua), el proceso de desorción es más rápido que el lapso en el que puede ocurrir intercambio de energía entre las moléculas de agua traslacionalmente calientes y el analito desorbido (por ejemplo, proteínas).

Este proceso se ilustra en la figura 1(c), donde un haz óptico 100 sintonizado a una banda de absorción vibratoria del agua es incidente en la muestra 110 y absorbido por el agua dentro de una zona irradiada local 120 (típicamente del orden de 1 micrómetro para muestras que tienen una gran concentración de agua). En caso de agua, el haz óptico se sintoniza preferiblemente para excitar ya sea vibraciones de tramo de OH en el intervalo  $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$  (longitudes de onda de aproximadamente 3 micrómetros), modos de combinación de OH en el intervalo de  $1500\text{ cm}^{-1}$  a  $17000\text{ cm}^{-1}$  (longitudes de onda de 6 micrómetros) u otras combinaciones de bandas vibratorias intramoleculares e intermoleculares. El haz óptico se proporciona durante un intervalo de tiempo que es menor que la duración de tiempo en la que se pierde energía más allá de la zona irradiada para difusión térmica y expansión acústica - por ejemplo, menos de 1 ns para el caso de agua. Durante ese intervalo de tiempo, se entrega suficiente energía (por ejemplo, en caso de agua, 100 microjulios o más) para provocar que el agua dentro de la zona irradiada sea supercalentada. Esto a su vez lleva a la ablación de la muestra dentro de la zona irradiada, produciendo una estela de ablación en fase gaseosa 130 que incluye agua 140 y analito 150 que estaba presente en la zona de irradiación. Preferiblemente, el analito desorbido es medido entonces en un método analítico tal como espectrometría de masas, preferiblemente usando fotoionización, como se trata adicionalmente más adelante.

Si bien la figura muestra proteína como analito desorbido 150, se tiene que entender que una amplia variedad de moléculas se pueden desorber según realizaciones de la presente invención, incluidas, pero sin limitación a estas, moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, proteínas grandes y pequeñas y moléculas no biológicas tales como orgánicas e inorgánicas, y cualesquiera especies moleculares y/o agrupaciones atómicas.

Aquí es importante observar que las vibraciones son altamente específicas para una molécula particular. Al explotar explícitamente esta propiedad, una fuente óptica tal como un láser de infrarrojos ultrarrápido se puede sintonizar en longitud de onda para excitar selectivamente un componente particular (por ejemplo, una molécula específica tal como agua) dentro de la muestra que se va a someter a ablación. La trayectoria de relajación de energía para agua se muestra como caso ejemplar no limitativo.

Como se señala anteriormente, para producir desorción ablativa blanda, la cantidad de energía depositada en la zona de irradiación es suficiente para supercalentar el componente absorbente (por ejemplo, esto se puede lograr al

conducir la temperatura de retícula aproximadamente 1,5 veces más alta que la temperatura de la transición de fase gaseosa para el componente para asegurar que la transición de fase ocurre dentro del límite de impulso).

5 Siempre que el haz óptico sea incidente en la muestra, una duración de tiempo que sea más corta en duración que el tiempo para expansión de material sobre el elemento de volumen excitado, la energía depositada térmicamente irá a conducir el proceso de ablación blanda. La dinámica de la consiguiente transición de fase para materiales supercalentados ocurre en lapsos de picosegundos, es decir, más rápida que la velocidad de expansión térmica limitada por sonido. De esta manera, los gradientes térmicos son en gran medida normales a la superficie y una columna relativamente bien definida de especies moleculares se introducen a la fase gaseosa. Como se trata más adelante, este mecanismo de introducir moléculas a la fase gaseosa se puede usar como etapa de preparación de 10 muestras para cualquier mecanismo convencional para generar iones para detección molecular con espectrometría de masas (tal como descarga en corona o electrospray) a fin de mejorar la sensibilidad mientras simultáneamente se proporciona resolución espacial.

15 La figura 2(a) muestra las propiedades temporales de una realización preferida en la que el haz óptico comprende un impulso óptico (tal como un impulso de láser de infrarrojos) para desorción ablativa blanda. La inserción de figura 155 muestra características temporales del impulso, por lo que la duración de impulso es menor que el tiempo para expansión térmica del elemento de volumen excitado. El haz óptico incidente es absorbido en una profundidad de alcance de absorción 160 que define una zona irradiada 165, sobre la que la mayoría de la potencia óptica es absorbida (un pequeño porcentaje de potencia es absorbido además en la muestra con la zona secundaria 170).

20 En la figura 2(b), se muestra un proceso en el que un elemento de volumen excitado 175 se expande en el límite de velocidad del sonido. Este proceso de expansión acústica reduce las tensiones de material, y reduce la fuerza disponible para impulsar el proceso de ablación.

25 Por lo tanto, en una realización preferida, el haz óptico comprende un impulso que tiene una duración menor que el tiempo que tarda para expansión de material, e idealmente debe ser más corto que el tiempo que tarda para intercambio de energía entre el componente absorbente supercalentado y el analito que se va a desorber. En una realización preferida, la profundidad de absorción será del orden de un micrómetro, de manera que los impulsos deben ser menos de aproximadamente 1 ns en duración en muestras biológicas que comprenden una gran concentración de agua. Preferiblemente, los impulsos deben ser suficientemente largos como para mantener la potencia pico del campo eléctrico suficientemente pequeña como para evitar ionización multifotónica.

30 En una realización preferida en la que la energía depositada por el haz óptico supera el potencial de ligadura del componente (por ejemplo, el potencial de ligadura de una retícula) más de aproximadamente el 50%, todo el proceso de conducir moléculas a la fase gaseosa ocurre en lapsos de picosegundos. Eficazmente, el supercalentamiento del componente que conduce la desorción ablativa lleva a una transición de fase explosiva, ablativa, en un lapso de picosegundos. Como se señala anteriormente, este proceso de transición de fase se hace que ocurra más rápido que lo que puede la pérdida de energía para expansión térmica. En este escenario, el componente vibratoriamente 35 absorbente actúa eficazmente como propelente para impulsar cualesquiera moléculas contenidas dentro de la zona irradiada para ser inyectadas a la fase gaseosa intactas como especies neutras. El lapso para el proceso global es de manera que las moléculas de interés con respecto a detección entran a la fase gaseosa con la menor cantidad posible de exceso de energía.

40 La figura 3 muestra ejemplos de las características espaciales del haz de fuente. Un perfil de haz gaussiano 180 se muestra en la figura 3(a), donde una parte del haz 185 no entrega suficiente energía para sobrecalentar el componente de muestra que actúa como propelente. Este umbral se muestra mediante la línea discontinua 190. Este efecto resulta en calentamiento innecesario de la muestra en los cantos de la zona irradiada, donde el componente de muestra no alcanzar una temperatura suficientemente alta como para soportar desorción ablativa. Como resultado, la estela sometida a ablación 195 no es eyectada como haz molecular colimado y puede ocurrir daño colateral de la muestra.

45 Por consiguiente, como se muestra en la figura 3(b), para el láser se prefiere un perfil superior plano 200 sobre un haz de láser gaussiano normal para evitar daño colateral debido a calentamiento de material adyacente que no alcanza la temperatura de ablación (indicada por línea de trazos) y para mantener las fuerzas térmicamente derivadas sustancialmente normales a la superficie para generar un haz molecular 205 tan colimado como sea posible. El presente método por lo tanto implica dirigir un haz óptico incidente (preferiblemente un impulso corto de infrarrojos) 50 sintonizado a resonancias vibratorias de 1 fotón para depositar energía a la zona irradiada como calor (movimientos traslacional/rotacional) en un lapso que es más rápido que en el que difusión térmica o expansión acústica puede transitar energía fuera de la zona irradiada. Este nuevo mecanismo resuelve el problema de desorber moléculas grandes hasta la fase gaseosa sin fragmentación y las presenta como objetivos perfectos para fotoionización cuantitativa, como se trata más adelante.

55 Como se señala anteriormente, al proporcionar un haz óptico (preferiblemente un impulso de láser) más corto que el tiempo para expansión térmica del volumen excitado, no hay pérdida de energía sustancial para expansión y la energía es convertida más eficientemente a movimiento traslacional y perturbación de las fuerzas que refrenan las moléculas en la fase condensada. La profundidad de absorción de la energía lumínica de infrarrojos absorbida en modos vibratorios de agua de muestras biológicas es típicamente menos de 1 micrómetro en profundidad (1/e) debido a la

fuerte absorción del agua líquida. Para velocidades de sonido típicas para tejido biológico y agua, el tiempo para la expansión térmica de un volumen excitado de un micrómetro de grueso es del orden de 1 ns. La velocidad del sonido en agua, como límite inferior, es de  $1,5 \times 10^5$  cm/s de modo que el tiempo para la expansión térmica de una región calentada de 1 micrómetro de grueso es de  $1 \times 10^{-4}$  cm/ $1,5 \times 10^5$  cm/s =  $0,7 \times 10^{-9}$  sec. En una realización preferida de la invención, según el componente que actúa como propelente ablativo es agua, el haz óptico se sintoniza a una banda de absorción vibratoria de agua en los infrarrojos (por ejemplo, a una longitud de onda de  $3400 \text{ cm}^{-1}$ ), y un impulso que tiene una energía de aproximadamente 100 microjulios y un ancho de impulso entre aproximadamente 100 fs y 1 ns se enfoca a un tamaño de punto del orden de 100 micrómetros (por ejemplo, el diámetro promedio del haz óptico en la muestra es preferiblemente de aproximadamente 50-200 micrómetros).

Así, usando impulsos de duración de menos de 1 nanosegundo (ns), y preferiblemente menos de 100 picosegundos (ps), es posible provocar que se supercaliente el agua, y transferir energía a energía de traslación, con suficiente amplitud para vencer el potencial de enlace del material. Si bien anteriormente unos ejemplos han descrito el uso de impulsos ópticos para la entrega de la energía de haz óptico, se tiene que entender que la naturaleza temporal del haz óptico puede adoptar un gran variedad de formas, siempre que se respete el criterio de duración de tiempo global. En una realización preferida, el haz óptico es un único impulso gaussiano emitido por un láser o amplificador de láser. Sin embargo, en otras realizaciones, por ejemplo, el haz óptico puede ser entregado como serie de picos de intensidad de complejidad arbitraria.

El método de desorción ablativa se ilustra además en la figura 4 para el caso de agua y para muestras en las que el analito reside en forma de complejos débilmente ligados 210. Específicamente, la figura 4(a) ilustra sintonización de longitud de onda para ablación molecularmente selectiva, en la que modos de estiramiento vibratorio del agua dentro de la muestra son excitados directamente por un haz óptico incidente 215 que se sintoniza espectralmente a la absorción vibratoria de infrarrojos del agua en  $\lambda \sim 3400 \text{ cm}^{-1}$ . Esto resulta en ablación "fría" de la muestra dentro de la zona irradiada, y desorción ablativa de analito 215 en la muestra como complejos intactos 220. Como se ha señalado anteriormente, las moléculas de agua altamente energizadas actúan como propelente para impulsar moléculas biológicas incluso grandes hasta la fase gaseosa intactas más rápido que el intercambio de energía entre las moléculas de agua caliente y proteínas/biomoléculas. Incluso complejos grandes se pueden introducir a la fase gaseosa de esta manera ya que se transfiere mínima energía térmica a los complejos que de otro modo llevaría a disociación de los complejos.

La figura 4(b) muestra un proceso de desorción ablativa "templada" para la desorción y disociación combinadas de complejos moleculares. Esta figura muestra esquemáticamente sintonización de la longitud de onda de un haz óptico adicional 230 (por ejemplo, la longitud de onda de un láser pulsado de infrarrojos adicional) para excitar específicamente proteínas que se sabe o se espera que residen dentro de la muestra. Por ejemplo, los complejos pueden ser complejos proteicos que se pueden disociar al romper la cohesión de amida como se muestra en la inserción 225, y la longitud de onda del haz óptico adicional puede ser de  $1600 \text{ cm}^{-1}$  (más preferiblemente, se rompe un enlace no covalente para evitar fragmentación al seleccionar una frecuencia en resonancia con la interfaz). Este proceso se realiza preferiblemente en combinación con el método de desorción ablativa descrito anteriormente, dando como resultado la desorción y disociación de complejos moleculares (mostrado como disociación en 235) dentro de la muestra, produciendo de ese modo moléculas de analito disociadas 240 en la estela de ablación. Este mecanismo de excitación deposita energía en el objetivo de complejo molecular, provocándole que se disocie en sus componentes moleculares individuales. En una realización relacionada, usando un proceso de ablación fría, seguido por un proceso separado de ablación templada en muestras idénticamente preparadas, se pueden identificar de manera única complejos moleculares.

Por consiguiente, en una realización de la invención, se proporciona uno o más impulsos ópticos adicionales sintonizados a otros modos vibratorios de un complejo molecular dentro de la muestra, donde el complejo molecular comprende un analito de interés. Esto permite añadir energía al complejo selectivamente para proporcionar suficiente energía para desenredar analito del complejo, por lo que se pueden desorber ablativamente moléculas de analito aisladas en un estado desenredado.

En ciertas realizaciones, la muestra puede comprender todas o una parte de las muestras biológicas, incluidas, pero sin limitación a estas, tejido, células, órganos, fluidos corporales, orina, sangre, suero, plasma, fluido espinal cerebral y esputo. En ciertas aplicaciones, es altamente deseable preparar una muestra directamente de una sustancia sólida o semisólida tal como tejido biológico. También hay aplicaciones en análisis separados espacialmente de sólidos y soluciones sólidas heterogéneas tales como muestras congeladas. Más preferiblemente, las muestras se rebanan de modo que el grosor de la muestra sea aproximadamente igual a la profundidad de absorción del haz óptico incidente. En un ejemplo no limitativo en el que la muestra son tejidos biológicos, el tejido se rebana preferiblemente delgado a grosores del orden de 1-10 micrómetros para evitar grandes estelas secundarias, que pueden provocar problemas cuando se acopla la estela ablativa a un dispositivo analítico tal como un espectrómetro de masas.

Rebanar tejidos en secciones delgadas de micrómetros es un procedimiento establecido usando ya sea congelación criogénica o cohesión en epoxi y usando un microtomo. El ejemplo más pequeño que se puede considerar es probablemente la disección de una única célula. En una realización preferida, se realiza desorción ablativa blanda directamente en células, y las células se preparan con un grosor del orden de 1 micrómetro, es decir, aproximadamente la profundidad de absorción de un haz óptico de infrarrojos sintonizado a una banda de absorción vibratoria de agua.

Ciertos materiales son demasiado frágiles para ser expuestos a las tensiones extremadamente altas generadas durante deposición de calor por impulsos. También hay ciertos sistemas moleculares que se agregarán durante la etapa de fotoionización o experimentarán reacciones no deseadas en la formación de iones. En tales casos, la densidad de la estela ópticamente impulsada se tiene que mantener en una menor densidad con liberación mucho más lenta de las moléculas a la fase gaseosa. Para conseguir esto, el haz óptico sintonizado para depositar selectivamente energía en el medio anfitrión se estira en el tiempo para mantener la temperatura de retícula justo en el punto de ebullición. Esto se puede conseguir mediante un impulso con un tiempo de subida rápido seguido por un perfil de impulso de cola que compensa la difusión térmica desde el volumen excitado. Las moléculas hervirán eficazmente en lapsos que van de nanosegundos a muchos microsegundos para mantener la densidad de moléculas en la fase gaseosa tan baja como sea posible.

Sin embargo, hay un compromiso. Las moléculas entran a la fase gaseosa a la misma temperatura que la retícula en lugar de una ablación "fría". En este caso el agua es el medio anfitrión preferido ya que el punto de ebullición relativamente bajo evita una excesiva fragmentación inducida térmicamente. Esta prescripción da la liberación más leve de las moléculas de interés a la fase gaseosa posible mientras todavía se explotan los elementos básicos de esta invención, multiplexación de impulsos IR y VUV o UV/Vis para mejorar la detección de las moléculas de interés por espectrometría de masas en varios ordenes de magnitud sobre los métodos actuales. Esta prescripción impide la fractura y reacciones no deseadas de fase gaseosa subsiguientes a la fotoionización al minimizar la frecuencia de colisión.

La figura 5 ilustra el proceso de desorción ablativa blanda con una muestra líquida y el efecto de la profundidad de muestra del proceso de ablación. En la figura 5(a), un haz óptico 300 es absorbido por la muestra 310 como se ha descrito anteriormente. El proceso de desorción ablativa blanda mencionado anteriormente, mostrado en la figura 5(b), conduce la muestra líquida a la fase gaseosa, produciendo una estela de ablación 330. Sin embargo, la muestra 310 es una muestra ópticamente gruesa, es decir, el grosor de muestra es mayor que la profundidad de absorción del haz óptico. Como resultado, se aplican fuerzas 370 a la muestra restante conforme se eyecta la estela de ablación. En la figura 5(c), se generan fuerzas de retroceso 375 conforme la estela de ablación 330 deja la muestra, y estas fuerzas generan retroceso de muestra como se muestra en la figura 5(d). El retroceso provoca que se forme una cúspide de líquido 380, lo que lleva a la generación y eyección de nano-gotitas 390 que siguen la estela de ablación 330.

Por lo tanto, con una duración suficientemente corta del haz óptico (por ejemplo, impulsos de láser de infrarrojos) aplicado de la manera prescrita anterior, el material es desorbido ablativamente con altas velocidades de manera que ocurren ondas de choque en el aire y propagación secundaria de la onda de choque al medio anfitrión. Este efecto secundario se minimiza preferiblemente a fin de evitar eyectar cantidades adicionales (y potencialmente significativas) de material junto con la estela de ablación, por ejemplo, en forma de gotitas, grandes agrupaciones u otros agregados. Tales agregados enmascaran potencialmente la identidad y/o la señal del analito desorbido de interés y pueden llevar a efectos no lineales que dificultan el análisis cuantitativo.

Por lo tanto es beneficioso evitar tales efectos preparando una muestra líquida en un dispositivo de muestreo en el que el grosor de la muestra sea del mismo orden que la profundidad de absorción del haz óptico. Esto permite un aumento de la eficiencia de sistemas de análisis sin necesidad de caracterizar la dinámica de la estela de ablación, así como reducir la cantidad de muestra requerida para el análisis. Esto es especialmente desafiante para muestras de agua, donde la profundidad de absorción de luz infrarroja por estados vibratorios se limita a únicamente unos pocos micrómetros, y donde las pérdidas debidas a evaporación pueden ser problemáticas.

La figura 6(a) ilustra una realización preferida de la invención en la que se prepara una muestra líquida en una película delgada de un grosor de aproximadamente igual a la profundidad de absorción del haz óptico 405. La muestra está contenida en una superficie 400 que preferiblemente es transparente al haz óptico para evitar daño potencial a la superficie por el haz óptico. La muestra forma una película delgada 410 y el haz óptico incidente en la muestra supercalienta el componente absorbente dentro de la muestra que actúa como propelente ablativo, produciendo un perfil de temperatura mostrado en 420, con temperaturas dentro de la zona irradiada de la muestra que superan un umbral de temperatura 430 para desorción ablativa. Esto lleva a que esencialmente el grosor completo de la muestra se somete a ablación, dando como resultado una estela de ablación 440 sustancialmente libre de retroceso y una quedada sometida a ablación 450 que se separa lateralmente sin sustancial retroceso.

Una realización preferida se muestra en la figura 6(b), donde el haz óptico 460 se dirige sobre la muestra desde detrás, donde se propaga a través de una superficie transparente 480 e impacta sobre la muestra en el punto de contacto entre la muestra y la superficie. La absorción del haz óptico por el componente dentro de la muestra que actúa como propelente genera un perfil de temperatura 480 que es el inverso del correspondiente perfil 420 mostrado en la figura 6(a). Como en la figura 6(a), la zona irradiada comprende sustancialmente el grosor completo de muestra, y el proceso de desorción ablativa ocurre sustancialmente sin retroceso.

