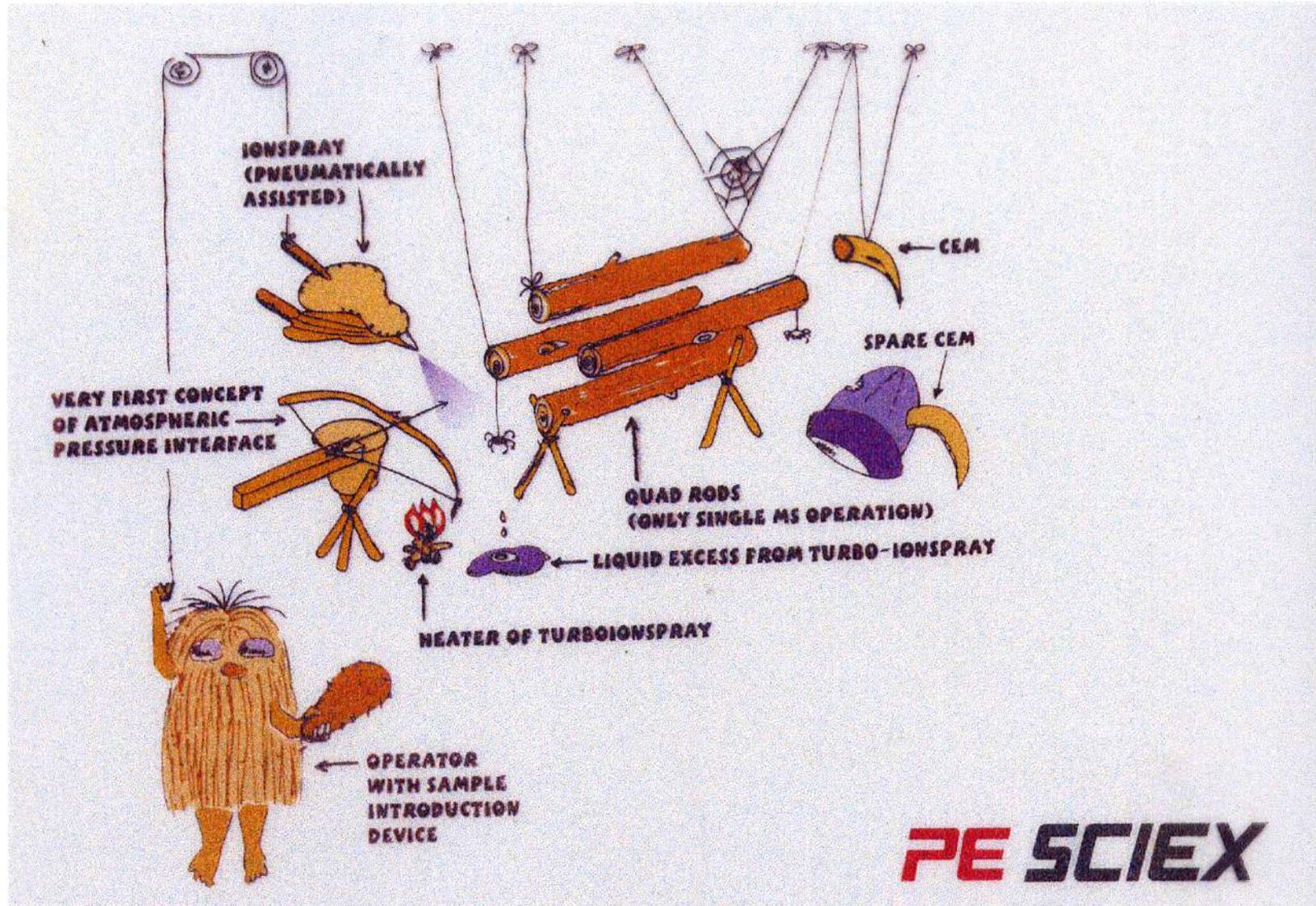
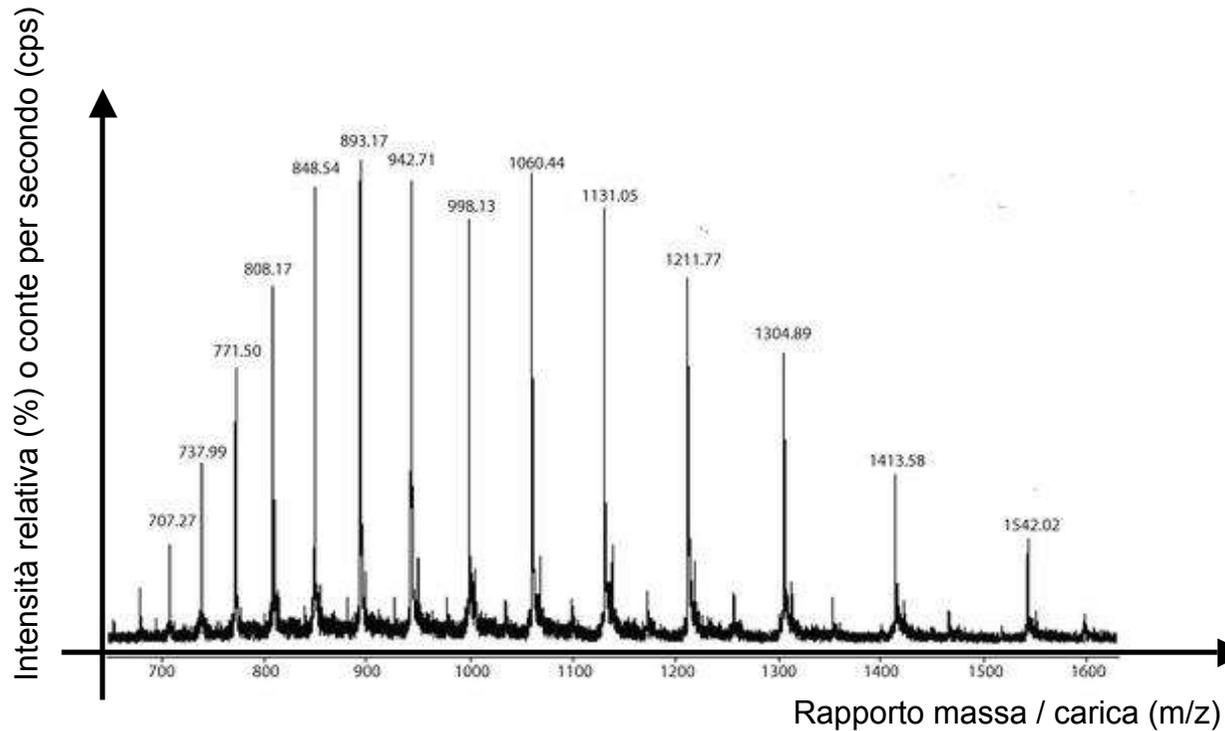