En una realización preferida, la superficie sobre la que se soporta la capa delgada de la muestra es preferiblemente un material duro y más preferiblemente un material que no absorbe significativamente en la longitud de onda del haz óptico. Materiales ejemplares pero no limitativos incluyen SiO<sub>2</sub>, silicio, y zafiro. Un sustrato duro que tiene una temperatura de vaporización mucho más alta que el solvente sirve así como condición de frontera dura para el proceso de desorción ablativa de modo que cualesquiera ondas de choque generadas en el volumen excitado de muestra se

reflejan meramente en lugar de llevar a eyección de masa secundaria.

Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que la profundidad de absorción del haz óptico se puede determinar por una variedad de métodos; por ejemplo, midiendo la transmisión de luz a través de un grosor conocido de muestra en la frecuencia deseada, o midiendo un espectro de transmisión de la muestra usando un instrumento analítico tal como un espectrómetro.

Por lo tanto, en una realización preferida, se prepara una muestra líquida para desorción ablativa blanda en un micropocillo que tiene un grosor del orden de la profundidad de absorción del haz óptico dentro de la muestra, donde el material en el que se forma el micropocillo es preferiblemente un material duro y más preferiblemente un material que no absorbe significativamente en la longitud de onda del haz óptico. Este tipo de método de preparación de muestras es muy idóneo para subsiguiente análisis del analito desorbido por espectrometría de masas, como se trata adicionalmente más adelante.

Un dispositivo de muestreo preferido se describe en la solicitud de patente provisional de EE.UU. en tramitación con la presente n.º de serie 61/300.623, titulada "Fluidic Sampling Device and Method of Use Thereof", presentada el 2 de febrero de 2010, que se incorpora en esta memoria en su totalidad. Brevemente, el dispositivo de muestreo comprende una superficie plana que tiene un pocillo definido en la misma, en la que la hidrofiliidad de la superficie es mayor que la hidrofiliidad de la pared lateral de pocillo, de manera que la estructura de pocillo puede ser humedecida selectivamente por líquido en la superficie cuando el líquido es contactado por la parte superior del pocillo. Esta realización preferida permite el humedecimiento controlado y la captura de líquido en pocillos que tienen un amplio intervalo de relaciones de aspecto (de anchura a profundidad), por ejemplo, que superan un centenar. La profundidad de pocillo está preferiblemente en la escala de micrómetros para producir muestras líquidas estables pero delgadas, tan deseables para uso conjuntamente con las realizaciones anteriores de la presente invención que implican métodos de desorción ablativa blanda. El dispositivo preferiblemente comprende una distribución de tales pocillos para la preparación y subsiguiente análisis de una pluralidad de muestras líquidas.

La solicitud de patente provisional de EE.UU. n.º de serie 61/300.623 describe además un aparato para encerrar un dispositivo de muestreo de micropocillos, que es muy idóneo para diversos aspectos de la presente invención. El aparato, que se muestra en la figura 7, comprende preferiblemente una plataforma de soporte 500 en la que se coloca una plaquita fluidica 510 que tiene uno o más pocillos. La figura 7(a) proporciona una vista de detalle en la que se puede ver la plaquita fluidica. La plaquita fluidica puede ser cualquier plaquita fluidica que sea compatible con el método de desorción ablativa blanda descrito anteriormente. Además, los expertos en la técnica apreciarán que la plaquita podría alojar un único pocillo o una distribución de pocillos.

En la plataforma se incluye un depósito de saturación 520 que se proporciona para mantener la presión de vapor dentro del porta-plaquita cuando el portador está cerrado por la tapa 550. Este diseño proporciona un ambiente de saturación cuando los pocillos están encerrados dentro del porta-plaquita, evitando la evaporación y manteniendo un menisco estable dentro de los pocillos. El depósito se puede proporcionar en cualquier región interna dentro del porta-plaquita, y como alternativa puede ser integrado dentro de la propia plaquita para uso dentro del porta-plaquita. El depósito puede ser rellenado con cualquier líquido que pueda mantener una presión de vapor apropiada dentro del alojamiento. Preferiblemente, el depósito se rellena con un líquido que es sustancialmente el mismo que el líquido que contiene partículas. En varios ejemplos no limitativos, el líquido proporcionado al depósito puede ser un líquido de muestra, un tampón, o una sobrenadante de muestra.

El porta-plaquita es cubierto por una tapa deslizante 550, que incluye un agujero 560 para permitir acceso a la plaquita. La tapa 560 tiene suficiente área en sección transversal para mantener la cobertura de todos los otros pocillos dentro de la plaquita cuando la tapa se traslada respecto a la plaquita fluidica. Si bien la realización mostrada en la figura 7 ilustra un porta-plaquita con una distribución bidimensional de los pocillos, a los que se accedería trasladando la tapa 550 en un plano bidimensional respecto a la plaquita fluidica 510, la plaquita fluidica puede comprender una distribución lineal de uno o más pocillos a los que se accede trasladando la tapa 550 en una dimensión.

En una realización preferida, el agujero 550 es suficientemente grande como para entregar fluido para llenar un único pocillo. Se puede entregar fluido al pocillo usando una variedad de medios conocidos en la técnica, tales como pipeteo directo, o dispensación usando un sistema automatizado tal como una bomba de jeringa. Sin embargo, en una realización preferida, un pocillo que reside en la plaquita puede ser humedecido por contacto con una gotita de fluido con la superficie de plaquita, y trasladando la gotita respecto a la plaquita de modo que contacte en la parte superior de un pocillo y rellene el pocillo según un proceso de humedecimiento dinámico. En una realización más preferida, el pocillo relleno dinámicamente se proporciona según las realizaciones de la solicitud de patente provisional de EE.UU. n.º de serie 61/300.623, donde la superficie superior de plaquita tiene una hidrofiliidad que supera la de la pared lateral de pocillo.

Los pocillos pueden ser humedecidos dinámicamente al trasladar una gotita a lo largo de la superficie superior de plaquita, por ejemplo, al trasladar una o ambas de la plaquita y la fuente fluidica. En una realización no limitativa, un pocillo humedecible dinámicamente se rellena al trasladar el agujero adyacente a un pocillo, exponiendo el pocillo y una parte de la superficie superior en las inmediaciones del pocillo, contactando al menos una parte de una gotita fluidica con la superficie superior, y trasladando la gotita respecto a la superficie superior para contactar en la parte

superior del pocillo. El contacto de la gotita con la parte superior del pocillo trasfiere al menos una parte del volumen de gotita al pocillo. La traslación de la tapa, la plaquita y/o el dispositivo de dispensación se puede lograr usando fases de traslación motorizada y dispositivos conocidos en la técnica, tales como fases de traslación lineal conducidas por motores lineales.

- 5 En una realización preferida, la gotita es una gotita parcial formada en un agujero de un dispositivo de dispensación fluidica, tales como un hemisferio, que puede recibir el contacto de la superficie superior y retirarse de la superficie superior tras rellenar un pocillo sin humedecer la superficie superior. Esto se puede lograr al seleccionar un dispositivo de dispensación fluidica que soporta adhesión de gotita respecto a la superficie superior, tal como una punta de pipeta estándar.
- 10 Después de haber rellenado un único pocillo, se pueden rellenar pocillos adicionales con el fluido residual dentro de la gotita al trasladar la plaquita respecto a ambos del agujero 560 y el dispositivo de dispensación fluidica, moviendo de ese modo la gotita a lo largo de la superficie superior de plaquita. Posteriormente se puede rellenar un pocillo adicional haciendo contactar la gotita con la parte superior del pocillo adicional y rellenando dinámicamente el pocillo adicional.
- 15 En una realización preferida, el dispositivo fluidico puede comprender un capilar rellenado con un fluido que va a ser dispensado en uno o más pocillos, como se escribe en la solicitud de patente provisional de EE.UU. n.º de serie 61/300.623. Por ejemplo, en una realización no limitativa, el capilar puede formar un componente de un sistema de separación tal como un sistema de electroforesis capilar, donde la dispensación en serie del líquido a una distribución de pocillos permite un mapeo de componentes separados dentro del capilar a una distribución de pocillos. Con un caudal conocido de la dispensación al pocillos, mediciones de un pocillo dado se pueden correlacionar con un segmento separado longitudinalmente del capilar. En otra realización no limitativa, el capilar puede residir dentro del dispositivo de muestreo tal como un dispositivo de muestreo de sangre por pinchazo en dedo, y la dispensación de sangre dentro del capilar a la distribución de pocillos se puede usar para generar una distribución espacial precisa de alícuotas para subsiguiente análisis. El capilar puede comprender una gran variedad de capilares conocidos en la técnica, tales como capilar de sílice fundido.
- 20
- 25

Un pocillo que reside en una plaquita puede ser rellenado desde el capilar de la siguiente manera. Al capilar se aplica un gradiente de presión y al menos una gotita parcial se pone en contacto con la superficie superior de plaquita. Como se ha descrito anteriormente, un pocillo puede entonces ser rellenado dinámicamente al trasladar la gotita a lo largo de la superficie superior hasta que contacta en la parte superior de un pocillo. Preferiblemente, múltiples pocillos en una distribución de pocillos se rellenan según el método mencionado anteriormente por lo que la plaquita se traslada posteriormente respecto a ambos del agujero y el capilar, permitiendo que la gotita sea trasladada y contacte con pocillos adicionales. Como se señala anteriormente, esto permite el reparto proporcional de líquido en un capilar en una distribución bidimensional de pocillos.

30

- 35 En otra realización preferida, una plaquita rellena y alojada dentro de un porta-plaquita puede ser almacenada y/o procesada (por ejemplo, congelada o incubada térmicamente) y antes de una etapa de desorción ablativa blanda. La subsiguiente etapa desortiva ablativa blanda (y cualesquiera etapas analíticas adicionales) se logra preferiblemente al proporcionar acceso a pocillos prerrellenados pocillo por pocillo por medio de la traslación de la tapa 550, donde el agujero 560 puede ser trasladado selectivamente para proporcionar acceso a un único pocillo.

- 40 En realizaciones mencionadas anteriormente de la invención, se han proporcionado métodos para la desorción ablativa de un analito dentro de una muestra. Sin embargo, puede surgir el caso en el que se desee medir un sistema de interés que tiene una composición desconocida, y posiblemente una composición heterogénea. Para tales sistemas, puede ser ciertamente la composición subyacente de material que es de interés. Por ejemplo, este puede ser el caso para la exploración/caracterización de un nuevo tipo de tejido. En este tipo de caso, se pueden enredar biomarcadores de interés dentro de complejos proteicos, y pueden ser arrastrados en las diversas membranas y rasgos semejantes a gel de cualesquiera componentes celulares entremezclados durante el proceso de desorción ablativa blanda. Los complejos tienen que ser separados en sus componentes moleculares constitutivos. En ciertos casos, la molécula de interés experimenta reacciones químicas no deseables en el proceso de usar desnaturantes. También hay muchos casos cuando se desea usar tejido sólido y analizar estados de enfermedad en ubicaciones específicas en el tejido.
- 45

- 50 Para lograr esta separación, el proceso de desorción ablativa blanda descrito anteriormente se puede emplear en un proceso ablativo en dos etapas para lograr separación de componentes moleculares constituyentes. Este planteamiento evita etapas de purificación que consumen mucho tiempo, y a menudo derrochadoras, que requieren grandes cantidades de material. Puede ser necesaria una segunda etapa ablativa para aplicaciones seleccionadas, en particular en investigación proteómica y muestreo directo de tejido distintos a fluidos corporales.

- 55 Por consiguiente, en una realización preferida, una primera etapa ablativa blanda se realiza según una realización mencionada anteriormente de la invención. Sin embargo, en la desorción a la fase gaseosa, la estela de ablación eyectada puede comprender arrastre de complejos que requieren separación adicional. Para capturar esta estela de ablación para procesamiento adicional, un sustrato previamente preparado se coloca en el camino de la estela eyectada, provocando que la estela sea depositada sobre los sustratos preparados.

En una realización preferida, el sustrato preparado comprende uno o más pocillos que tienen en los mismos una sustancia para la separación de un analito de un complejo desorbido. En una realización no limitativa, la sustancia puede comprender uno o más agentes desnaturantes (por ejemplo, metanol o agentes tensioactivos) que ayudan en el desbobinado y disociación de complejos proteicos. Tras un tiempo de incubación predeterminado para la disociación del complejo capturado, un segundo proceso de desorción ablativa blanda se realiza en el analito disociado, entregando así el analito disociado a la fase gaseosa. Por consiguiente, se pueden introducir biomarcadores totalmente "desnudos" a la fase gaseosa intacta usando este tipo de realización.

Una realización preferida se ilustra en la figura 8(a), donde se usa una etapa inicial de desorción ablativa blanda para propulsar los complejos moleculares 600 intactos sin fragmentación sobre un objetivo secundario 505 (es decir, el sustrato preparado). La muestra puede ser en cualquier forma inicial compatible con el método de desorción ablativa blanda descrito anteriormente, por ejemplo, la muestra puede ser un sólido, líquido o semisólido. Como se ha descrito anteriormente, se logra desorción ablativa blanda usando un primer haz óptico 515, preferiblemente proporcionado como impulso 520, que se sintoniza para excitar vibratoriamente un componente dentro de la muestra 525. La muestra se proporciona preferiblemente sobre un sustrato 530 transparente al primer haz óptico para permitir el posicionamiento del sustrato preparado 505 cerca de la muestra. En este ejemplo, el sustrato preparado se muestra como dispositivo de muestreo que comprende uno o más pocillos, cada pocillo contiene un líquido 510 que comprende un agente desnaturante que disocia el complejo. El dispositivo de muestreo comprende preferiblemente un dispositivo como el descrito en la solicitud de patente provisional de EE.UU. en tramitación con la presente n.º de serie 61/300.623, y más preferiblemente se proporciona dentro del aparato de alojamiento descrito dentro del mismo. Un dispositivo de muestreo multipocillo es preferiblemente tal que soporta muestreo rápido y opcionalmente proporciona captura separada espacialmente de los complejos. Como tal, el mecanismo inicial de desorción ablativa blanda lleva a desintegración de retícula con todas sus moléculas constituyentes propulsados a la fase gaseosa intacta. Esta primera etapa libera las moléculas de la matriz y permite que sean expuestas a nuevas condiciones, lejos del equilibrio, que llevan a disociación de complejos.

En la figura 8(b), el sustrato preparado, que contiene ahora los complejos desorbidos y disociados, proporciona un dispositivo de muestreo en el que moléculas de analito se pueden desorber según realizaciones mencionadas anteriormente de la invención. Un segundo haz óptico se dirige sobre un pocillo 540 del sustrato preparado para desorber ablativamente el analito ahora disociado dentro del líquido 510 contenido en el pocillo. El líquido 510 comprende además un componente adecuado como propelente para absorción ablativa blanda - es decir, el componente se caracteriza por niveles vibratorios a los que el segundo haz óptico está sintonizado espectralmente (el componente es preferiblemente agua). El proceso de desorción ablativa produce así analito disociado 545. Posteriormente, otros pocillos se pueden procesar simplemente por la traslación relativa del sustrato preparado respecto al segundo haz óptico 535.

Así, en una realización preferida de la presente invención, biomoléculas altamente asociadas, o matriz celular (membrana, retículo endoplásmico) se puede separar en sus constituyentes moleculares usando un proceso de desorción ablativa en dos etapas, para aplicaciones en biodiagnóstico de fluidos corporales extraídos. En este procedimiento para biodiagnóstico, la muestra de fluidos corporales puede contener especies moleculares en complejos con múltiples equilibrios. Marcadores moleculares clave para estados de enfermedad se tienen que aislar de complejos que de otro modo ocultarían su identidad. Si la muestra es compatible con exposición directa a un desnaturante, entonces puede ser preparada inicialmente al disolverla en un desnaturante y dispersarla un sustrato de soporte, como el descrito en las realizaciones anteriores que implican una única etapa de desorción ablativa.

Sin embargo, hay varios ejemplos importantes tales como tejido óseo, tejido blando y componentes intracelulares en la sangre, por nombrar algunos, que requieren diferentes secuencias de impulsos pero todavía están dentro de las realizaciones anteriores de la invención, es decir una única desorción ablativa blanda. Tales marcadores moleculares incrustados en estas matrices (tejido/células) son los casos más difíciles de manejar. En tales casos, el proceso en dos etapas mostrado en la figura 8 se prefiere para inyectar el biomarcador a la fase gaseosa con fragmentación mínima, seguido por captura por parte de un medio secundario que ayuda a desenredar complejos.

En una realización preferida de la invención, la realización anterior se adapta para proporcionar capacidad de resolución espacial. Por ejemplo, si los pocillos de la figura 8 tienen un diámetro en escala de submicrómetros, el método se puede usar para producir analito desorbido separado espacialmente dentro de una única célula. Esta aplicación es importante para la proteómica desde el punto de vista de entender redes de genes y diferenciación celular, particularmente pertinentes para entender estados cancerosos.

La figura 9(a) muestra una realización preferida en la que el método en dos etapas mencionado anteriormente de desorción ablativa se emplea para hacer un mapeo a nivel molecular de la célula, que se puede usar para analizar y entender expresión genética y regulación.

En una realización, se puede usar una óptica de campo cercano para desorber selectivamente partes de una sección de una célula sobre un sustrato preparado en la primera etapa del proceso. Sin embargo, como se ilustra en la figura 9(a), el primer haz óptico proporcionado para la primera etapa del proceso en dos etapas no tiene que estar enfocado. La célula entera puede ser excitada uniformemente para realizar ablación de moléculas a la fase gaseosa.

Por consiguiente, en una realización preferida mostrada en la figura 9(a), el sustrato preparado 555 comprende una distribución espacial de los pocillos 560. El diámetro de pocillo 565 es preferiblemente de escala de nanómetro para el mapeo desortivo separado espacialmente de las muestras tal como, pero sin limitación, muestras biológicas y otras muestras que tienen heterogeneidad en escala de micrómetros o submicrómetros. Durante la etapa inicial de desorción ablativa, una muestra delgada, tal como una célula pequeña o una sección delgada de una célula u otro tejido 570, se soporta en un sustrato 575 transparente al primer haz óptico 580. En la realización preferida pero no limitativa mostrada en la figura 9, el primer haz óptico irradia la distribución de pocillos en paralelo, desorbiendo así la muestra para la captura simultánea y separada espacialmente dentro de los pocillos 560.

Este procedimiento es similar al proceso de ablación en dos etapas mostrado en la figura 8, pero con la distinción de usar pocillos de diámetro más pequeño 560 y alineamiento espacial de los pocillos con respecto a las coordenadas de la muestra (por ejemplo, una célula o sección de tejido). Por ejemplo, la figura 9(b) proporciona una ilustración que superpone las posiciones espaciales de una distribución de pocillos 585 en una única célula 590. El diámetro de los pocillos se puede hacer tan pequeño como de 10 nm usando métodos actuales de nanofabricación. Cuanto más pequeño es el tamaño de pocillo, menos proteínas y biomoléculas diferentes habrá contenidas dentro de cualquier pocillo dado. Los pocillos contienen preferiblemente un desnaturante y/o gel para separar moléculas sobre la base de movilidad diferencial.

Como se muestra en la figura 9(c), posteriormente se realiza una segunda etapa de desorción ablativa blanda para desorber el analito disociado. Sin embargo, a fin de lograr resolución espacial en un único pocillo, el segundo haz óptico irradia cada pocillo por separado. Con diámetros y espaciamientos de pocillos submicrómetros como se ha descrito anteriormente, esto se logra preferiblemente usando una óptica de campo cercano 595. El analito desorbido 600 puede ser medido entonces en un método analítico tal como espectrometría de masas, preferiblemente usando fotoionización, como se trata adicionalmente más adelante. La detección cuantitativa, ultrasensitiva, permitida por fotoionización usando fotoionización VUV de umbral de 1 fotón o fotoionización resonante UV/Visible multifotónica proporciona la lectura molecular como función de la posición de pocillo que a su vez se puede mapear sobre la posición espacial dentro de la célula. De esta manera, se puede hacer un mapeo entero a nivel molecular de las funciones celulares y expresión con resolución espacial 10-100 nm.

Realizaciones de la invención descritas anteriormente proporcionan métodos para la desorción blanda de analito de un gran variedad de muestras, donde el analito se desorbe a una fase gaseosa en forma de estela de ablación eyectada de la muestra siguiendo la irradiación óptica. Como se señala anteriormente, el único método de desorción de las realizaciones anteriores produce analito desorbido que está sustancialmente no fragmentado, tiene energía muy baja respecto al componente caliente que actúa como propelente ablativo, y es desorbido sustancialmente en su estado cargado nativo sin ionización adicional. Estos rasgos permanecen en contraste riguroso con todos los métodos de la técnica anterior de desorción y preparación de muestras.

Como se señala anteriormente, el analito desorbido blando presente en la estela de ablación producida según una cualquiera o una combinación de las realizaciones anteriores, puede ser analizado además por uno de muchos métodos que pueden sondear especies en fase gaseosa, incluidas, pero sin limitación a estas, espectrometría de masas, creación de haces moleculares supersónicos, difracción ultrarrápida de electrones, cualesquiera métodos espectroscópicos de fase gaseosa. Cuando se acopla con espectrometría de masas, el método de desorción ablativa blanda permite la detección sensible de biomarcadores y otros analitos. El método ablativo blando permite análisis cuantitativo de la composición de material conforme las moléculas entran a la fase gaseosa intacta sin experimentar fragmentación.

Por lo tanto, una realización preferida de la invención, como se ilustra en la diagrama de flujo mostrado en la figura 10, proporciona un método para detectar un analito por análisis de masas. La muestra se prepara primero para desorción ablativa blanda en la etapa 605, preferiblemente al proporcionar una muestra que tiene un grosor del orden de la profundidad de absorción del haz óptico irradiante. En la etapa 610, el analito se desorbe primero desde una muestra usando el método de desorción ablativa blanda descrito anteriormente. Posteriormente, en la etapa 620, la estela eyectada que contiene analito desorbido es ionizada. En la etapa 630, el analito ionizado se dirige a la entrada de un dispositivo de análisis de masas que preferiblemente comprende un espectrómetro de masas. Finalmente, en la etapa 640, el analito es detectado por análisis de masas.

Además de los criterios para desorción ablativa del analito, en una realización preferida de la invención, el haz óptico se entrega en un lapso suficientemente corto para permitir que ocurra el proceso de desorción ablativa en lapsos más rápidos que incluso la transferencia de energía desde el componente caliente que actúa como propelente para el analito desorbido. En muchos métodos de análisis, incluida espectrometría de masas, es importante tener moléculas que entren a la fase gaseosa con tan poco exceso de energía como sea posible para impedir excesiva fragmentación y pérdida de identidad en el proceso de detección a través de múltiples trayectorias de fragmentación térmica. Por ejemplo, en caso de análisis de masas la fragmentación de muestras de proteína altamente purificada no es un problema, siempre que haya ion progenitor detectable, y se trate con una única especie molecular. El problema es realmente cuando se trata con mezclas, tales como análisis directo de fluidos corporales o tejidos, cuando patrones de fragmentación solapados enmascararán las identidades de las moléculas de interés. En la publicación de R. J. Dwayne Miller, "Vibrational-Energy Relaxation and Structural Dynamics of Heme-Proteins", Ann. Rev. Phys. Chem. 1991, 42, 581-614, el presente inventor fue el primero en caracterizar trayectorias de relajación de energía en

moléculas biológicas. Típicamente tarda varias decenas de picosegundos para disipar energía desde una molécula de proteína excitada a las moléculas de agua circundantes. El proceso es microscópicamente invertible a través de intercambio por colisión. Como tal, el trabajo revisado en esta referencia demuestra que tarda lapsos del orden de 10 a 100 picosegundos para transferir cantidades significativas de energía desde moléculas de agua altamente excitadas a una proteína.

El lapso mencionado anteriormente de 10 ps atañe a intercambiado de cantidades de energía relativamente pequeñas entre agua y la proteína. El lapso se vuelve significativamente más largo conforme aumenta la cantidad de exceso de energía implicada. Básicamente se requieren muchas más colisiones del agua para transferir energía a las biomoléculas. Cada colisión únicamente puede depositar aproximadamente  $10 \text{ cm}^{-1}$  de exceso de energía desde las moléculas de agua caliente a la proteína. Por lo que para las condiciones de supercalentamiento implicadas en ablación, el lapso para una transferencia significativa de energía desde el agua altamente excitada al objetivo de proteína u otras moléculas de interés puede tardar tiempos hasta 100 ps y más. Este lapso es más largo que el propio proceso de ablación, usando agua como propelente, de manera que las moléculas de interés se pueden introducir a la fase gaseosa tan frías como sea posible. De nuevo, este rasgo relativo con un aspecto de la invención es sumamente deseable ya que es preferible que las moléculas entren a la fase gaseosa con tan poco exceso de energía como sea posible para impedir excesiva fragmentación térmica para la identificación más exacta de las especies moleculares de interés. Como se señala anteriormente, esta condición se cumple para muestras acuosas usando impulsos de láser de infrarrojos sintonizados a vibraciones moleculares específicas del agua que tienen duraciones de impulso de menos de 1 ns, e idealmente menos de 100 ps.

Se puede usar una amplia variedad de métodos de ionización para ionizar el analito desorbido antes del análisis de masas, incluso un mecanismo de ionización convencional tal como ionización de electrospray, descarga en corona, ionización química y emisión térmica, bombardeo atómico rápido, fotoionización, ionización de plasma acoplado inductivamente, y otros métodos de ionización basados en plasma tales, pero sin limitación a estos, como análisis directo en tiempo real (DART, del inglés *direct analysis in real time*).

La figura 11 ilustra una realización preferida de la invención en la que una muestra delgada que tiene un grosor del orden de la profundidad de absorción del haz óptico se proporciona sobre un porta-muestra 650, preferiblemente que comprende un pocillo 660. El porta-muestra es preferiblemente transparente al haz óptico empleado para desorción ablativa blanda, lo que permite dirigir el haz sobre la muestra desde el lado posterior. Como alternativa, el haz óptico puede ser dirigido sobre la superficie superior de la muestra en un ángulo. Como se ha descrito anteriormente, el uso de una muestra con un grosor del orden de la profundidad de absorción del haz óptico es preferible ya que reduce sustancialmente o elimina los efectos de retroceso, que de otro modo pueden interferir con la subsiguiente etapa de análisis de masas.

El porta-muestra 650 se monta preferiblemente en un sistema que permite traslación relativa, tal como un fase de traslación multieje 690. El porta-muestra puede alojar la muestra en muchas formas, incluida una capa delgada de muestra sólida o semisólida, o uno o más pocillos para proporcionar una capa delgada de muestra líquida. Como se señala anteriormente, se describen preferiblemente realizaciones de porta-muestra para uso con desorción ablativa blanda y análisis espectrométrico de masa en la solicitud de patente provisional de EE.UU. en tramitación con la presente n.º de serie 61/300.623. Para el caso de muestras líquidas, el porta-muestra preferiblemente comprende uno o más pocillos contenidos dentro de un aparato de alojamiento como el descrito en la solicitud de patente provisional n.º de serie 61/300.623, como se ha descrito anteriormente. En una realización más preferible, el aparato porta-muestra también es transparente al haz óptico, lo que permite proporcionar el haz óptico a través de la parte trasera del aparato de alojamiento y el porta-muestra, por lo que el analito desorbido puede ser eyectado a través del agujero en el alojamiento. El camino de haz 680 incluye preferiblemente un espejo 685 para dirigir el haz óptico sobre la muestra en incidencia normal. El camino de haz 680 puede comprender además elementos ópticos adicionales, tales como una óptica de conformación de haz para proporcionar un haz óptico superior sustancialmente plano.

El haz óptico es dirigido primero sobre la muestra, produciendo desorción ablativa blanda de la muestra. Tras un retraso de tiempo prescrito, la estela sometida a ablación es ionizada, preferiblemente usando un haz de fotoionización (no se muestra) como se describe más adelante. El haz de ionización produce preferiblemente iones fotogenerados en la estela de ablación usando umbral de ionización. Por consiguiente, el haz de ionización es preferiblemente un haz de ultravioleta de vacío (VUV). En una primera realización no limitativa, el haz de VUV puede ser generado desde armónicos de láser (por ejemplo, usando métodos descritos en Eden, J. G. *Progress in Quantum Electronics* 2004, 28, 197-246).

En una realización preferida, el impulso de VUV sintonizado a el umbral para ionización para el analito de interés para depositar la menor cantidad de exceso de energía como sea posible al proceso de formación iónica para mantener el patrón de fragmentación molecular más estrecho posible. Preferiblemente, el exceso de energía de ionización es menor de aproximadamente 1 eV. La longitud de onda del impulso de ionización está preferiblemente en el intervalo de longitud de onda de 7-10 electronvoltios (eV) o 100-200 nm para muchos analitos biomoleculares. En una realización, la longitud de onda de VUV puede ser sintonizada para explotar el umbral de ionización de analitos de interés específicos como filtro óptico.

El retraso de tiempo entre el primer haz óptico que conduce la desorción ablativa y el impulso de VUV usado para

generación iónica cuantitativa se establece preferiblemente entre 1 nanosegundo a 1 milisegundos, dependiendo de la ubicación espacial del haz de VUV con respecto a interceptar la estela de ablación a fin de generar iones según sea necesario para detección por espectrometría de masas. Aquí, se debería mencionar que el intervalo de tiempo entre el haz óptico usado para ablación y el haz de VUV para ionización es típicamente bastante largo debido a la velocidad relativamente lenta de las moléculas en la fase gaseosa y dimensiones espaciales asociadas con recogida de iones. El proceso de ionización depende solamente de la energía del haz de VUV de manera que se pueden usar ya sea únicos impulsos o trenes de impulsos, ya que es lo más práctico para entregar la energía requerida para máxima generación iónica.

Como la absorción de VUV depende de la sección transversal molecular para absorción, la etapa de generación iónica es totalmente determinista, reproducible, y así permite determinación cuantitativa espectroscópica de masas de las especies moleculares. Usando impulsos láser de energía suficientemente alta, este proceso de absorción puede lograr cerca del 100% de eficiencia con respecto a la generación iónica. Por ejemplo, si la sección transversal de absorción molecular es de 10-15 cm<sup>2</sup>, una sección transversal típica para transiciones resonante de VUV, entonces un haz de láser con 1015 fotones/cm<sup>2</sup> excitará el 67% de las moléculas en su camino.

En una realización preferida, se emplean impulsos láser con 1016 fotones/cm<sup>2</sup>, o aproximadamente 1 microjulio para un foco de 100 micrómetros, y es posible excitar eficazmente sustancialmente todas las moléculas dentro del camino de haz de láser. Este nivel de generación de VUV está muy dentro de recientes avances en tecnología de láser. Como las ópticas de recogida de iones pueden lograr el 100% de eficiencia de recogida para partículas cargadas, esta realización de la invención proporciona una prescripción por la que la espectrometría de masas puede lograr detección muy sensible, potencialmente a nivel de única molécula.

La realización anterior en la que se proporcionan dos impulsos, uno para conducir la ablación y una (o series de impulsos) en la VUV para fotogenerar iones preferiblemente usados para muestras que consisten en moléculas de interés homogéneas y están libres de agregados. En aplicaciones proteómicas y biodiagnóstico que implican tejidos o células enteras, la muestra puede ser heterogénea y las moléculas de interés existen en complejos. Para esta clase de muestras, se puede requerir un impulso adicional de manera que la secuencia de impulsos de láser consiste en 3 impulsos, es decir dos impulsos para disociación y desorción ablativa y un impulso de VUV para fotoionización. El primer impulso óptico en este escenario se usa para excitar un volumen tan pequeño como sea posible de la muestra para limitar el número de moléculas eyectadas a la fase gaseosa. Las moléculas que son sometidas a ablación son capturadas en un medio secundario que lleva a nuevas condiciones de equilibrio en las que los complejos moleculares se disocian en moléculas individuales. El segundo impulso de láser IR se sintonizará con el espectro vibratorio de un componente molecular particular de este medio secundario, típicamente el componente voluminoso que comprende la retícula, para conducir la ablación de las moléculas ahora aisladas a la fase gaseosa. El tercer impulso de láser es el impulso de VUV (o tren de impulsos ionizadores) como antes y su rol es ionizar las moléculas de interés de forma cuantitativa, como se ha descrito anteriormente.

El porta-muestra se posiciona preferiblemente para orientar la muestra inmediatamente por debajo un pequeño agujero que permite que las moléculas desorbidas y fotoionizadas entren al espectrómetro de masas y encuentren tan pocas moléculas de aire intermedias como sea posible para evitar enfriamiento por colisión y formación de agrupaciones, formación de gotitas, y propagación de ondas de choque del aire comprimido por la explosión por ablación (como se trata adicionalmente más adelante). El uso de un agujero es un procedimiento típico para células ambientales adaptadas para muestras de agua que empleando bombeo diferencial para crear condiciones de alto vacío por encima de la muestra. Al hacer esta distancia por encima la muestra tan pequeña como sea posible (preferiblemente aproximadamente 100 micrómetros por encima de un agujerito de 100 micrómetro) se reduce sustancialmente el problema de interacciones con aire ambiente.

Otra razón importante para incluir una zona bombeada diferencialmente alrededor de la muestra es que los impulsos de VUV para la fotogeneración de iones como se ha descrito anteriormente requiere que la estela de ablación se traslade a una región evacuada para evitar absorción de luz VUV por el aire, atenuación del impulso de VUV, y generación de iones no deseados. Esta última condición es satisfecha por las consideraciones de porta-muestras anterior.

La figura 12 ilustra la multiplexación de un haz VUV de fotoionización con el haz óptico de desorción ablativa blanda para espectrometría de masas cuantitativa e identificación molecular para muestras delgadas y gruesas. Estas figuras muestran esquemáticamente un impulso de VUV de láser que interseca la estela sometida a ablación dentro de una región evacuada. La región evacuada está preferiblemente dentro del espectrómetro de masas. Esta interacción tiene que ocurrir en una zona sustancialmente evacuada por encima de la muestra para evitar que el aire absorba la VUV. Esto se consigue preferiblemente al colocar un agujero bombeado diferencialmente por encima de la muestra. La región entre la muestra y el agujero se mantiene preferiblemente a aproximadamente 5 torr, que es aproximadamente la presión de vapor de agua a temperatura ambiente. Preferiblemente, la región entre el agujero y las ópticas de recogida de iones está en alto vacío, siendo típicas presiones de menos de 10<sup>-6</sup> torr.

Más específicamente, la figura 12(a) muestra una muestra ópticamente gruesa 715 donde hay formación secundaria de eyección de masa y gotitas debido a efectos de retroceso, como se ha tratado anteriormente. El haz de VUV de ionización 700, preferiblemente un impulso óptico 702, se temporiza para que se solape con el canto delantero de la

estela de ablación 705 dentro de una región al vacío 706 donde las moléculas han experimentado desorción ablativa por el haz óptico 704 y están libres de formación de gotita (cabe señalar la presencia de gotitas 710 tras la estela de ablación 705). El haz de VUV se enfoca a las dimensiones de unos pocos micrómetros para coincidir espacialmente con esta zona de interacción preferida, produciendo analito ionizado 720 que además se dirige hacia la entrada de espectrómetro de masas.

La figura 12(b) muestra una muestra ópticamente delgada 725 proporcionada en un sustrato 730 que es transparente al haz óptico 735. En este ejemplo, la zona irradiada de la muestra se desintegra y todas las moléculas son eyectadas a la fase gaseosa sin presencia de gotitas. La temporización del haz de VUV de ionización 745 es menos crítica en este caso, y los haces no tienen que enfocarse si no es para coincidir con el elemento de volumen cilíndrico de la estela de ablación 750. En una realización preferida, se emplea una disposición multipaso, como se muestra mediante espejos de reflexión de VUV 755, para aumentar la eficiencia de absorción y generación iónica. El haz de VUV, proporcionado dentro de región al vacío 732, es interrumpido tras ionizar la estela de ablación por volcado de haz 760. Como en la figura 12(a), la región intermedia 765 es bombeada diferencialmente para mantener una presión de vapor baja.

Debido a la orientación del porta-muestra, en el que la superficie normal que pasa a través de la zona irradiada dentro de la muestra se orienta hacia la entrada de un espectrómetro de masas, el analito ionizado dentro de la estela de ablación es transportado además a través de la entrada y al espectrómetro de masas. Opcionalmente, se pueden proporcionar elementos de enfoque adicionales tales como embudos iónicos y otros medios de guiado iónico usando tensiones DC o RF, como se conoce en la técnica, para enfocar aún más la muestra ionizada a la entrada del espectrómetro de masas.

La figura 13 proporciona una realización relacionada en la que el porta-muestra comprende una distribución plana de los micropocillos 815 que son rellenados por un capilar 800 desde un sistema de electroforesis capilar 805 o un sistema para hacer fluir un líquido de muestra en un capilar tal como una bomba de flujo. Esta realización combina la eficiencia de separación de electroforesis capilar con la eficiencia, reproducibilidad y naturaleza cuantitativa de análisis espectrométrico de masas basado en desorción ablativa blanda. Como se ha descrito anteriormente y en la solicitud de patente provisional de EE.UU. en tramitación con la presente n.º de serie 61/300.623, un pocillo es rellenado al formar una gotita o una parte de una gotita en un extremo distal del capilar y poner en contacto la gotita con el pocillo. Preferiblemente, el pocillo se adapta para ser rellenado por un proceso de humedecimiento dinámico en el que el contacto de una gotita que reside en la superficie de un sustrato con la parte superior de un pocillo resulta en el relleno del pocillo con un volumen de muestra estable y delgada. Por consiguiente, los múltiples pocillos en la distribución de pocillos pueden ser rellenados en serie al contactar sobre la punta de un capilar con un primer pocillo, rellenar el pocillo, recargar la gotita (ya sea pasivamente o con medios activos tales como una bomba), y posteriormente contactar la gotita recargada con un pocillo adicional. Este proceso puede ser repetido para rellenar una distribución de pocillos y correlacionar cada muestreo alícuota con una posición o tiempo para análisis de separación. En otra realización, el capilar puede comprender un capilar de pinchazo en dedo para proporcionar directamente sangre capilar a un dispositivo de muestreo para análisis.

La desorción ablativa directa y la fotoionización son beneficiosas para análisis espectral de masas con bajo ruido, como se evidencia en la figura 14, que compara la eficiencia de inyección iónica para (a) una realización de la presente invención y (b) un sistema de ionización de electrospray como se conoce en la técnica. En la figura 14(a), la estela de ablación ionizada es transportada directamente a través del agujero de entrada 850 del espectrómetro de masas 855. Esta geometría, en la que el porta-muestra, y por tanto la estela de ablación posee simetría axial con las ópticas iónicas dentro del dispositivo MS, resulta en un método más eficiente de recogida de iones que métodos de la técnica anterior como se muestra en la figura 14(b).

Las realizaciones mencionadas anteriormente permiten una espectroscopia de masas cuantitativa con varios órdenes de aumento de magnitud en la eficiencia de generación iónica. Este procedimiento se puede aplicar a todos los métodos presentes de espectrometría de masas para obtener aumentos correspondientes en sensibilidad y rendimiento que vienen con aumento de sensibilidad. Ejemplos no limitativos de sistemas de espectrometría de masas que se pueden usar para el subsiguiente análisis de masas de analito desorbido y ionizado incluyen sistemas de sectores, trampa iónica, cuadrípulo y tiempo de vuelo, y combinaciones de los mismos.