Spettrometria di Massa



Analisi di spettrometria di massa => Spettro di massa



NB: il dato che otteniamo è il rapporto massa / carica (m/z) non la massa! Per risalire alla massa sarà necessario ricavare la carica del segnale m/z

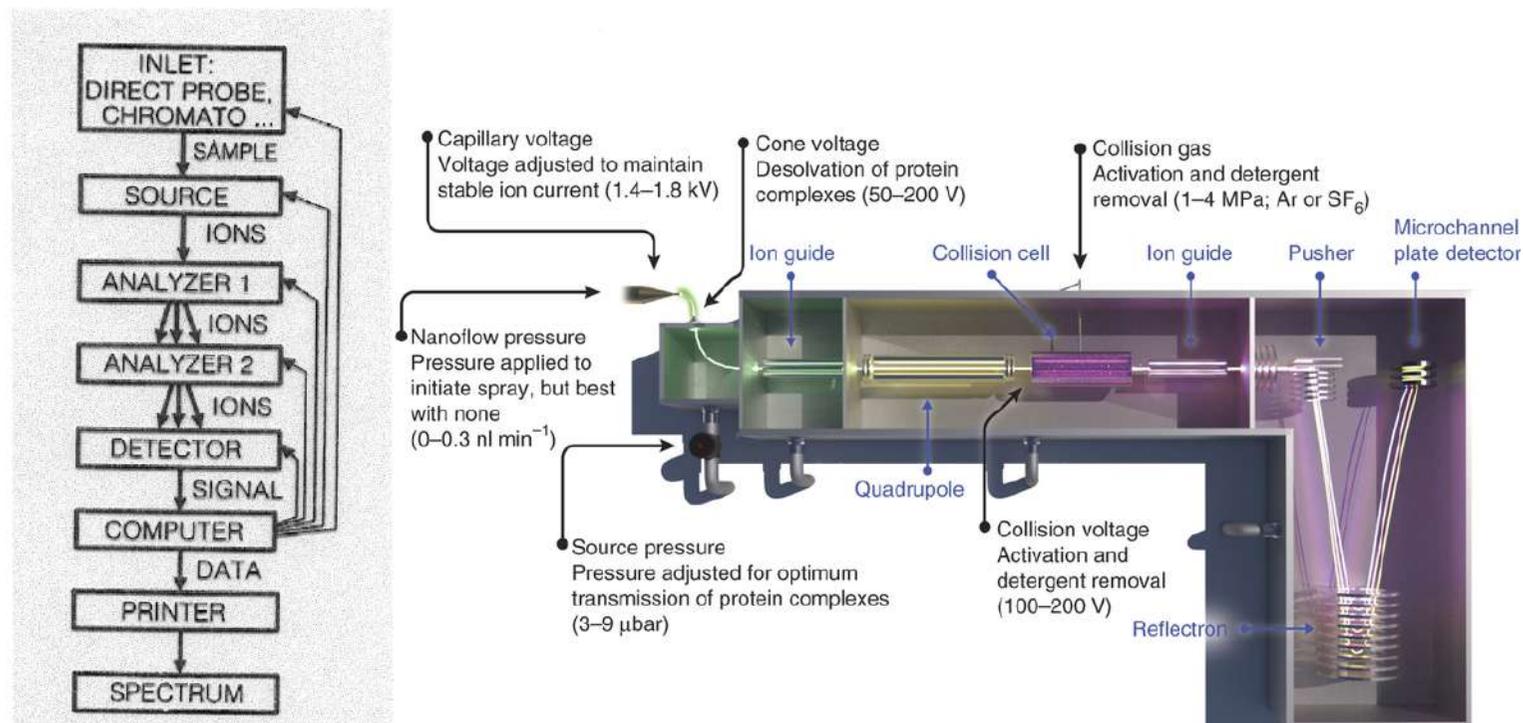
=>

metodo di deconvoluzione o lettura della distribuzione isotopica (vedasi oltre)

Spettrometro di massa

Cosa deve fare:

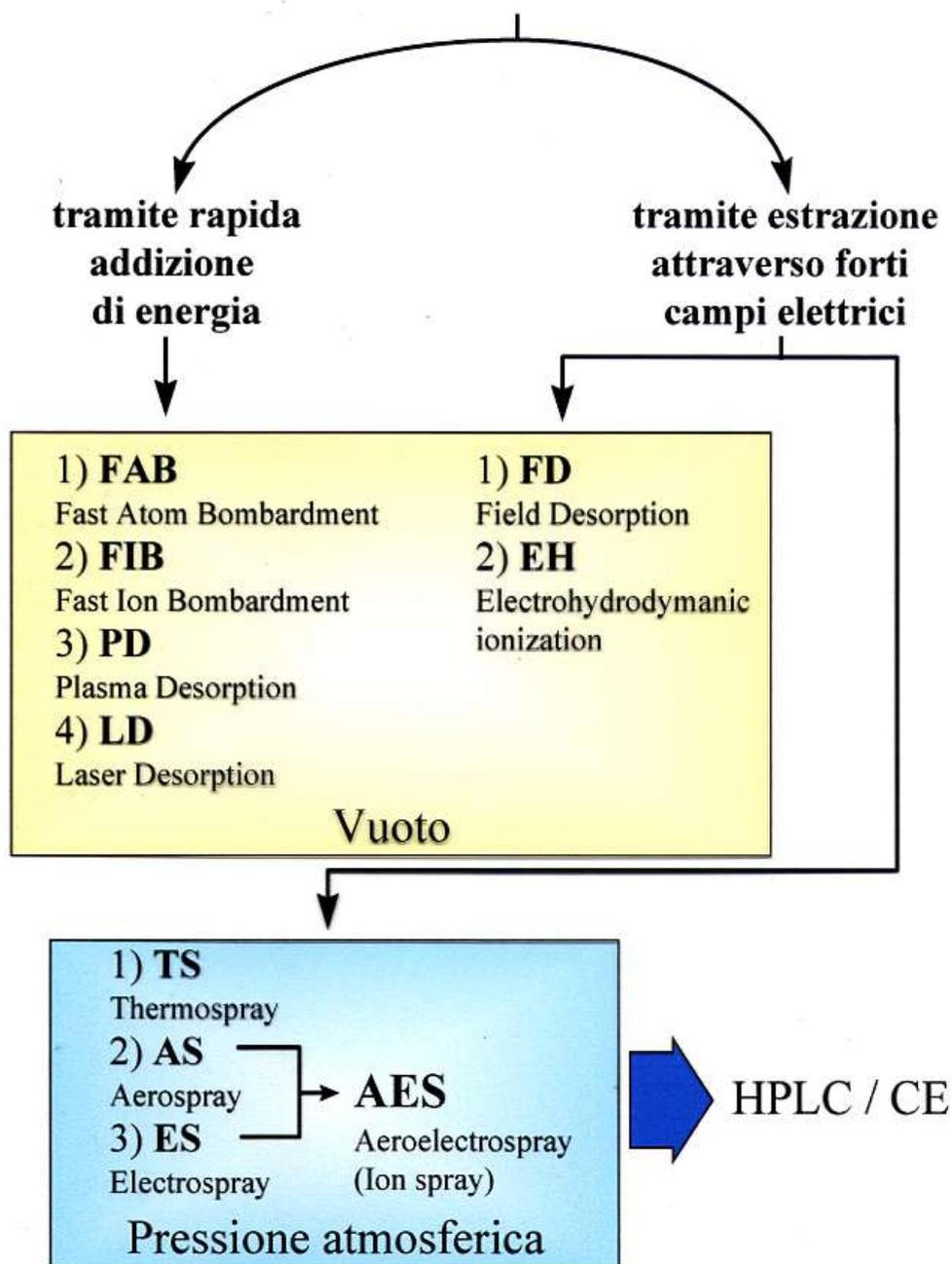
- produrre ioni dal campione che si vuole analizzare (**sorgente di ioni**)
- separare gli ioni in base al loro rapporto massa/carica (m/z) (**analizzatore**)
- avere la possibilità di frammentare gli ioni in modo controllato al fine di ottenere informazioni strutturali sul campione (**secondo analizzatore**)
- rilevare gli ioni e fornire indicazioni circa la loro abbondanza (**rilevatore**)
- processare i dati acquisiti (**sistema di gestione dei dati**)



Cammino medio libero

Necessità di operare in condizioni di **pressione estremamente bassa** (alto vuoto); la presenza di molecole lungo il cammino dello ione dalla sorgente al rilevatore comporta un' elevata probabilità di effettuare collisioni che portano a perdita dello ione (diminuzione dell'efficienza del sistema) e alla sua frammentazione (prodotti secondari). Pressioni operative: $4/5 \times 10^{-5}$ torr.