En incluso otra realización, se pueden emplear absorción secuencial resonante de dos fotones para la fotoionización. Preferiblemente, se puede proporcionar un haz óptico de un intervalo de longitudes de onda en la 200-300 nm para obtener ionización. En una realización preferida, el estado de suelo a estado excitado se conduce a saturación, por lo que el segundo impulso ioniza el analito en el régimen lineal. Este tipo de realización es preferible porque se pueden utilizar fuentes de láser más simples y más rentables.

La figura 15 muestra una realización alternativa de fotoionización al planteamiento de VUV mencionado anteriormente, en el que el haz de ionización 865 usado para generar cuantitativamente iones dentro de la estela de ablación 870 no está en la región espectral de VUV. La etapa de fotoionización se puede implementar en condiciones ambientales, lo que es importante en muchas aplicaciones. La etapa de fotoionización es conducida en todos casos usando todos procesos resonantes de 1 fotón, en condiciones de saturación, para permitir ionización cuantitativa de casi todas las especies moleculares en el camino de haz.

Esto se logra preferiblemente usando un método de cromatografía óptica, como se ilustra en la figura 16. La figura muestra un diagrama de nivel de energía para una molécula excitada, que comprende un primer estado electrónico 900, niveles vibratorios 902, una serie de niveles electrónicos excitados 904 y 906, y estado ionizado 908, por encima del cual el exceso de energía depositada produce fragmentación. El lado izquierdo muestra el efecto de ionización indiscriminante usando ionización multifotónica no resonante, donde cada fotón es representado por el vector 910.

El correspondiente impulso usado típicamente en este caso es el que se le hace referencia como impulso limitado de transformada. Esta forma de impulso se da en la figura siguiente (panel medio izquierdo). El impulso espectral 912 está centrado en una longitud de onda central, ( $\omega_0$ , y la fase  $\phi$  914 es la misma para todas las longitudes de onda dentro del ancho de banda del impulso. Esto da el impulso más corto para un ancho de banda dado. Este tipo de impulso lleva a ionización multifotónica indiscriminada, ya que no hay ordenación de tiempo de qué niveles electrónicos son abordados por el campo de láser. El ion molecular se prepara con una distribución ancha de posibles estados con varios grados de exceso de energía.

Este efecto lleva a una amplia distribución de fragmentos moleculares como se muestra esquemáticamente en el panel izquierdo inferior. Esta distribución ancha de los fragmentos 916 hace difícil la identificación de la molécula, especialmente dentro de una mezcla. Los picos de diferentes moléculas se solapan y no hay una única firma para la molécula de interés.

El lado derecho de la figura 16 muestra, en contraste, el control que se puede lograr con procesos totalmente resonantes de 1 fotón para ionizar la molécula. Cada molécula tiene espectros electrónicos y espectro de potencia distintos para cualquier patrón de fragmentación consiguiente. Al hacer coincidir el espectro de excitación de láser con el espectro molecular usando absorción de 1 fotón 920, 922 y 924, se puede lograr un único patrón de fragmentación relativamente estrecho para ayudar a identificar las especies moleculares (panel derecho inferior).

El impulso en este caso tiene un perfil de fase estructurado 926 que expone las moléculas a un campo a una frecuencia dada  $\omega_1$ , luego  $\omega_2$  y finalmente  $\omega_3$  para ionizar selectivamente la molécula en umbral para dar una firma molecular distintiva estrecha 928.

El grado de ionización selectiva y separación de especies moleculares en la etapa de ionización (cromatografía óptica) se muestra en la figura 16. Cada transición que se mejora resonantemente, al hacer coincidir la frecuencia del campo aplicado a la separación de energía entre estados electrónicos, lleva a un factor de mejora de 10-100. Como la ionización global implica múltiples transiciones, ionización resonantemente coincidente puede dar selectividad más de 10.000 desde el punto de vista de identificar una especie A en un mezcla de ABC como se muestra esquemáticamente en la figura. Más específicamente, los niveles de energía de molécula B, mostrados en 930, y molécula C, mostrados en 932, son no resonantes con el contenido espectral del tren de impulsos ópticos mostrados por vectores 936, 938 y 940. La molécula A, por otro lado, tiene una estructura de nivel de energía 934 que es resonante con el tren de impulsos ópticos, que lleva a ionización selectiva con bajo trasfondo de especies moleculares B y C.

Por consiguiente, en una realización preferida, el haz óptico ionizante puede comprender una secuencia temporal de impulsos resonantes visible y UV de 1 fotón temporizados apropiadamente para terminar en el mismo umbral de estado de ionización para minimizar la fragmentación y la pérdida de identificación molecular. En esta invención se reconoce que moléculas ionizadas por este tipo de proceso determinista darán patrones de fragmentación característicos que ayudan en la identificación molecular. El espectro particular de componentes UV a VUV al impulso se puede usar para generar explícitamente patrones de fragmentación particulares que son altamente específicos moleculares.

Con respecto a la implementación de la presente invención, uno entrenado en la técnica de láseres ultrarrápidos puede lograr las longitudes de onda de VUV para fotoionización, por ejemplo, usando generación de armónicos altos de láseres disponibles comercialmente o usando combinaciones de procesos resonantes de 1 fotón para alcanzar el mismo umbral de ionización. El último proceso de resonancia multifotónica hace posible láseres de bajo coste y ofrece un grado adicional de selectividad en el proceso de fotoionización como contraste adicional en la etapa de detección usando espectrometría de masas.

Se puede lograr selectividad incluso más alta para ionizar una molécula particular mediante el uso de impulsos con forma ultracorta. Usando Moduladores Espaciales de Luz (o Máscara de Cristal Líquido, MEMS o Moduladores Acusto-Ópticos) por ejemplo, es posible formar la fase y el espectro de impulsos ultracortos a fin de maximizar la eficiencia de ionización de un objetivo de molécula. Como la fase y los perfiles espectrales de los impulsos óptimos dependen estrechamente de los estados cuánticos particulares del objetivo de molécula, tal ionización es ideal para una molécula particular mientras no necesariamente es muy eficaz para otras moléculas, mejorando de ese modo considerablemente la selectividad de la medida.

Este aspecto de la invención da una prescripción para generación iónica altamente eficiente sin fragmentación de la molécula de analito de interés y simultáneamente proporciona selectividad adicional al explotar huellas ópticas de los espectros electrónicos de las moléculas. La ionización óptica directa de moléculas neutras desorbidas ablativamente blandas, según realizaciones preferidas de la invención, proporciona por lo tanto una alternativa inventiva y altamente útil al MALDI y métodos de electrospray conocidos en la técnica.

Como la absorción de luz es lineal este proceso es completamente determinista. Un rasgo importante de esta

realización preferida de la invención en este sentido es que proporciona una prescripción para lograr los campos de luz para lograr generación iónica sustancialmente reproducible y altamente eficiente, una prescripción que se hace posible por las realizaciones mencionadas anteriormente de la invención que implican desorción ablativa blanda de analito desde una muestra. Además, el uso de desorción ablativa blanda para proporcionar moléculas de analito sustancialmente no fragmentadas y no ionizadas en la fase gaseosa hace posible la aplicación de este mecanismo de ionización para moléculas incluso muy grandes que de otro modo tendrían presión de vapor insignificante.

Este rasgo único del proceso de fotoionización lineal resonante y desorción ablativa blanda que proporciona generación iónica determinista para análisis cuantitativo espectroscópico de masas se puede contrastar claramente con métodos ineficientes de la técnica anterior que implican la desorción e ionización simultáneas del analito que puede llevar a una fragmentación de los analitos de interés. A diferencia de realizaciones de la presente invención, los ambientes creados por MALDI o ionización de electrospray crean iones como parte del mecanismo que eyecta moléculas a la fase gaseosa. En este sentido, la fotogeneración de iones únicamente se añade a las densidades iónicas no lineales. La fotoionización directa no puede vencer el proceso de ionización inherentemente no lineal en los métodos MALDI y de electrospray para volatilizar por sí mismos las moléculas. Es únicamente en caso de que se inyecten moléculas a la fase gaseosa intacta fotogeneración de iones llevará a resultados reproducibles. Por consiguiente esta combinación única de desorción ablativa blanda y fotoionización lineal resonante juntas que imparte capacidades verdaderamente cuantitativas a la espectrometría de masas.

Como se señala anteriormente, esta realización de la invención emplea fotoionización lineal resonante de las moléculas de interés para proporcionar las partículas cargadas para determinación espectroscópica de masas de la identidad molecular. El hecho de que el proceso de desorción ablativa ocurre en un lapso de picosegundos a nanosegundos, como ráfaga pulsada de moléculas en fase gaseosa, permite el uso de impulsos láser adicionales multiplexados en el tiempo para una mejor detección usando espectrometría de masas.

Un rasgo importante de la fotoionización con respecto a la presente realización es que la etapa de generación iónica es determinada por la sección transversal de absorción de la molécula y que esta sección transversal es específica de molécula. Este rasgo de la etapa de ionización es determinado por la sección transversal de absorción para luz a longitudes de onda más cortas que el umbral de ionización (energías fotónicas de más de la energía cegadora del electrón a la molécula) y hace el proceso sustancialmente determinista y cuantitativa con respecto a generación iónica para detección e identificación usando espectrometría de masas.

Aspectos de la presente invención abordan así un problema clave en el uso de espectrometría de masas para detección molecular ultrasensible. En principio, los espectrómetros de masas pueden detectar moléculas individuales. Una vez se genera un ion, hay métodos bien establecidos para detectar iones usando ópticas iónicas para enfocar selectivamente el ion a un detector. Este límite de detección de única molécula es un límite clave para la espectrometría de masas y otros métodos analíticos. La espectrometría de masas aborda este límite debido a naturaleza cargada del proceso de detección de partículas.

Este límite no se ha obtenido antes de esta invención ya que los métodos de la técnica anterior para volatilizar las moléculas y los subsiguientes mecanismos de ionización son ineficientes, no lineales, y no reproducibles al grado requerido para análisis cuantitativo. En particular, métodos de la técnica anterior para volatilización e ionización de muestras para espectrometría de masas a menudo son inadecuados para diagnóstico clínica donde alta exactitud y precisión son esenciales. Los mecanismos convencionales para generación iónica basados en MALDI únicamente producen aproximadamente 1 ion de  $10^4$  moléculas (Mass Spectrometry Reviews, 1998, 17, 337-366). Por lo tanto, incluso si el propio método intrínsecamente podía detectar moléculas individuales (cargadas), no ha sido posible generar iones eficientemente o reproduciblemente de manera suficiente como para lograr este límite. En contraste, en el límite de absorción saturada del haz incidente, es posible fotoionizar todas las moléculas en el camino de láser. Así, realizaciones de esta invención pueden aumentar la sensibilidad de la espectrometría de masas en un factor significativo.

Igualmente importante para lograr una sensibilidad significativamente mejorada es la naturaleza determinista y repetible de los procesos de desorción e ionización según realizaciones de la invención. Tal repetibilidad es importante para lograr mediciones con buena precisión y un bajo límite de detección. Por consiguiente, se pueden emplear realizaciones de la invención para obtener capacidades de detección altamente sensibles con precisión cuantitativa, con aplicaciones en la detección de marcadores biológicos en fases tempranas de una enfermedad a partir de un pequeño volumen de muestra.

Para sensibilidad de detección óptima, el segundo impulso, en el caso más simple de dos impulsos, es retrasado adecuadamente en el tiempo para la acción del impulso ablativo para permitir a las moléculas entrar totalmente a la fase gaseosa y permitir que agrupaciones de moléculas se disocian tan totalmente como sea posible.

Una realización más general de la invención implica una serie de impulsos que abarcan el intervalo de IR a VUV para maximizar la eficiencia en la generación global de iones de la molécula particular de interés. Hay una secuencia inicial de impulsos láser IR cortos sintonizados a diversas vibraciones moleculares que sirven para realizar ablación de las moléculas a la fase gaseosa usando desorción ablativa blanda, y para desenredar complejos moleculares al darles suficiente energía para vencer barreras para disociación hasta moléculas individuales. Estos impulsos láser de IR y la

temporización se ajustan para propulsar óptimamente moléculas aisladas hasta la fase gaseosa intacta. De manera similar, la secuencia de impulsos para fotogeneración de iones se puede generalizar a una serie de impulsos sintonizados a resonancias electrónicas específicas de la molécula. Cada molécula tiene una única firma electrónica. Usando una secuencia de impulsos de visible a UV, como se yuxtapone para dirigir ionización VUV, es posible hacer coincidir ambos del espectro de láser a la molécula de interés para lograr generación iónica determinista y controlar el patrón de fragmentación de manera conocida que permita aislar molécula de otras en una forma de cromatografía óptica.

En todos los casos, el anterior tiempo y la multiplexación de longitud de onda de impulsos láser de IR, visible, UV, a VUV lleva a detección iónica cuantitativa a través del único uso de desorción ablativa blanda para propulsar moléculas hasta la fase gaseosa con el mínimo exceso de energía posible - sustancialmente libre de iones generados térmicamente y/o excesiva fragmentación.

Como se señala anteriormente, en una realización preferida, el proceso de desorción de muestra se realiza como proceso en dos etapas en las que partes separadas espacialmente de la muestra se desorben primero y se capturan sobre un sustrato preparado que comprende una distribución de pocillos que contiene un líquido que comprende un desnaturalante. El uso de pocillos separados espacialmente también permite resolución espacial en el proceso de desorción ablativa y hace posible usar métodos analíticos tales como espectrometría de masas para mapear, cuantitativamente, la composición específica de un material como función de la posición. Este simple planteamiento permite resolución espacial hasta una resolución de 100 nm y más allá, dependiendo del diámetro y espaciamiento de pocillos.

Este rasgo solo es único y bastante superior al uso de métodos de fresado ion para proporcionar espectrómetros de masas con resolución espacial. Véase por ejemplo el documento de C. G. Marxer et al. titulado "Supported membrane composition analysis by secondary ion mass spectrometry with high lateral resolution" BIOPHYSICAL JOURNAL Volumen: 88 Lanzamiento: 4 páginas: 2965-2975. El uso de fresado iónico lleva a una desintegración completa de las moléculas de interés y únicamente se obtiene composición atómica no composición molecular. A fin de obtener cualquier información cuantitativa usando fresado iónico, se necesita usar moléculas etiquetadas isotópicamente y comparar ratios de fragmento iónico, un procedimiento complejo y laborioso. El rasgo de resolución espacial según la presente realización es especialmente útil en investigación proteómica, ya que proporciona una herramienta para construir un mapa químico de los trabajos de una célula.

La figura 18 muestra un ejemplo de un sistema láser combinado con un espectrómetro de masas que puede ser usado según realizaciones de la presente invención. Un sistema láser amplificado de femtosegundos se usa para generar impulsos láser de banda ancha que abarcan de UV a visible, así como los impulsos para desorción ablativa blanda. El sistema láser para esta aplicación, como se muestra, se basa en el trabajo de D. Kraemer, M. Cowan, R. Hua, K. Franjic, y R.J.D. Miller, "High Power Femtosecond Infrared Laser Source Based on Noncollinear Optical Parametric Chirped Pulse Amplification", J. Opt. Soc. Am. B 2007, 24(4), 813-818.

Los impulsos sintonizables IR y UV se generan usando amplificadores paramétricos ópticos. Los impulsos de IR son generados por un amplificador paramétrico óptico 950 que es bombeado por un amplificador de 1,06 micrómetros 952 y la salida amplificada de un láser de fibra Er de 1,55 micrómetros 952. La salida del láser Er se divide en dos fibras amplificadoras 956, cada una seguida por una fibra no lineal 958. Un camino proporciona una semilla para el amplificador 952, y el otro proporciona una semilla de señal para amplificador paramétrico 950. La salida tranquila del amplificador paramétrico 950 es reflejada por un divisor de haz 960 y proporciona el haz óptico 962 para desorción ablativa blanda. Este haz es dirigido sobre una muestra en condiciones ambientales cerca de la entrada 962 del espectrómetro de masas 964. Con respecto a fotoionización, los impulsos de UV a Vis generados a partir del haz de salida de señal 968 del amplificador paramétrico 950 en cámara de vacío 970 que aloja una fibra hueca 972 rellena con gas Ar. La salida es filtrada espectralmente con el filtro 974 para que coincida con el espectro electrónico de la molécula de interés con respecto a ionización para detección espectroscópica de masas.

Los impulsos resonantemente coincidentes tienen duraciones de impulso de menos de 1 picosegundo, el tiempo para relajación no radiativa de los niveles electrónicos que destruyen el proceso de escalada de escalera resonante representado en las figuras 16 y 17. Para impulsos de VUV, la potencia pico es suficiente con láseres convencionales de femtosegundos para usar generación de armónicos altos usando células de gas para obtener las longitudes de onda y las energías necesarias para ionización saturada, al 100%, de las moléculas de interés como parte de la detección por espectrometría de masas. La temporización entre todos los impulsos se puede manejar simplemente variando las longitudes de camino entre los haces que van a ser multiplexados usando ópticas de fibra de longitudes variables optimizadas para el proceso. Además, en la temporización entre la inyección de una estela ionizado al dispositivo de análisis de masas y la subsiguiente etapa de análisis de masas se puede coordinar al proporcionar una señal obtenida de una medición de potencia de uno de los haces ópticos. En un ejemplo no limitativo, se obtiene una señal al medir una parte de la potencia óptica dependiente del tiempo transmitida a través de un divisor de haz o espejo dicróico, y esta señal se proporciona (opcionalmente tras acondicionar la señal con un circuito de control) como señal externa o activador para el espectrómetro de masas, preferiblemente con una entrada correspondiente de fase o retraso que se puede establecer manualmente a través de un procedimiento de calibración.

Así, la etapa de ionización se logra mediante el uso de impulso de VUV temporizado generado a través de generación

de armónicos altos (usando por ejemplo el mismo láser usado para generar la IR), como se muestra en la figura 18. La longitud de onda de la VUV se sintoniza para proporcionar la energía mínima para retirar un electrón y crear un ion progenitor para identificación específica de masa. Este rasgo es importante para minimizar el patrón de fragmentación para ayudar en la identificación de la molécula; aunque se reconoce que se puede explotar la sintonización de la longitud de onda de VUV por encima este umbral para cambiar el patrón de fragmentación de maneras conocidas, intrínsecas a la molécula, para ayudar además en la identificación de las especies moleculares.

Como se ha tratado anteriormente, el mecanismo de desorción ablativa blanda es eficaz para generar una estela bien temporizada de moléculas en fase gaseosa en su estado nativo, con una pequeña divergencia angular. No hay estado estable o radiación VUV de fuente de onda continua con suficiente flujo o número de fotones/unidad de área, para fotoionizar significativamente la muestra y lograr totalmente los límites de sensibilidad de la espectrometría de masas. El nivel de radiación VUV enfocada requiere un haz de láser enfocado en este régimen de longitud de onda para lograr suficiente flujo para excitar y fotoionizar casi todas las moléculas dentro de la estela de ablación generada. Tales fuentes de radiación de VUV, con suficientes energías de impulso o fotones de VUV, actualmente únicamente están disponibles con láseres pulsados cortos de menos de 100 ns de duración.

El impulso bien sincronizado de moléculas en fase gaseosa logrado a través de desorción ablativa blanda como se muestra esquemáticamente en las figuras permite las estrictas condiciones de enfoque de fuentes láser VUV para fotoionización máxima, como se muestra esquemáticamente en la figura 12. Como se señala anteriormente, esta misma etapa de ionización se puede realizar con una serie de resonancias bien temporizadas de visible a UV, de 1 fotón, que coinciden con el espectro electrónico de la molécula de interés para eficiencia más alta con respecto a conversión de láser de la luz necesaria y para proporcionar contraste adicional contra especies moleculares de trasfondo. Esta última etapa de fotogeneración de iones ya sea por un único impulso VUV o una secuencia de impulsos de visibles a UV resonantemente coincidentes, en combinación con desorción ablativa blanda de analito en fase gaseosa, produce iones progenitores con las pequeñas cantidades de exceso de energía.

Este proceso depende explícitamente de las secciones transversales de absorción molecular única para la absorción de luz en estas longitudes de onda. El proceso de generación iónica por esta etapa depende solamente de la sección transversal de absorción en caso de fotoionización de VUV y es altamente reproducible. De manera similar, para excitación UV/Vis la absorción depende del producto de las secciones transversales de absorción y de nuevo es reproducible para una energía/espectro de impulso dados. Así, este planteamiento resuelve el problema de ionización irreproducible y mejora la potencia cuantitativa de la espectrometría de masas para aplicaciones clínicas. Además, esta invención resuelve el problema de fragmentación molecular. Estos dos rasgos permiten potencialmente que la espectrometría de masas logre límites de detección cerca de única molécula. Obtener este límite es importante ya que no hay congestión de trasfondo que complique asignaciones de picos de masa a especies moleculares. Por consiguiente, aspectos de esta invención permiten la extensión de métodos espectroscópicos de masas a la caracterización de biomarcadores sin purificación previa.

Para contraste adicional en identificación de especies, puede ser deseable tener fragmentación, aunque tal fragmentación también debe ser determinista como en la fotogeneración de iones. Al controlar los colores o el componente espectral de la VUV y Vis a UV en el composición de impulso, es posible obtener fragmentación específica según se desee al acoplar la luz a niveles vibrónicos moleculares específicos, para proporcionar energía por encima del mínimo para ionización (umbral de ionización) y de ese modo dar patrones de fragmentación bien definidos según sea necesario para identificar moléculas.

Realizaciones de la presente invención se pueden aplicar para dirigir la determinación de composición molecular de materiales biológicos. Aspectos de la invención hacen posible tomar una única gota de sangre de un paciente y proporcionar diagnóstico a nivel molecular de bienestar y la detección temprana de marcadores de enfermedad.

Como se emplea en esta memoria, los términos "comprende", "que comprende", "incluye" y "que incluye" se han de interpretar como que son inclusivos y sin límites, y no exclusivos. Específicamente, cuando se usa en esta memoria descriptiva incluidas las reivindicaciones, los términos "comprende", "que comprende", "incluye" y "que incluye" y variaciones de los mismos significa que se incluyen los rasgos, etapas o componentes especificados. Estos términos no se deben interpretar como que excluyen la presencia de otros rasgos, etapas o componentes.

La descripción anterior de las realizaciones preferidas de la invención se ha presentado para ilustrar los principios de la invención y no para limitar la invención a la realización particular ilustrada. Se pretende que el alcance de la invención sea definido por todas las realizaciones abarcadas dentro de las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para realizar desorción blanda de analito (150) desde una muestra (110), dicho método comprende las etapas de:
- 5 irradiar dicha muestra con un haz óptico (100), en donde dicho haz óptico se configura para excitar ópticamente niveles vibratorios de un componente de dicha muestra dentro de una zona irradiada (120) durante un intervalo de tiempo que es menor que una duración de tiempo requerida para pérdida de energía más allá de dicha zona irradiada para difusión térmica y expansión acústica;
- 10 caracterizado por que energía absorbida de dicho haz óptico por dicho componente es suficiente para supercalentar dicho componente y provocar eyección de una estela de ablación (130) de dicha zona irradiada, dicha estela de ablación que incluye analito desorbido; y
- analizar dicho analito desorbido con un dispositivo analítico.
2. El método según la reivindicación 1, en donde dicha muestra (110) es una muestra líquida, y dicha muestra líquida se proporciona en un micropocillo (815).
- 15 3. El método según la reivindicación 2, en donde dicho micropocillo (815) se forma en un sustrato transparente (575), en donde dicho sustrato transparente es transparente a dicho haz óptico (100), dicho método comprende la etapa de irradiar dicha muestra (110) a través de una superficie posterior de dicho sustrato transparente.
4. El método según la reivindicación 1 o 2 que comprende además la etapa de proporcionar un porta-muestra que contiene una distribución de micropocillos (815), en donde una pluralidad de micropocillos dentro de dicha distribución de micropocillos contienen muestras (110), y en donde dicha etapa de realizar desorción blanda de analito (150) se repite para cada micropocillo que contiene muestra dentro de dicha distribución de micropocillos.
- 20 5. El método según la reivindicación 4, en donde dicho porta-muestra (650) se proporciona en un alojamiento, dicho alojamiento comprende:
- una plataforma de soporte (500) para recibir dicho porta-muestra;
- un depósito (520) para mantener una presión de vapor dentro de dicho alojamiento;
- 25 una cubierta deslizante (550) conectada de manera retirable a dicha plataforma de soporte para encerrar dicho porta-muestra y dicho depósito dentro de dicho alojamiento, dicha cubierta comprende además un agujero (560) para proporcionar acceso externo para dicho haz óptico (100) a al menos un micropocillo (815) cuando dicho porta-muestra está encerrado dentro de dicho alojamiento, y en donde dicha cubierta es trasladable para posicionar dicho agujero sobre cada micropocillo mientras encierra el resto de dicho uno o más micropocillos y dicho depósito;
- 30 dicho método comprende además las etapas de:
- colocar dicho porta-muestra sobre dicha plataforma de soporte;
- rellenar dicho depósito con un líquido seleccionado para estabilizar un menisco dentro de dichos micropocillos cuando dichos micropocillos están rellenos;
- encerrar dicho porta-muestra y dicho depósito con dicha cubierta; y
- 35 trasladar dicha cubierta para posicionar dicho agujero sobre un micropocillo dado cuando se realizan dichas etapas de desorción blanda de analito (150) de dicho micropocillo dado.
6. El método según la reivindicación 4 o 5 que comprende además la etapa de rellenar dichos micropocillos (815) mediante un capilar (800) antes de dicha etapa de irradiar dicha muestra (110).
- 40 7. El método según la reivindicación 6, en donde dicho capilar (800) es un componente de un sistema de separación empleado para separar analito (150) dentro de dicha muestra (110) antes de dicha etapa de irradiar dicha muestra.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde dicho dispositivo analítico es un dispositivo espectroscópico.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde dicho dispositivo analítico es un espectrómetro de masas (855).
- 45 10. El método según la reivindicación 9 que comprende además la etapa de ionizar dicho analito desorbido (150) antes de dicha etapa de analizar dicho analito desorbido.
11. El método según la reivindicación 10 en donde dicha etapa de ionizar dicho analito desorbido (150) se logra usando un método de ionización seleccionado de la lista que comprende ionización de descarga en corona, ionización

de electrospray, ionización química, e ionización por emisión térmica.

12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 en donde dicha muestra (110) se posiciona de modo que dicha estela de ablación (130) es dirigida a la entrada de dicho espectrómetro de masas (855) para análisis de masas.
- 5 13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 en donde dicho analito desorbido (150) es fotoionizado dentro de una región evacuada antes del análisis de masas, dicho método comprende además las etapas de:
- posicionar dicha muestra (110) de modo que dicha estela de ablación (130) atraviesa un agujero a dicha región evacuada;
- 10 irradiar dicha estela de ablación dentro de dicha región evacuada con un haz ultravioleta de vacío que tiene una longitud de onda seleccionada para fotoionizar dicho analito desorbido (150), produciendo de ese modo analito ionizado; y
- realizar análisis de masas de dicho analito ionizado.
14. El método según la reivindicación 13 en donde dicho agujero es una entrada a dicho espectrómetro de masas (855), y dicha región evacuada está dentro de dicho espectrómetro de masas.
- 15 15. El método según la reivindicación 13 o 14 en donde una longitud de interacción entre dicho haz ultravioleta de vacío y dicha estela de ablación (130) se extienden usando una cavidad óptica formada dentro de dicha región evacuada.
16. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 en donde dicho analito desorbido (150) es fotoionizado antes del análisis de masas a través de un proceso resonante lineal, dicho método comprende además las etapas de:
- 20 irradiar dicha estela de ablación (130) con un haz fotoionizador y obtener analito ionizado, en donde dicho haz fotoionizador comprende un espectro de frecuencias y un perfil de fase para fotoionización lineal resonante de dicho analito desorbido; y
- 25 realizar análisis de masas de dicho analito ionizado.
17. El método según la reivindicación 16 en donde dicho espectro de frecuencias comprende componentes espectrales para producir absorción lineal de un fotón entre niveles adyacentes para ionizar dicho analito (150) y un perfil de fase seleccionado para proporcionar excitación secuencial de un fotón entre dichos niveles desde un primer nivel a un estado ionizado.
- 30 18. El método según la reivindicación 9, en donde dicho analito desorbido (150) es fotoionizado antes del análisis de masas a través de un proceso resonante de dos fotones, dicho método comprende además las etapas de:
- irradiar dicha estela de ablación (130) con un haz fotoionizador y obtener analito ionizado (150), en donde dicho haz fotoionizador comprende un espectro de frecuencias para excitar dicho analito a un primer estado excitado por absorción de dos fotones, conducir dicho estado excitado hasta saturación, e ionizar dicho analito excitado en un régimen lineal; y
- 35 realizar análisis de masas de dicho analito ionizado.
19. Un sistema para desorber un analito (150) desde una muestra (110), en donde la muestra comprende un componente que tiene un espectro de excitación que comprende niveles de energía vibratoria, dicho sistema comprende:
- 40 un aparato óptico para dirigir un haz óptico (100) sobre una muestra e irradiar un volumen de irradiación dentro de dicha muestra, dicho haz óptico comprende:
- un espectro de frecuencias para excitar ópticamente niveles vibratorios de un componente de dicha muestra;
- una duración de tiempo más corta que es menor que un lapso requerido para pérdida de energía más allá de dicho volumen de irradiación para difusión térmica y expansión acústica;
- 45 caracterizado por que dicho haz óptico comprende suficiente energía para supercalentar dicho componente y provocar eyección de una estela de ablación (130) desde dicho volumen de irradiación, dicha estela de ablación contiene analito desorbido (150); y
- un dispositivo analítico para realizar análisis de dicho analito desorbido.
20. El sistema según la reivindicación 19 en donde dicho dispositivo analítico es un dispositivo espectroscópico.

21. El sistema según la reivindicación 19 o 20 en donde dicho dispositivo analítico es un espectrómetro de masas (855), y en donde dicha muestra (110) se posiciona para dirigir dicha estela de ablación (130) a través de una entrada de dicho espectrómetro de masas.
- 5 22. El sistema según la reivindicación 21 en donde se seleccionan medios de ionización de la lista que comprenden un aparato de ionización de descarga en corona, aparato de ionización de electrospray, aparato de ionización química y aparato de ionización por emisión térmica.
23. El sistema según la reivindicación 21 o 22 que comprende además medios de ionización para ionizar dicha estela de ablación (130).
- 10 24. El sistema según la reivindicación 23 en donde dichos medios de ionización comprenden un segundo aparato óptico para dirigir un haz ultravioleta de vacío sobre dicha estela de ablación (130) dentro de una región evacuada, en donde dicho haz ultravioleta de vacío fotoioniza dicho analito desorbido (150).
25. El sistema según la reivindicación 24 en donde dicha región evacuada comprende una cavidad óptica para aumentar una longitud de interacción entre dicho haz ultravioleta de vacío y dicha estela de ablación (130).
- 15 26. El sistema según la reivindicación 23 en donde dichos medios de ionización comprenden un segundo aparato óptico para dirigir un haz fotoionizador sobre dicha estela de ablación (130), en donde dicho haz fotoionizador comprende un espectro de frecuencias y un perfil de fase para fotoionización lineal resonante de dicho analito desorbido (150).
- 20 27. El sistema según la reivindicación 26 en donde dicho espectro de frecuencias comprende componentes espectrales para producir absorción lineal de un fotón entre niveles adyacentes para ionizar dicho analito (150) y un perfil de fase seleccionado para proporcionar excitación secuencial de un fotón entre dichos niveles desde un primer nivel a un estado ionizado.
28. El sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 27 que comprende además un micropocillo (815) formado en un sustrato (575) para soportar dicha muestra (110), en donde dicho sustrato es transparente a dicho haz óptico (100).
- 25 29. El sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 27 que comprende además una distribución de micropocillos (815) soportados en un porta-muestra (650) y un aparato capilar (800) para llenar dichos micropocillos con una pluralidad de muestras (110).

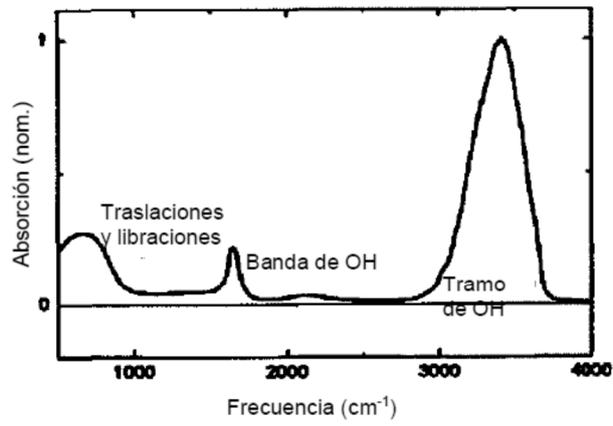


Figura 1a)

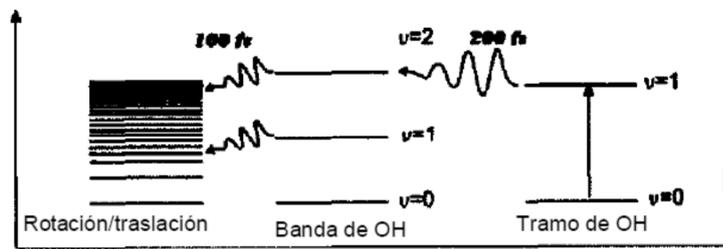


Figura 1b)

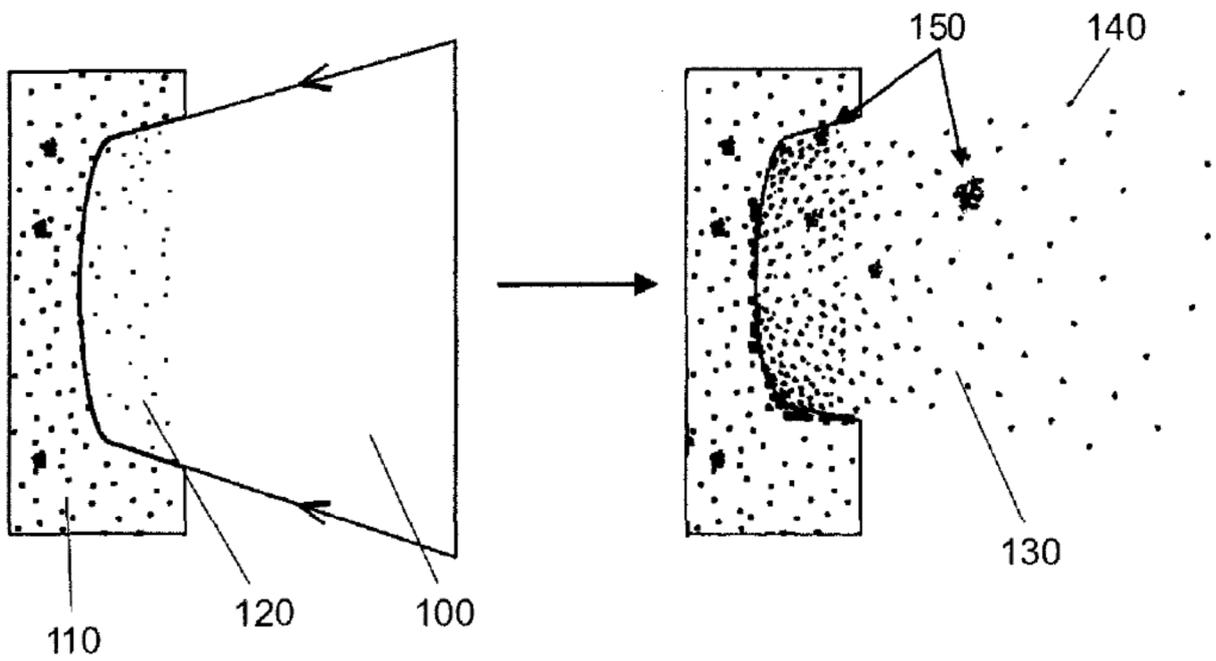


Figura 1c)

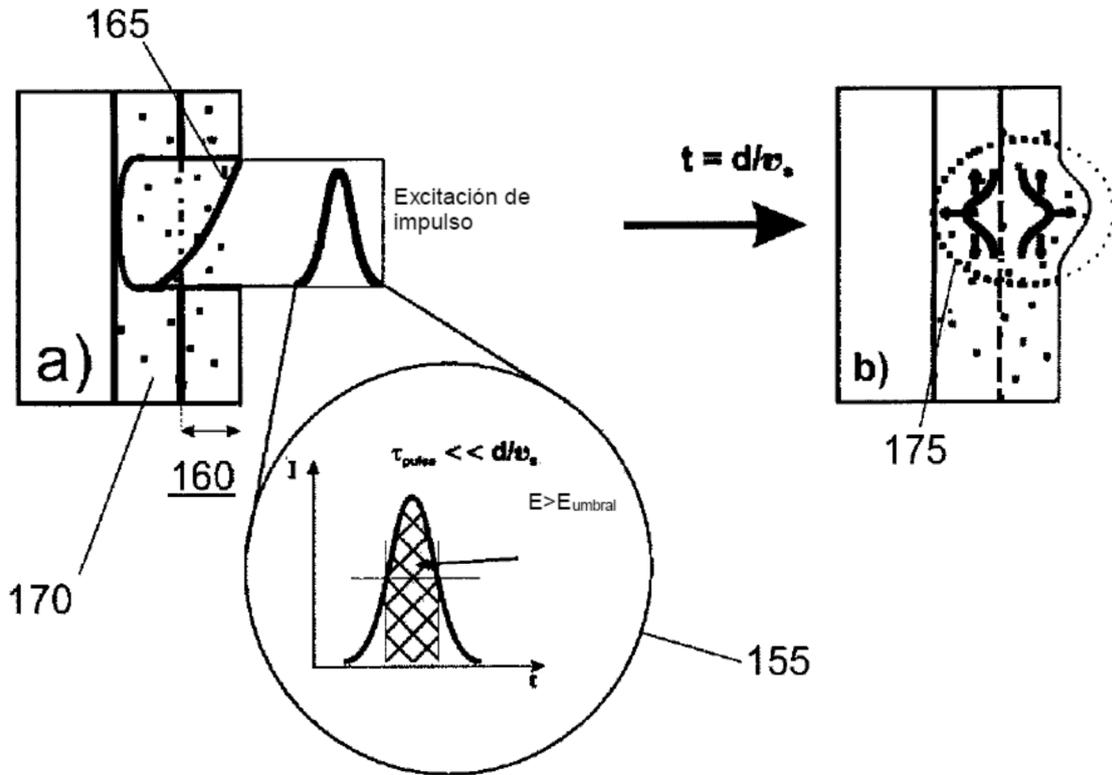


Figura 2

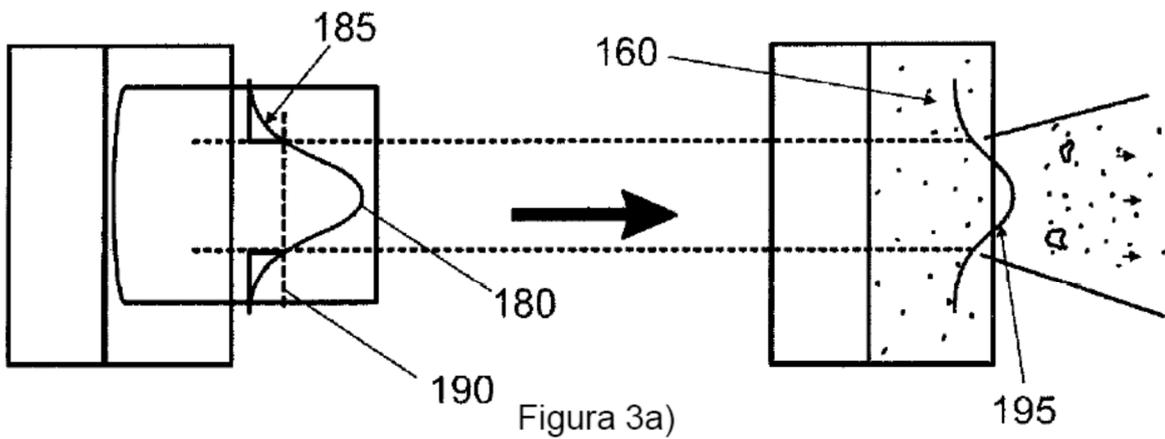


Figura 3a)