Metodi di ionizzazione



The Nobel Prize in Chemistry for 2002

Fenn's contribution – hovering through spraying

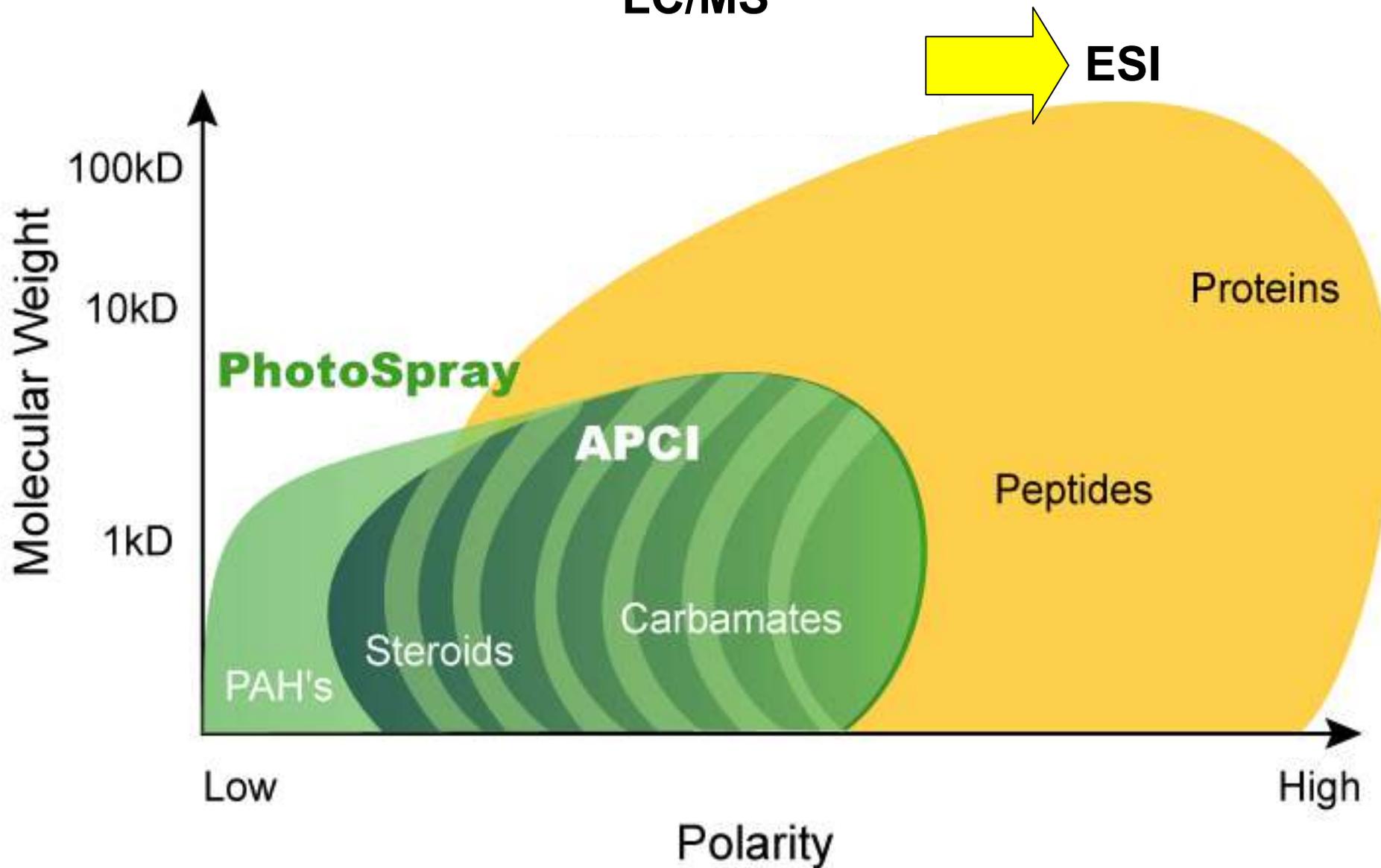
During **1988** John B. Fenn published two articles that were to mean a breakthrough for mass spectrometry with "electrospray" for macromolecules. In the first, studies of polyethylene glycol molecules of unknown mass showed that the method could handle large molecule masses with high charges. The second publication reported the use of the method on medium-sized whole proteins as well. The release of ions is achieved by spraying the sample using an electrical field so that charged droplets are formed. As the water gradually evaporates from these droplets, freely hovering "stark naked" protein molecules remain. The method came to be called electrospray ionisation, **ESI**.

Tanaka's contribution – hovering through blasting

At the same time exciting things were happening in another part of the world. At the Japanese Shimadzu instrument company in Kyoto, a young Japanese engineer, Koichi Tanaka, reported an entirely different technique for the first critical stage. At a symposium in **1987** and a year later in print, Tanaka showed that the protein molecules could be ionised using soft laser desorption (SLD). A laser pulse strikes the sample which, unlike in the spray method, is in a solid or viscous phase. When the sample takes up the energy from the laser pulse it is "blasted" into small bits. The molecules let go of one another, released as intact hovering molecule ions with low charge which are then accelerated by an electrical field and detected as described above by recording their time of flight. Tanaka was the first to demonstrate the applicability of laser technology to biological macromolecules. The principle is fundamental for many of today's powerful laser desorption methods, particularly the one abbreviated **MALDI** (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation) but also SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation) and DIOS (Direct Ionisation on Silicon).

Metodiche di ionizzazione a pressione atmosferica
direttamente accoppiabili ad sistemi LC

LC/MS

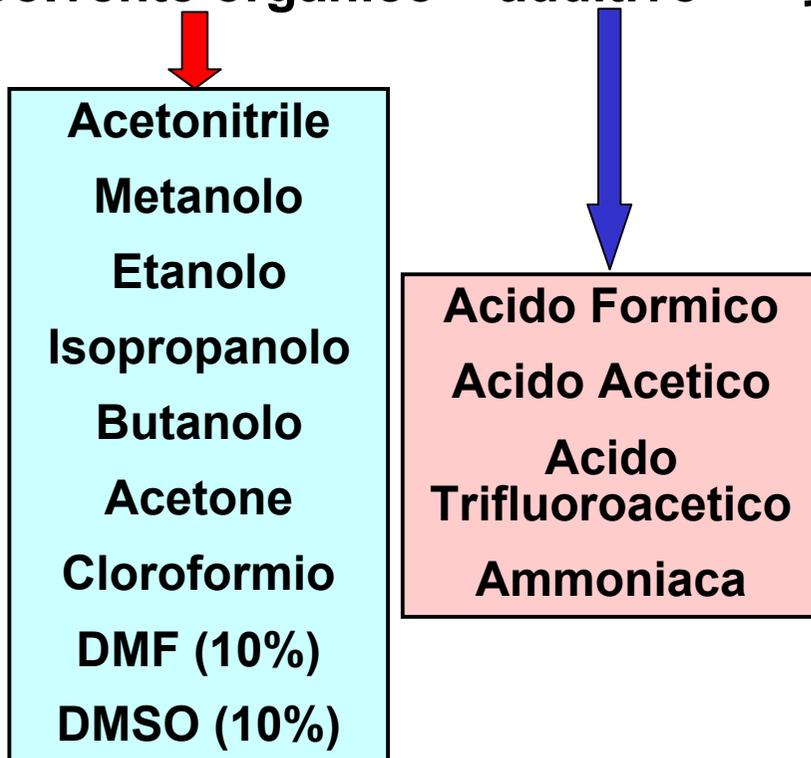


ElectroSpray Ionization (ESI)