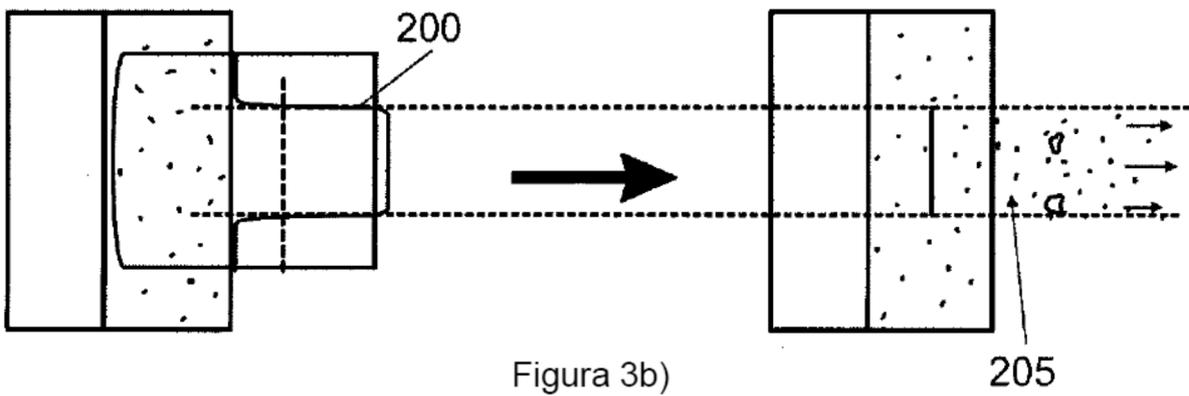


Figura 3b)

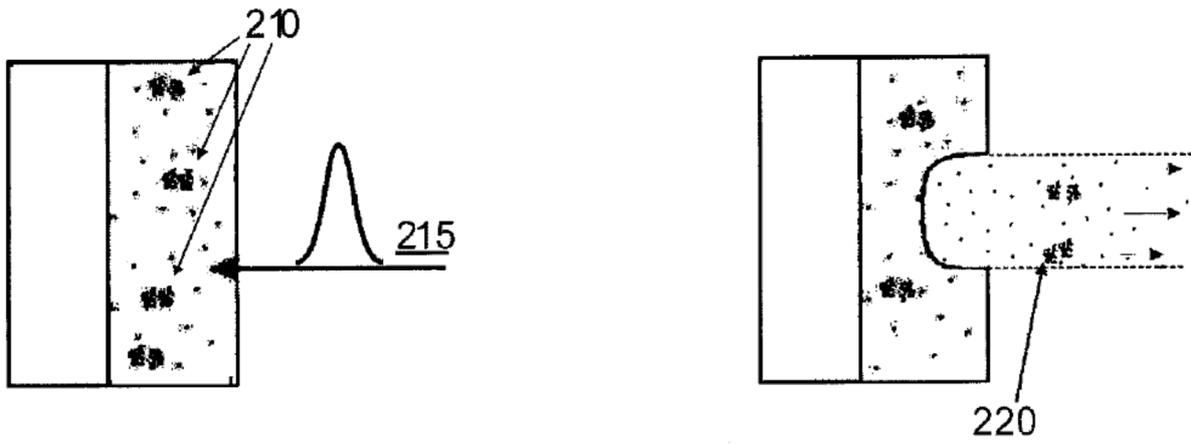


Figura 4a)

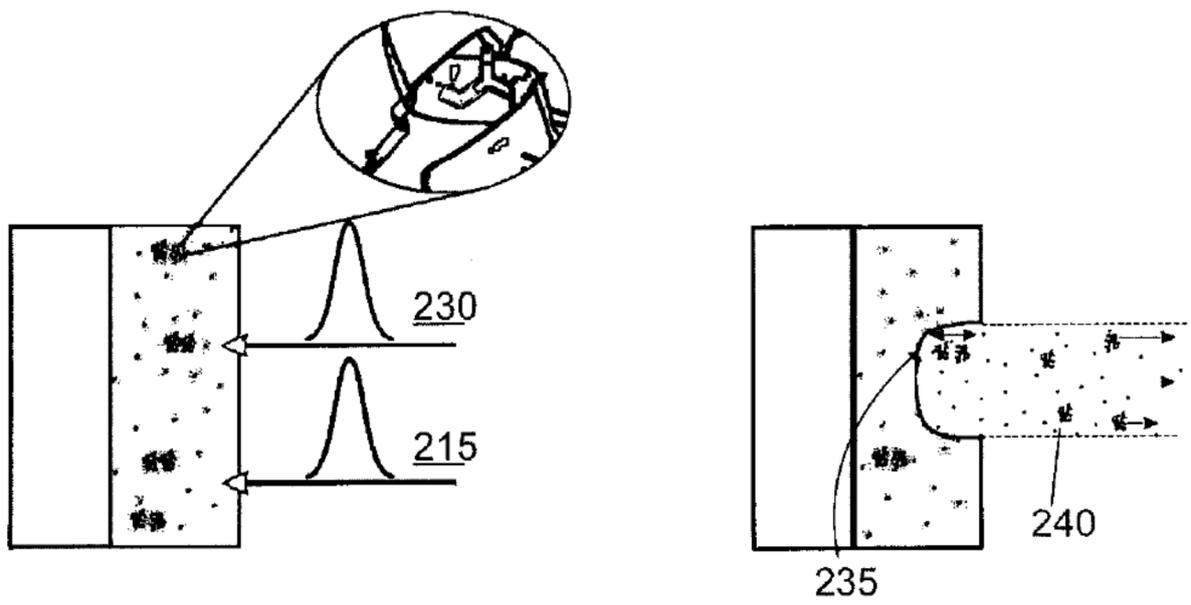


Figura 4b)

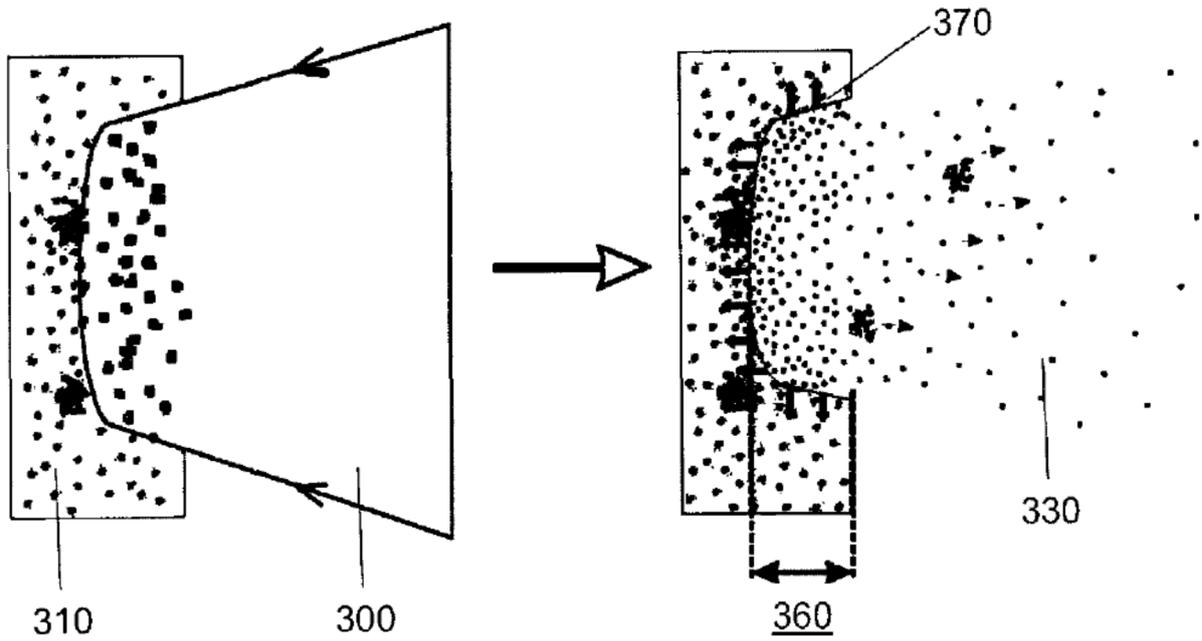


Figura 5a)

Figura 5b)

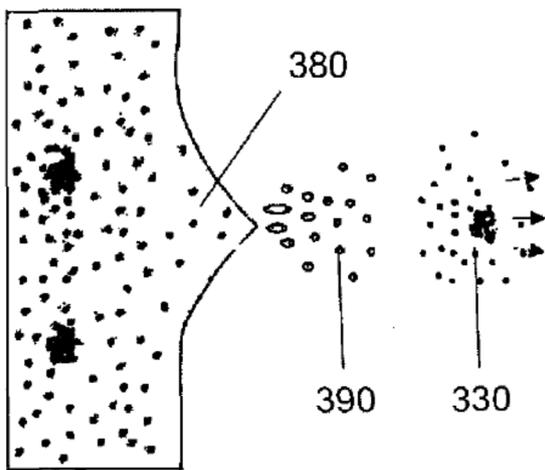


Figura 5d)

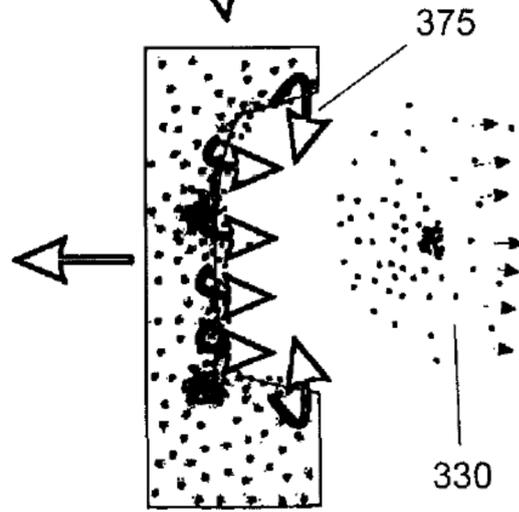


Figura 5c)

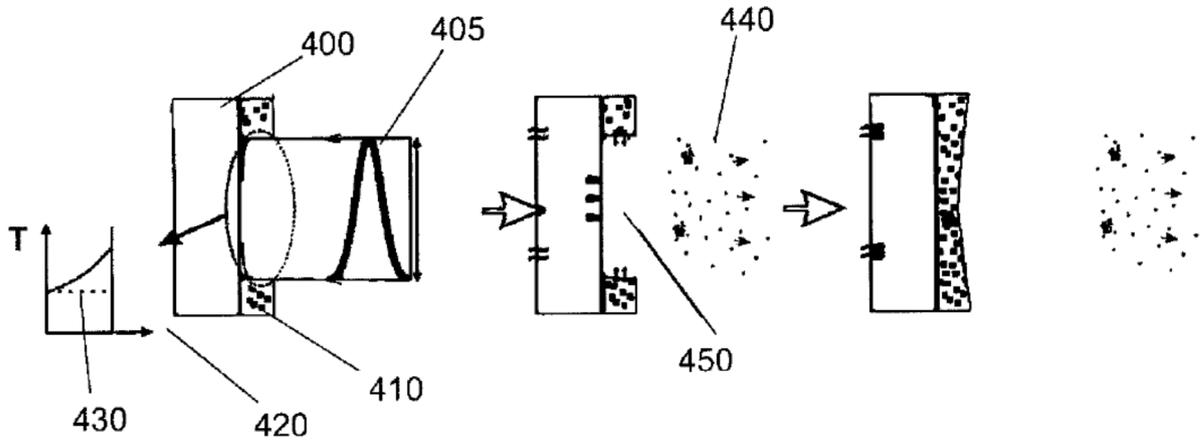


Figura 6a)

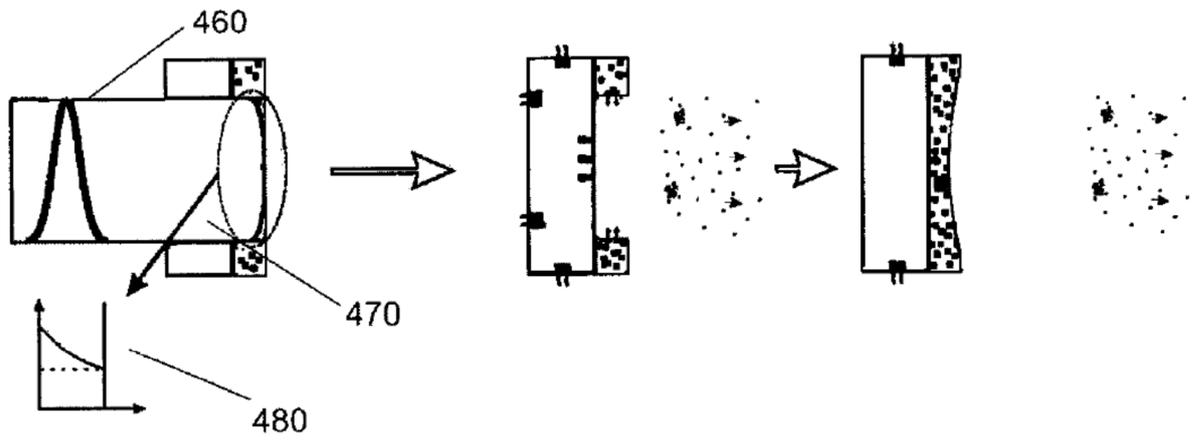


Figura 6b)

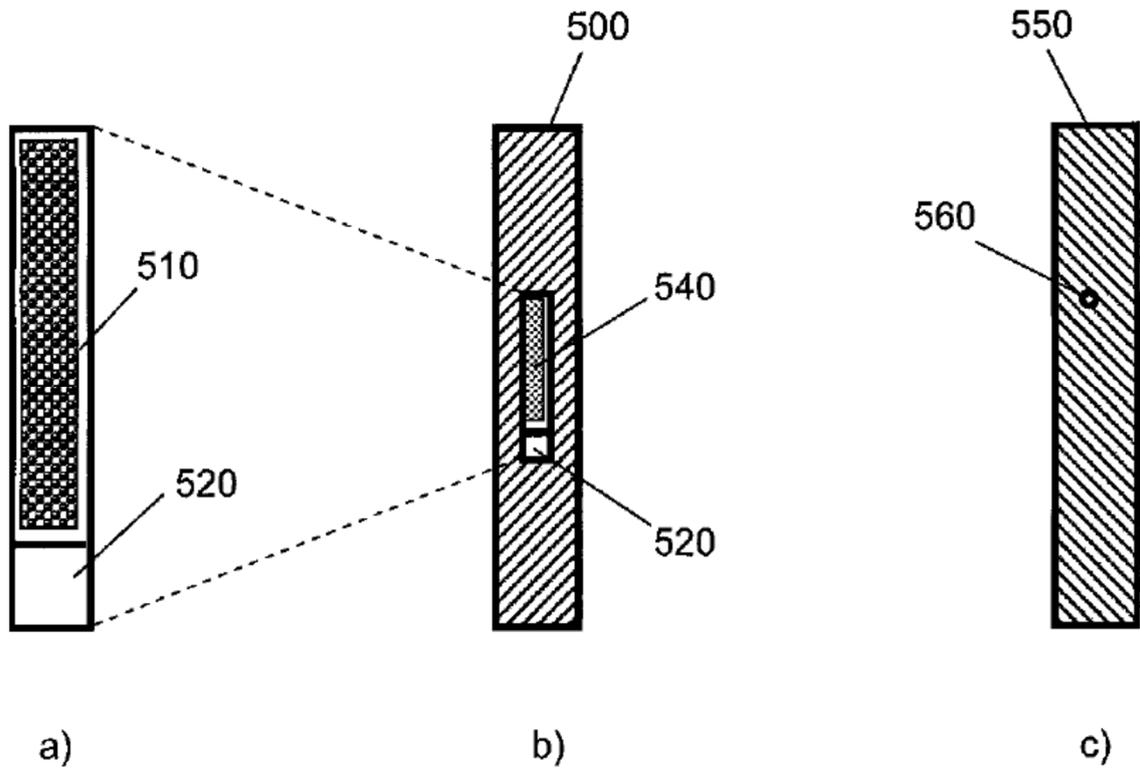


Figura 7

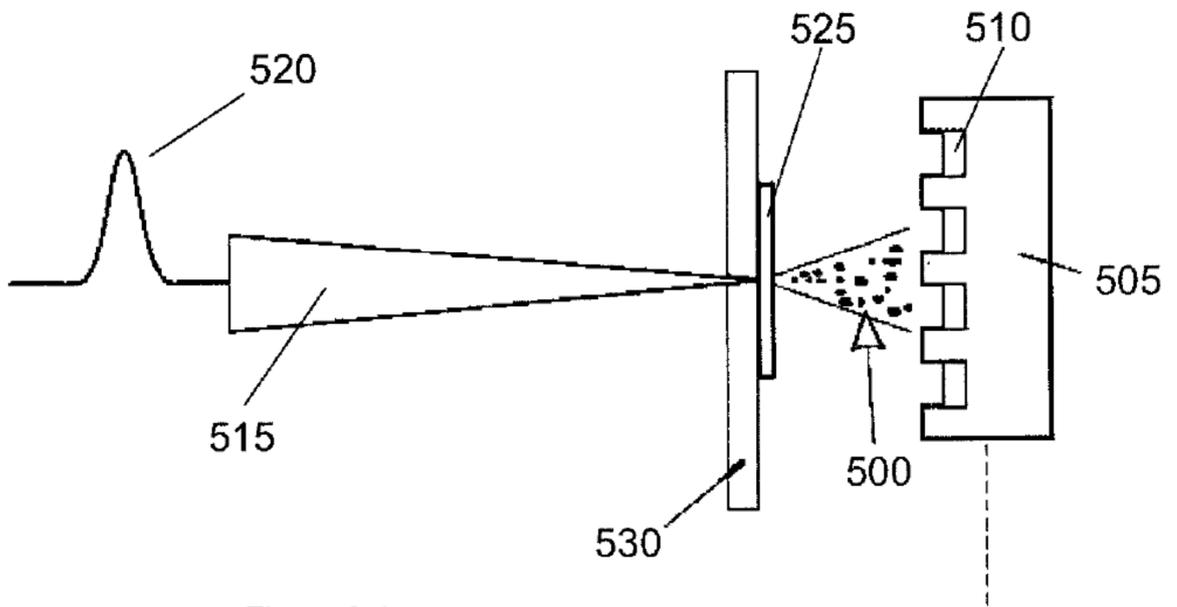


Figura 8a)

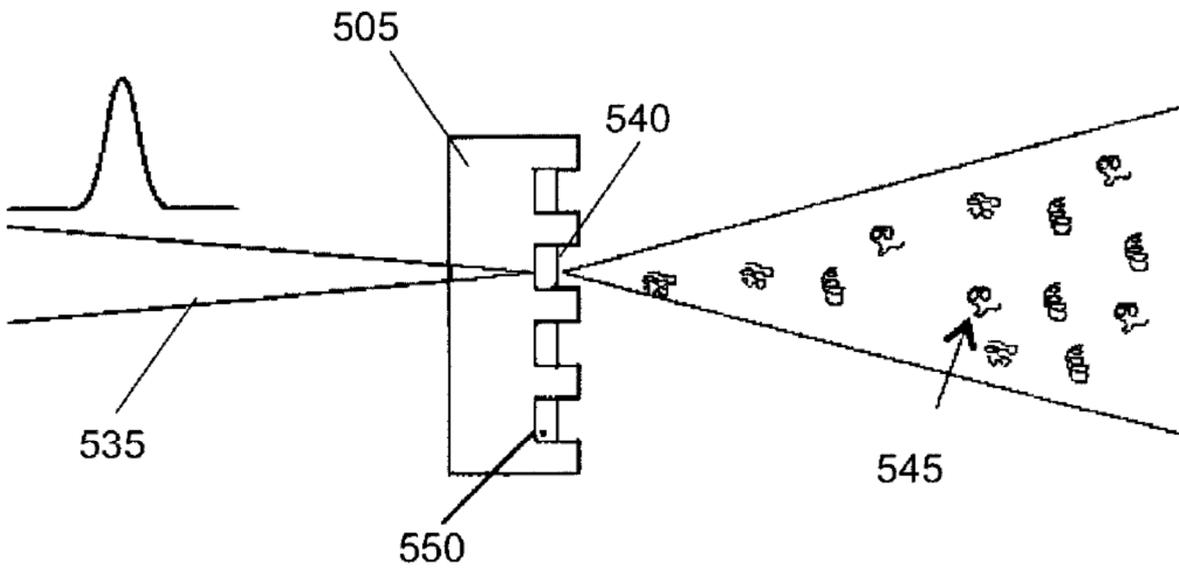


Figura 8b)

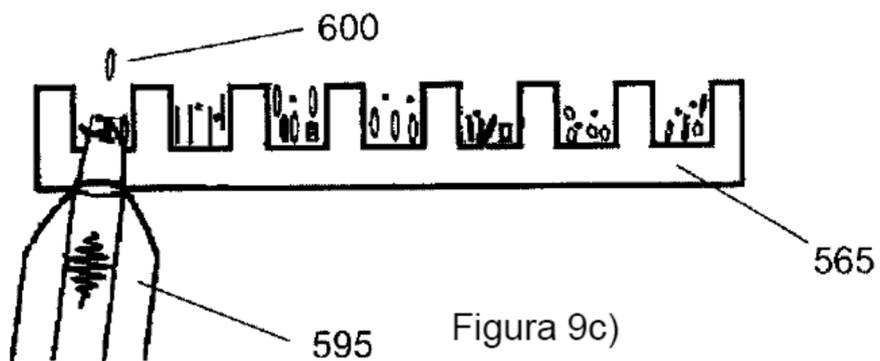
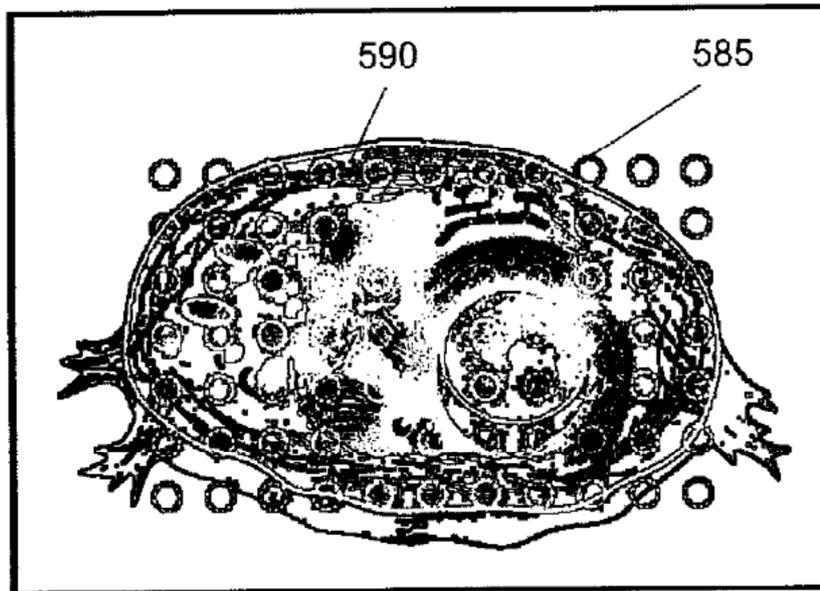
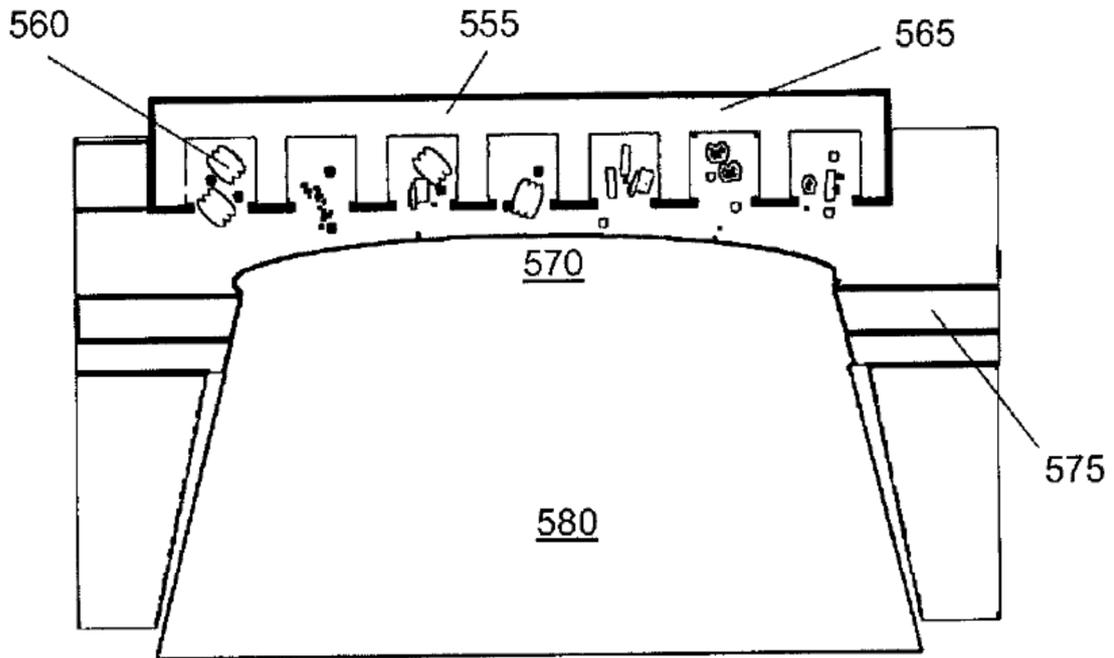


Figura 9c)

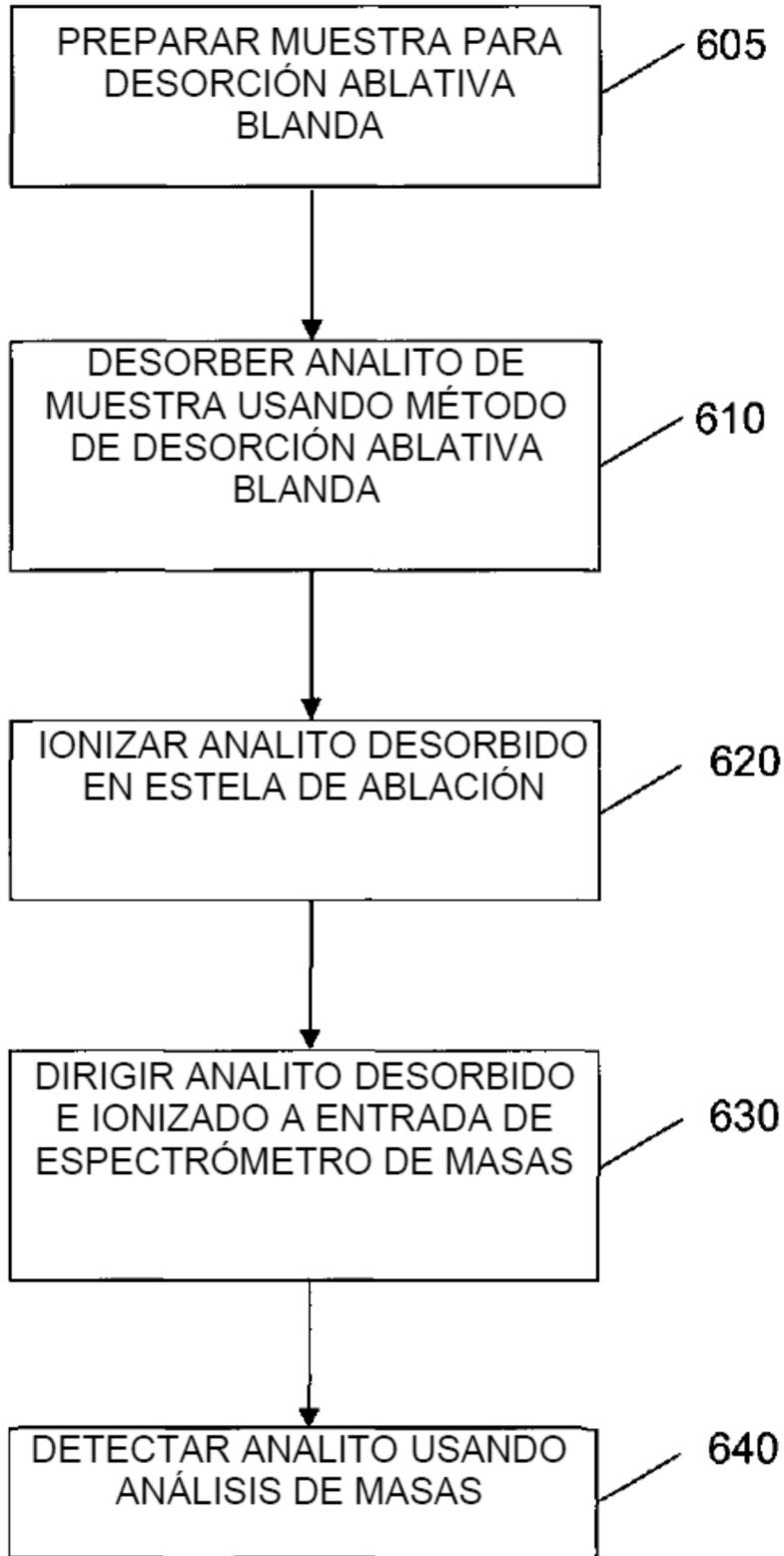


Figura 10

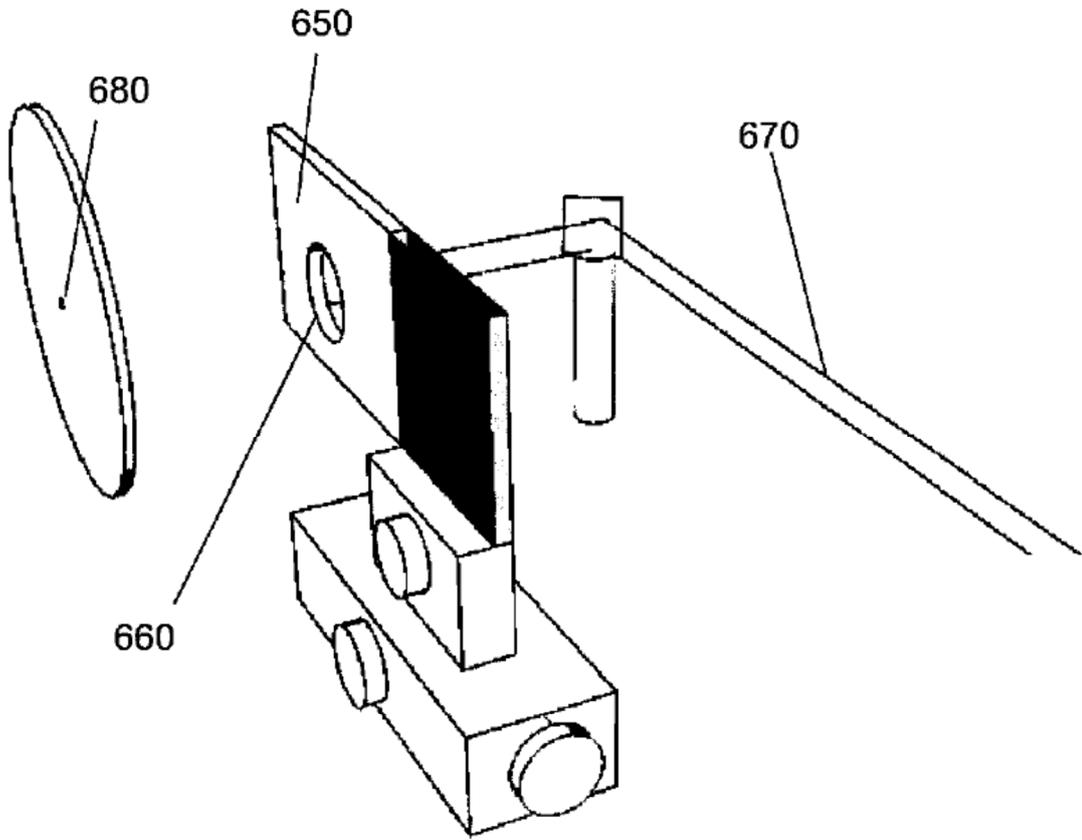


Figura 11

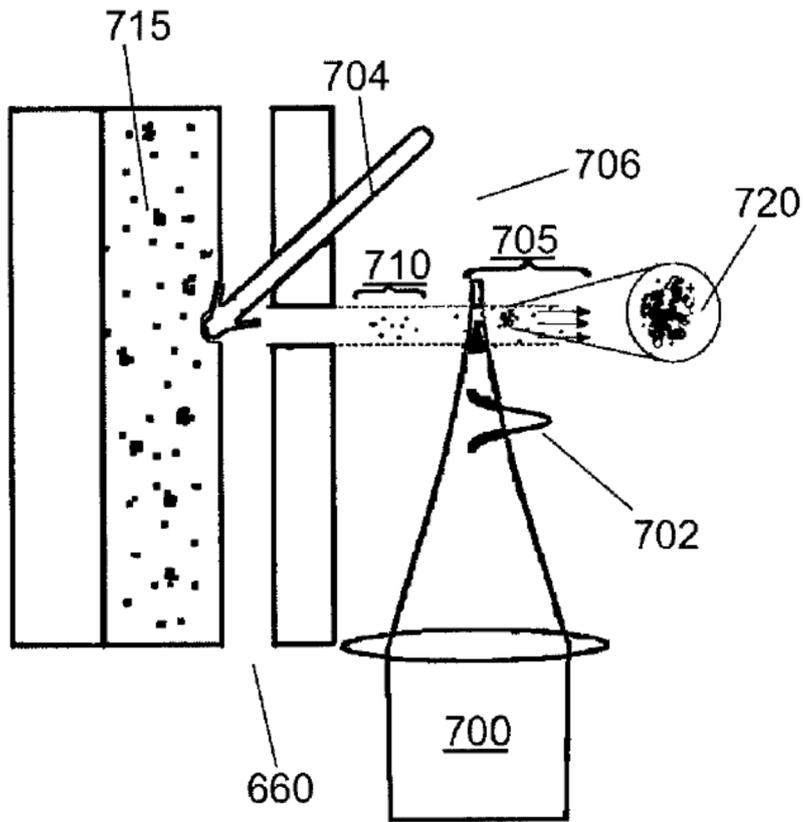


Figura 12a)

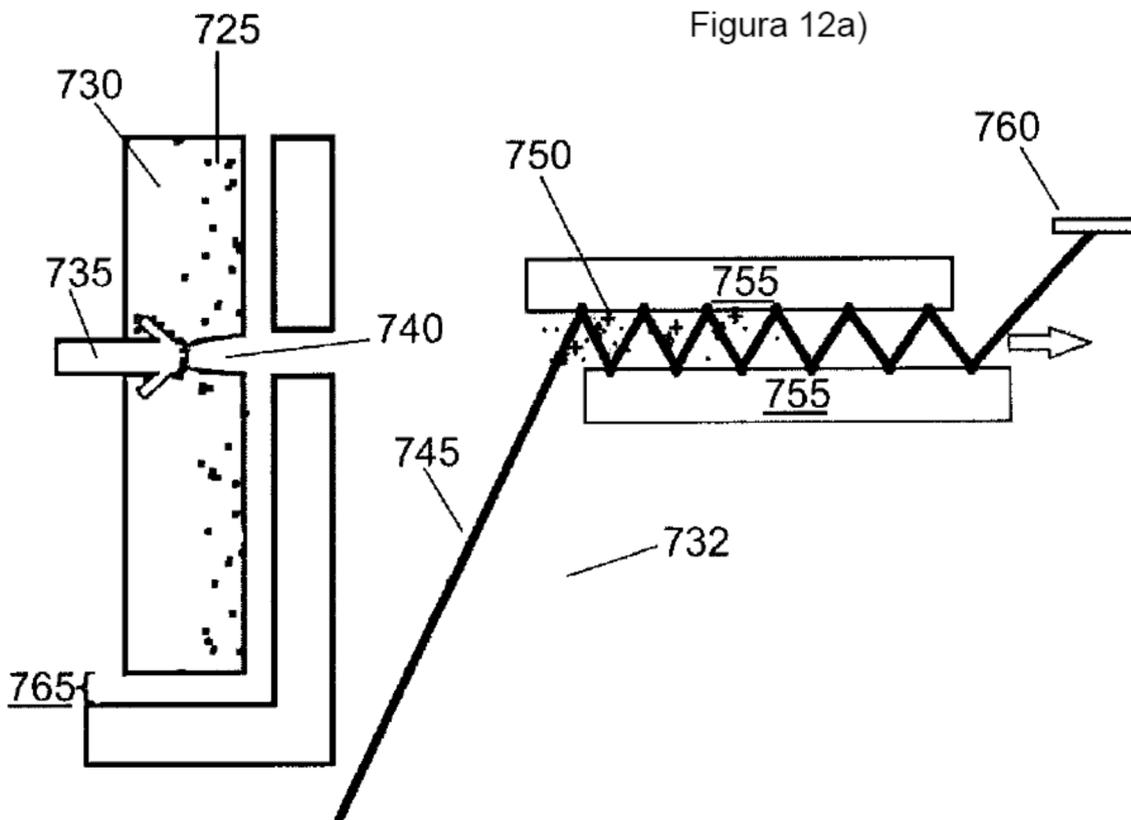


Figura 12b)