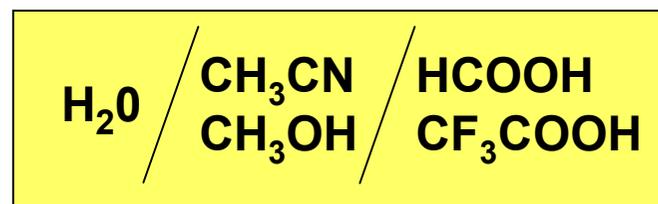
PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

ANALITA
+
H₂O / Solvente organico + additivo

Condizioni in cui il mio campione si deve trovare
per poter essere sottoposto a ESI



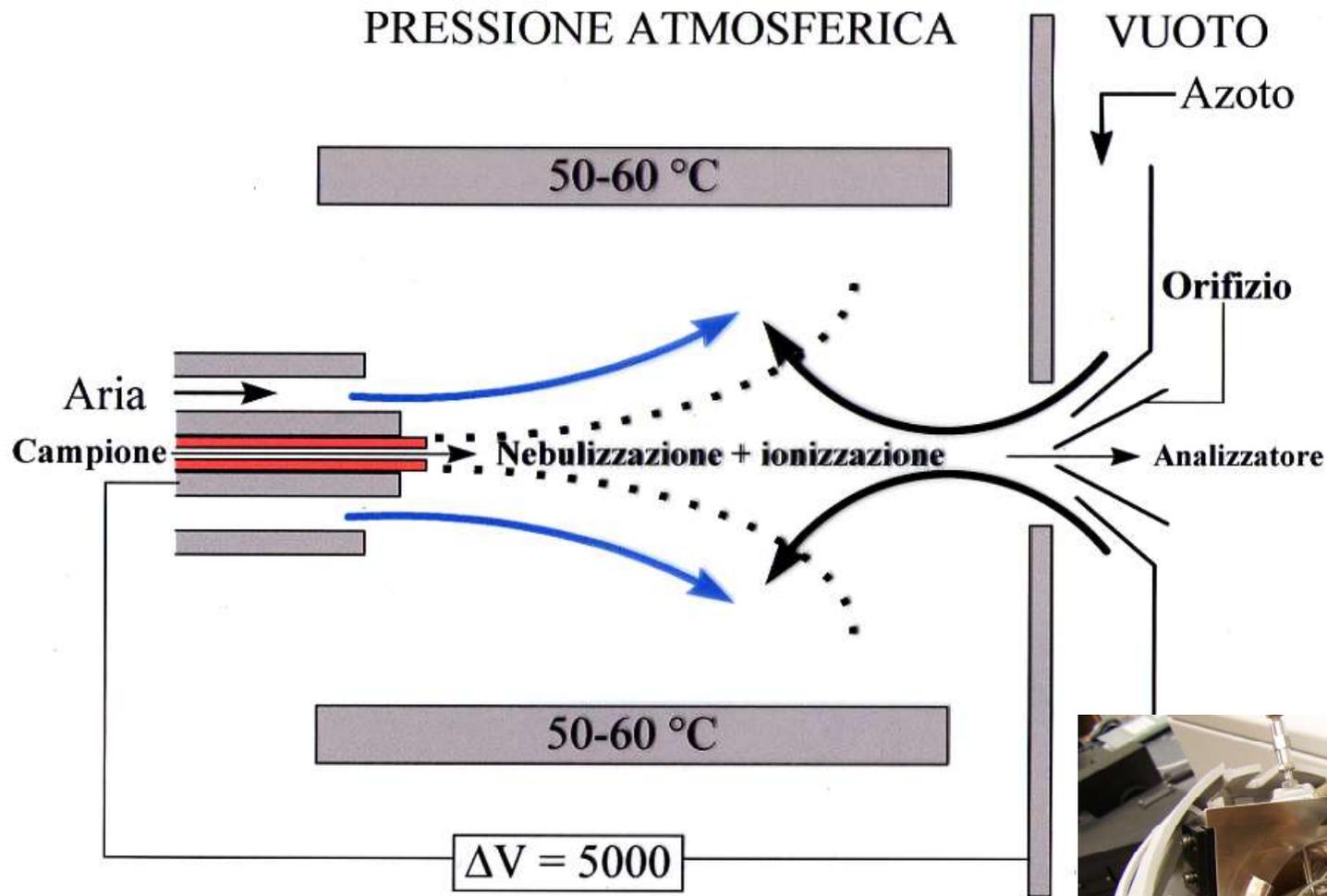
NB: queste sono condizioni tipiche per una RP-HPLC, quindi questo significa che ciò che eluisce da una colonna di tipo RP può essere inviato direttamente ad uno spettrometro di massa con interfaccia ESI => analisi LC/MS



NB: Incompatibilità con tamponi non volatili (ad esempio fosfato, citrato, ...) poiché formano dei residui secchi all'entrata del campione nello strumento



ElectroSpray Ionization (ESI)