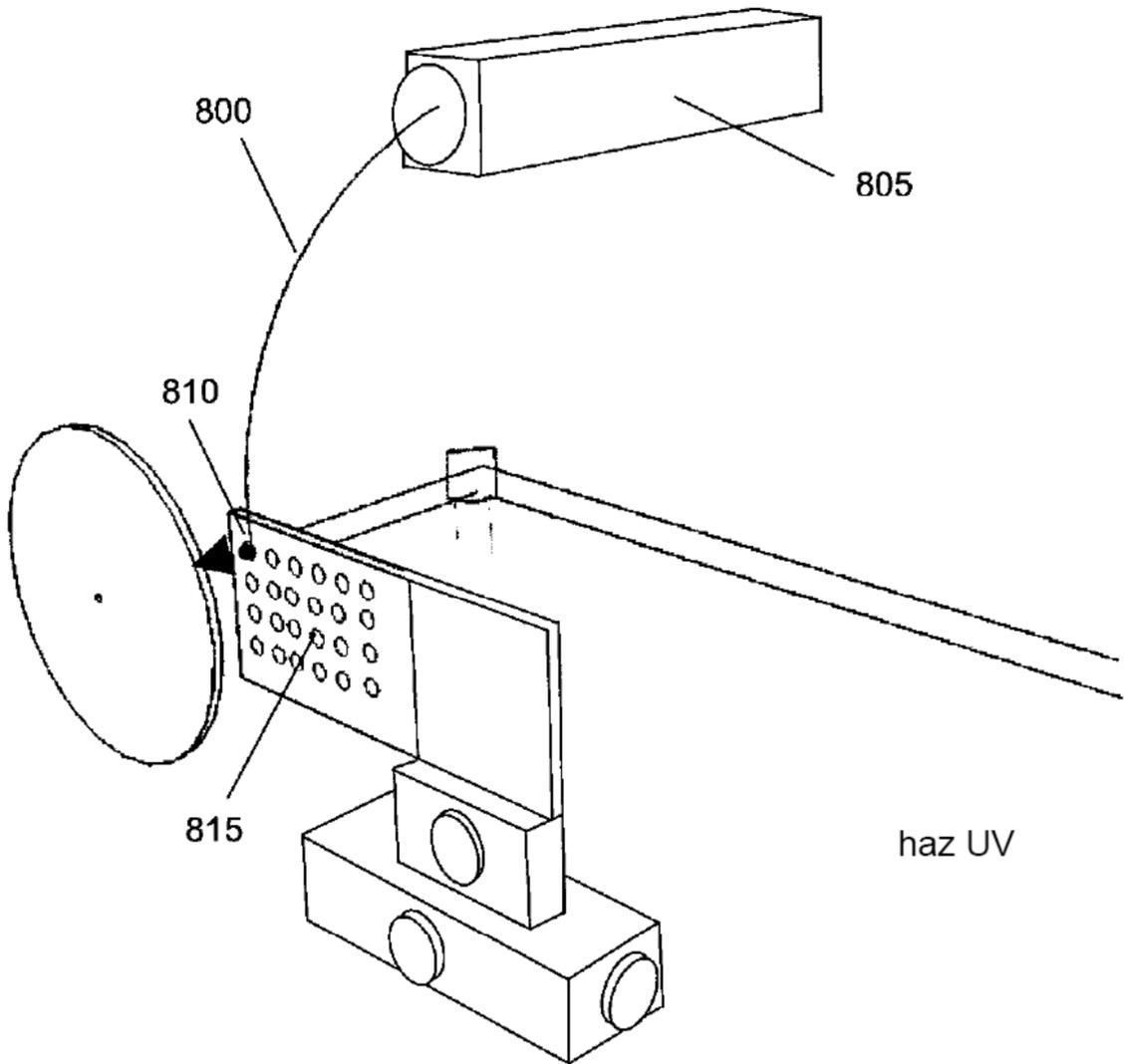
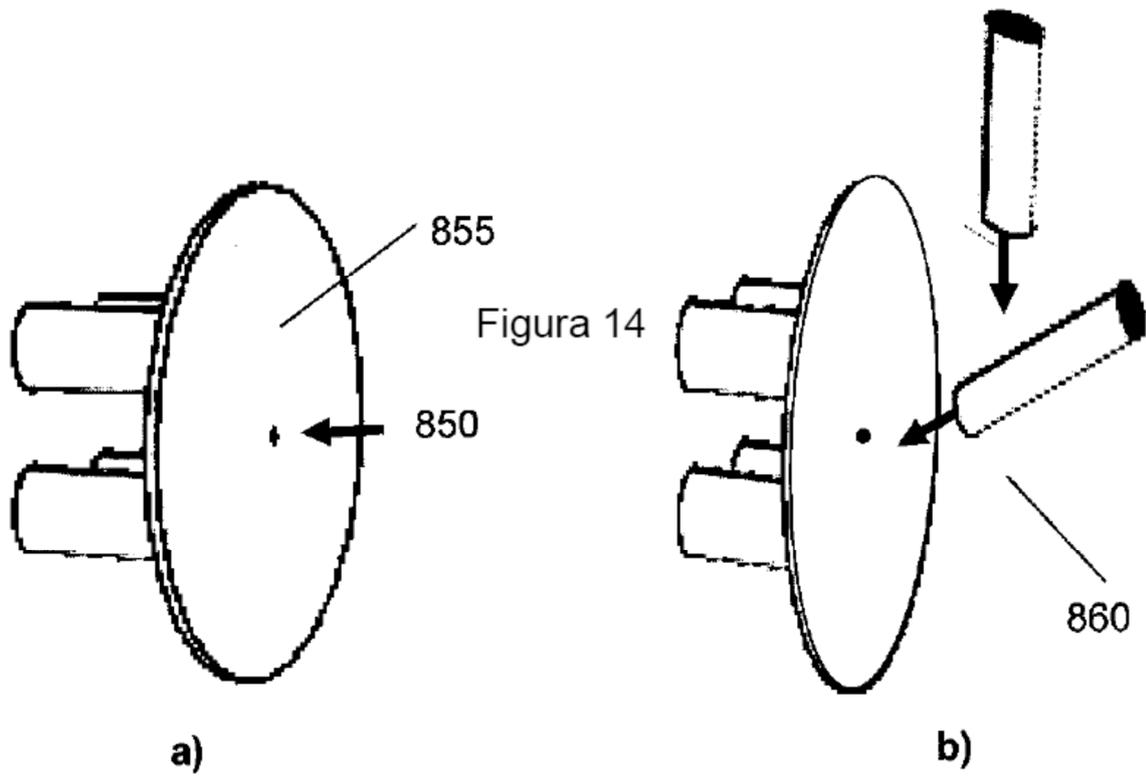


Figura 13



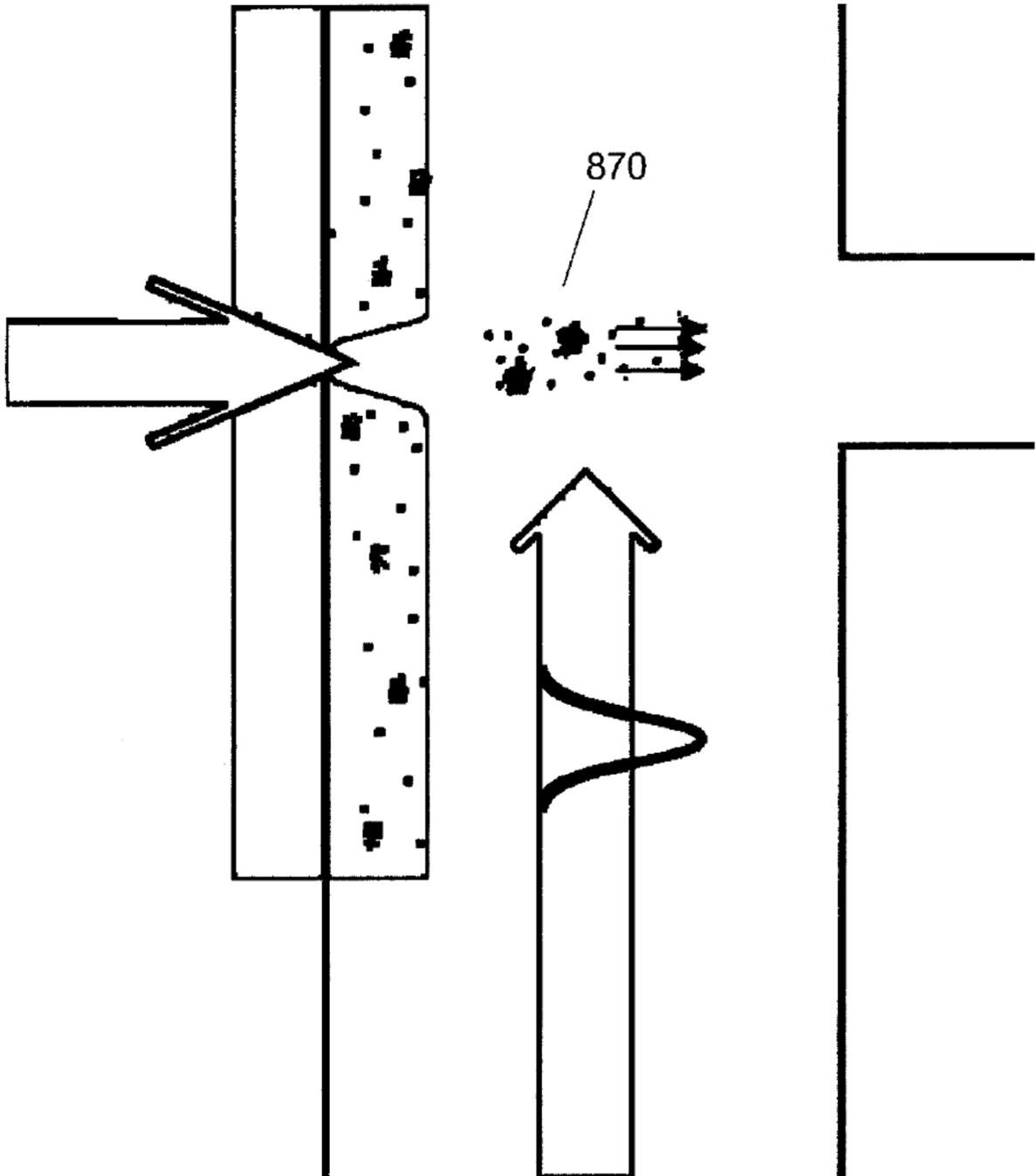


Figura 15

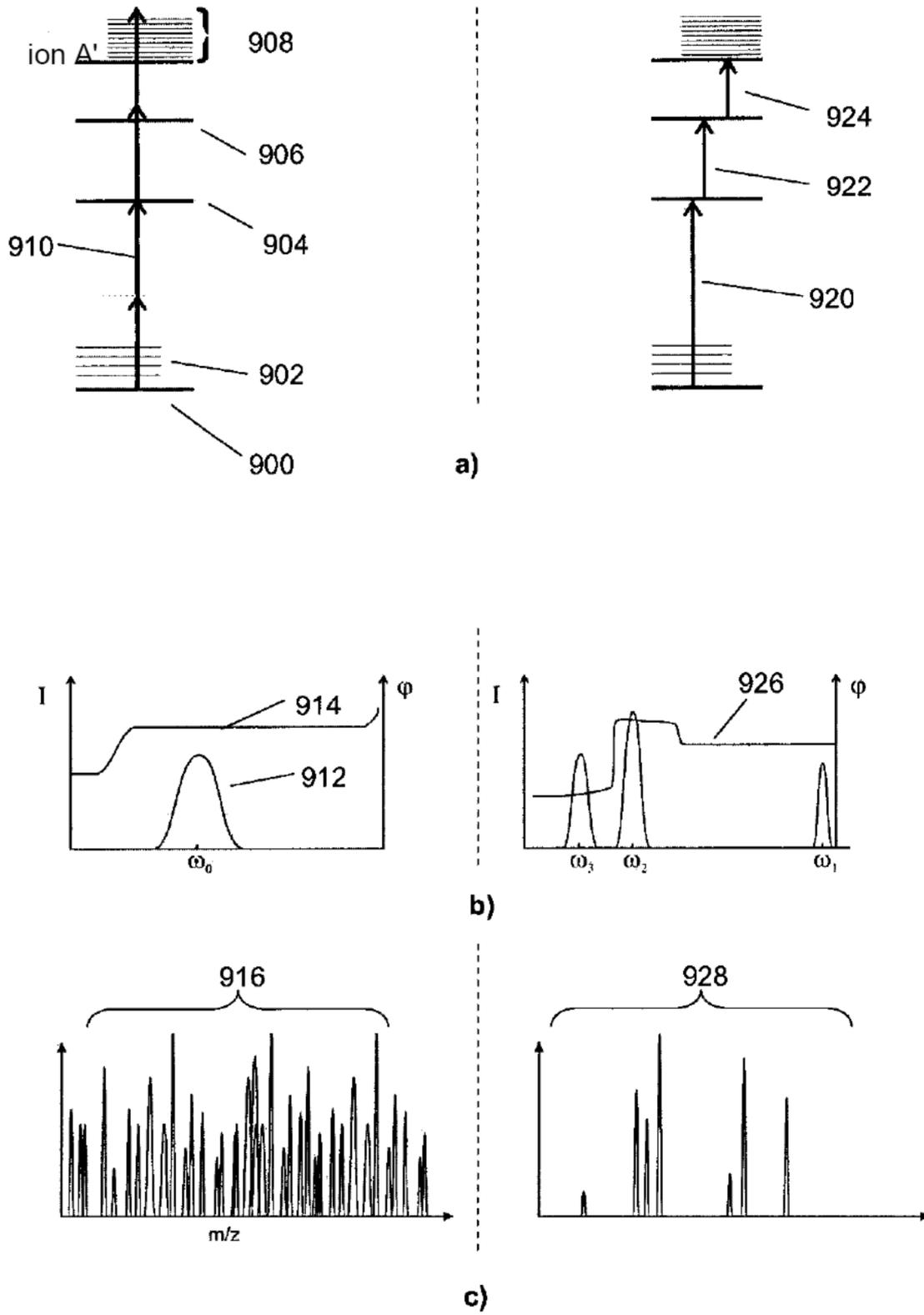


Figura 16

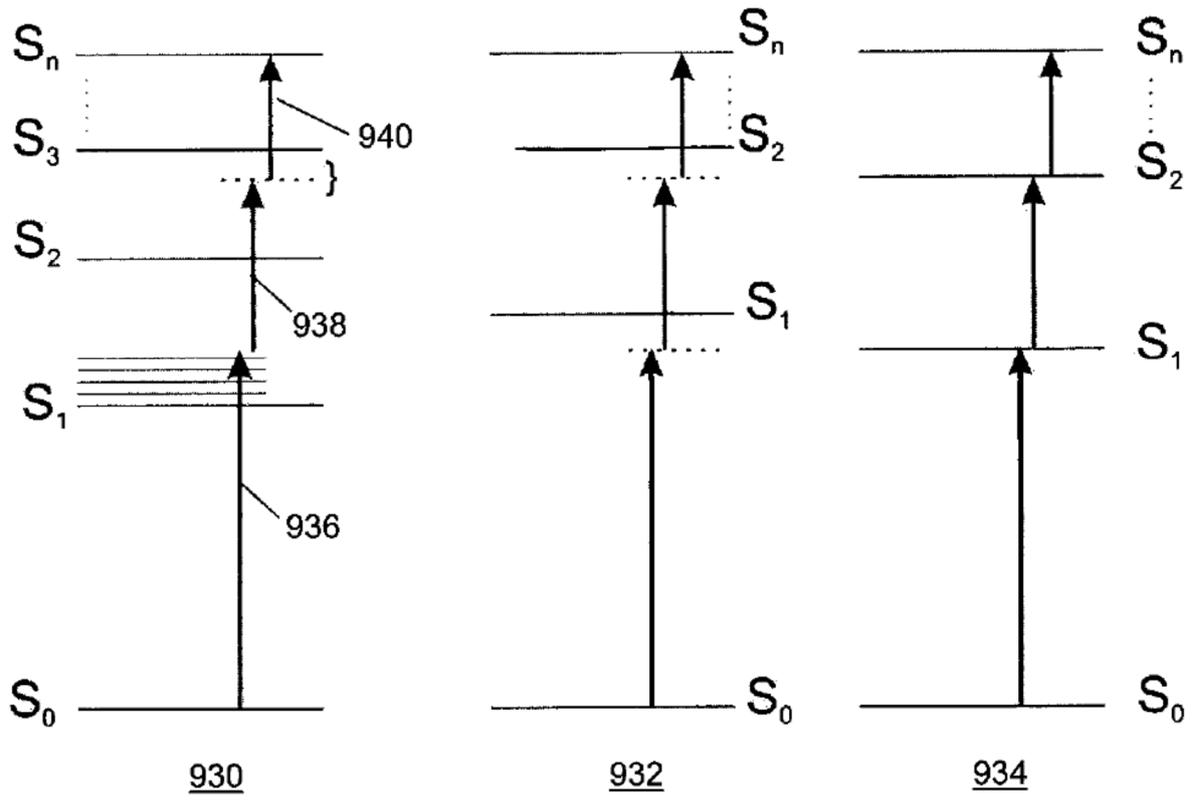


Figura 17

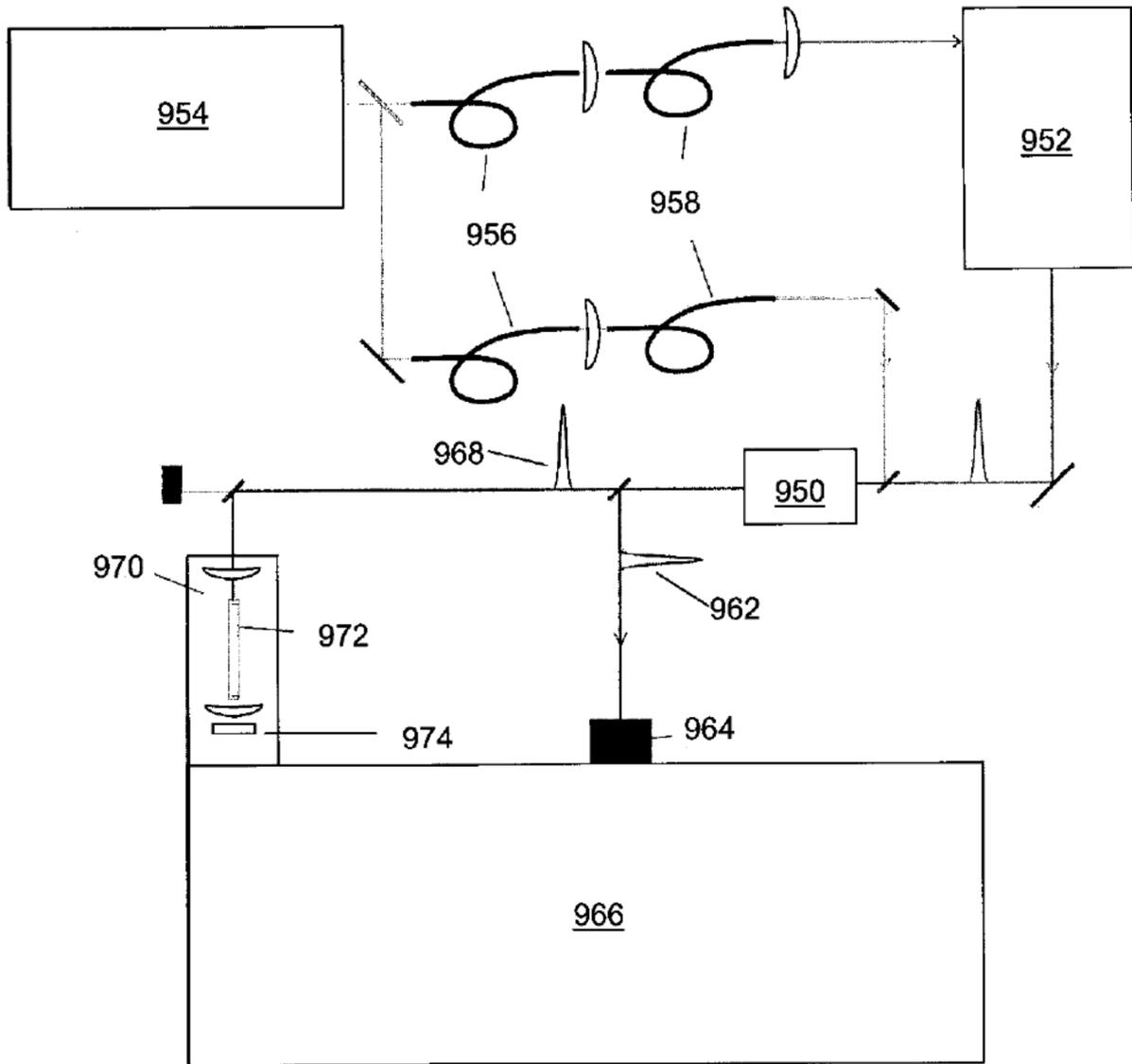


Figura 18