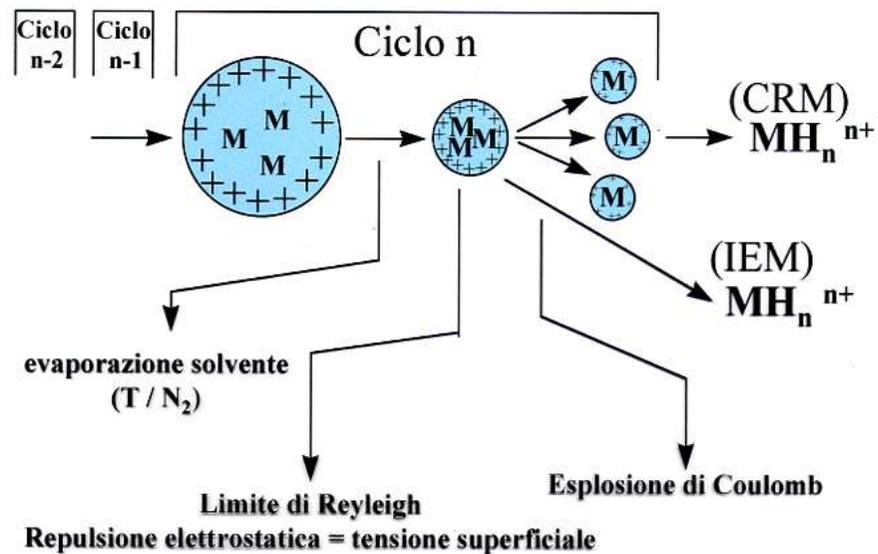
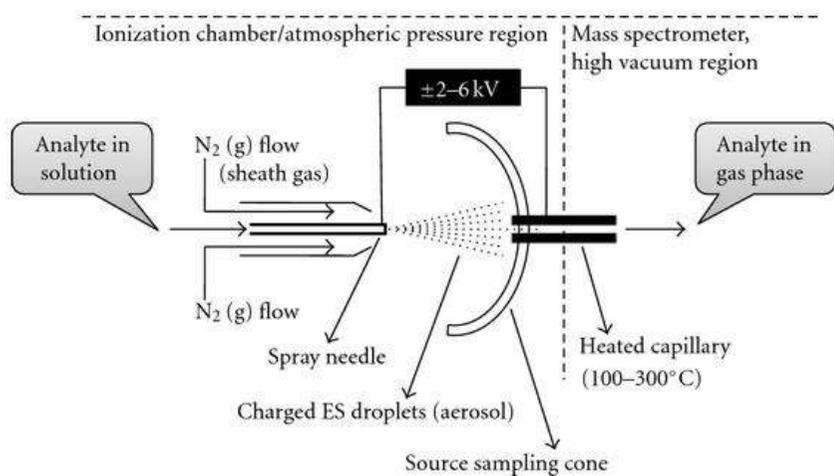


Schema di un interfaccia di tipo ESI

Sorgente ESI dal vivo (geometria ortogonale)



ElectroSpray Ionization (ESI)

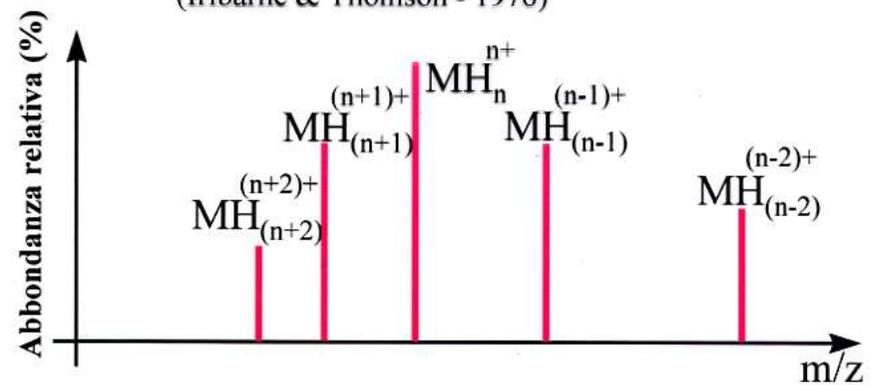


1) CRM: Charged Residue Model

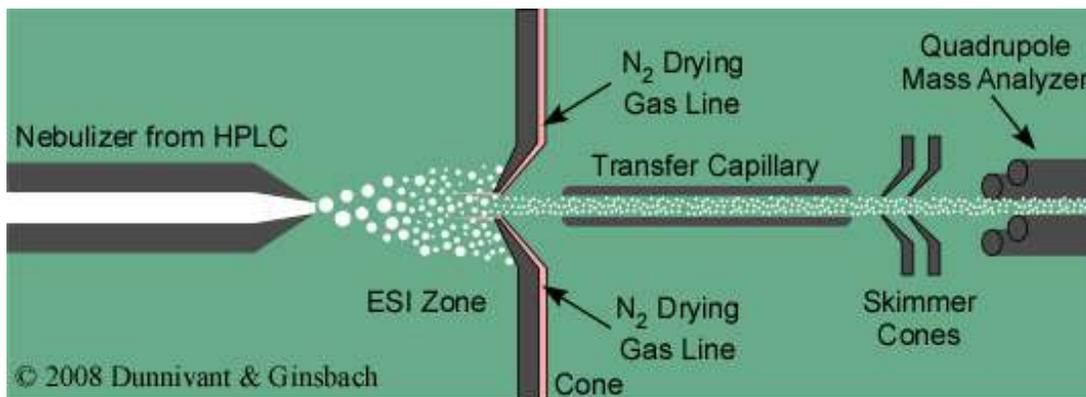
(Malcolm Dole - 1969)

2) IEM: Ion Evaporation Model

(Iribarne & Thomson - 1976)

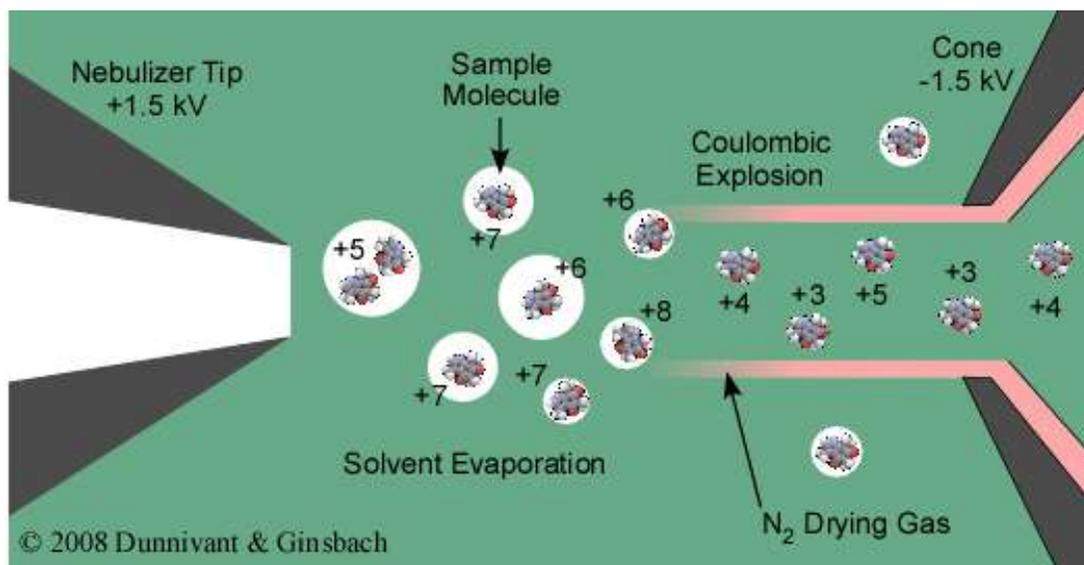


ElectroSpray Ionization (ESI)



Electrospray Ionization (ESI)

Questa è una metodica per la formazione di ioni in fase gassosa a partire da biomolecole (ma non solo). Il campione, sciolto in un opportuno liquido (miscela acqua/solvente organico + additivo), viene immesso in un ago (nebulizzatore) con un determinato flusso. Coassialmente fluisce un getto di aria nella medesima direzione che favorisce la formazione di uno “**spray**”. Il liquido che emerge dalla punta dell’ago risente di una ddp applicata tra la punta dell’ago stessa e l’entrata dello strumento (orifizio). Questo fa sì che sulle gocce dello spray si generi una **selezione di carica**. A causa della temperatura (T) e di un flusso di gas controcorrente la goccia che contiene le molecole subisce un processo di **evaporazione** che la porta a diminuire le sue dimensioni fino al punto in cui la **tensione superficiale** della goccia (forze che mantengono intatta la goccia stessa) è uguagliata dalla **repulsione elettrostatica** delle cariche (**limite di Reyligh**). A questo punto o la goccia esplose (**esplosione di Coulomb**) portando alla formazione di ulteriori gocce più piccole ma nelle quali la repulsione elettrostatica si è alleviata (**CRC model**) oppure una molecola carica positivamente viene espulsa (**IE model**). L’evaporazione del solvente continua ad avvenire (**n cicli**) e in tal modo alla fine ciò che si ottiene è la molecola proteica carica in fase gassosa.



Da notare che per flussi molto bassi (di tipo nano-HPLC, ovvero circa 200 nL/min) si opera in modalità di “puro electrospray”, nel senso che non viene utilizzata l’aria/gas coassiale al flusso di campione emergente dall’ago. **Nella modalità nESI si ha la maggior efficienza di ionizzazione => analisi ad alta sensibilità!**

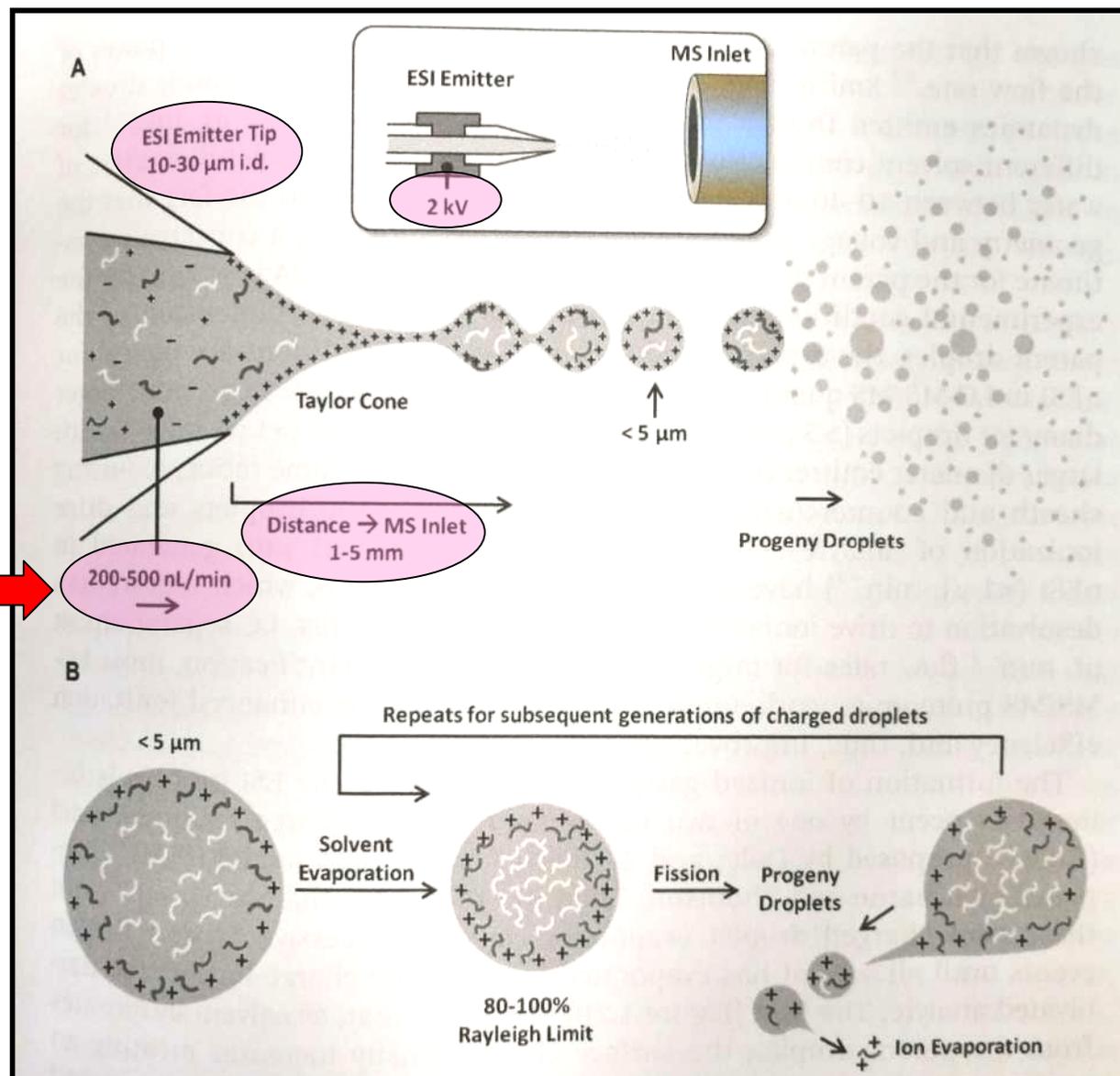
Nano-electrospray - nESI

Attenzione:
Per poter lavorare in nESI è
necessario adottare
colonne che permettano di
operare con flussi dell'ordine
di nL/minuto

=>
nanoHPLC
(colonne con il diametro
interno di 75 microm!)

Si combina l'elevato fattore
di concentrazione dato
dall'operare con colonne di
tipo nano con l'elevata
efficienza di ionizzazione
data dall'interfaccia nESI

=>
Alta sensibilità analitica

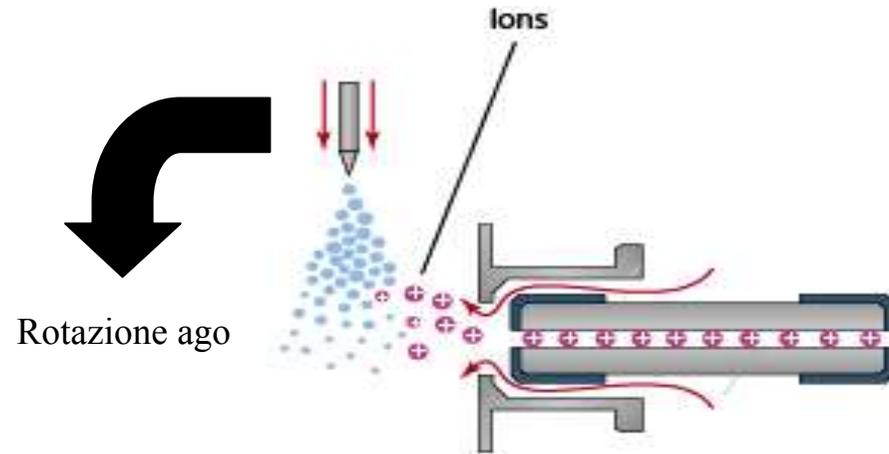


ElectroSpray Ionization (ESI)

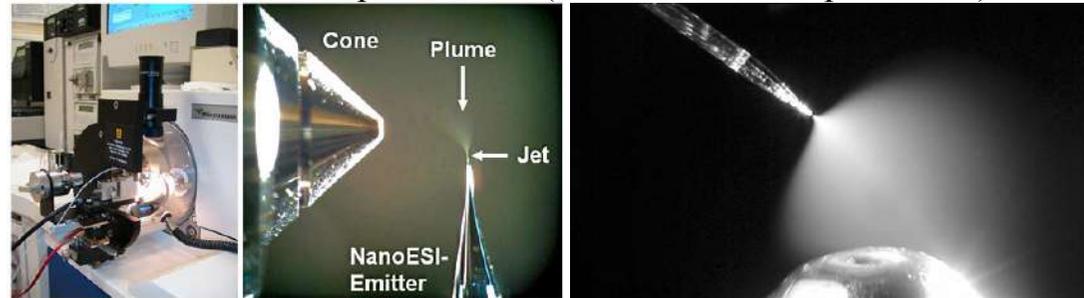
CROMATOGRAFIA

SENSIBILITÀ	Denominazione	Ø COLONNE (mm)	FLUSSI (µL/min)	
		Normal	4.6	0.5-2
	Narrow	2	150-300	
	Micro	1	50-25	
	Capillary	0.5 0.150	1-5	
	Nano	0.075 0.050	nL range	nESI

Le GEOMETRIE delle varie interfacce possono essere VARIABILI per quanto concerne l'angolo **SPRAY/ENTRATA MS**. La tipologia d'interfaccia dipendente sostanzialmente dal flusso che arriva dalla LC. Solitamente interfacce di tipo nanoHPLC-ESI prevedono una collocazione dell'ago quasi frontalmente rispetto all'orifizio d'entrata dello spettrometro oppure estremamente ravvicinato. Geometrie di tipo ortogonale consentono una "robustezza" dell'interfaccia solitamente maggiore, nel senso che è meno prona a sporcarsi



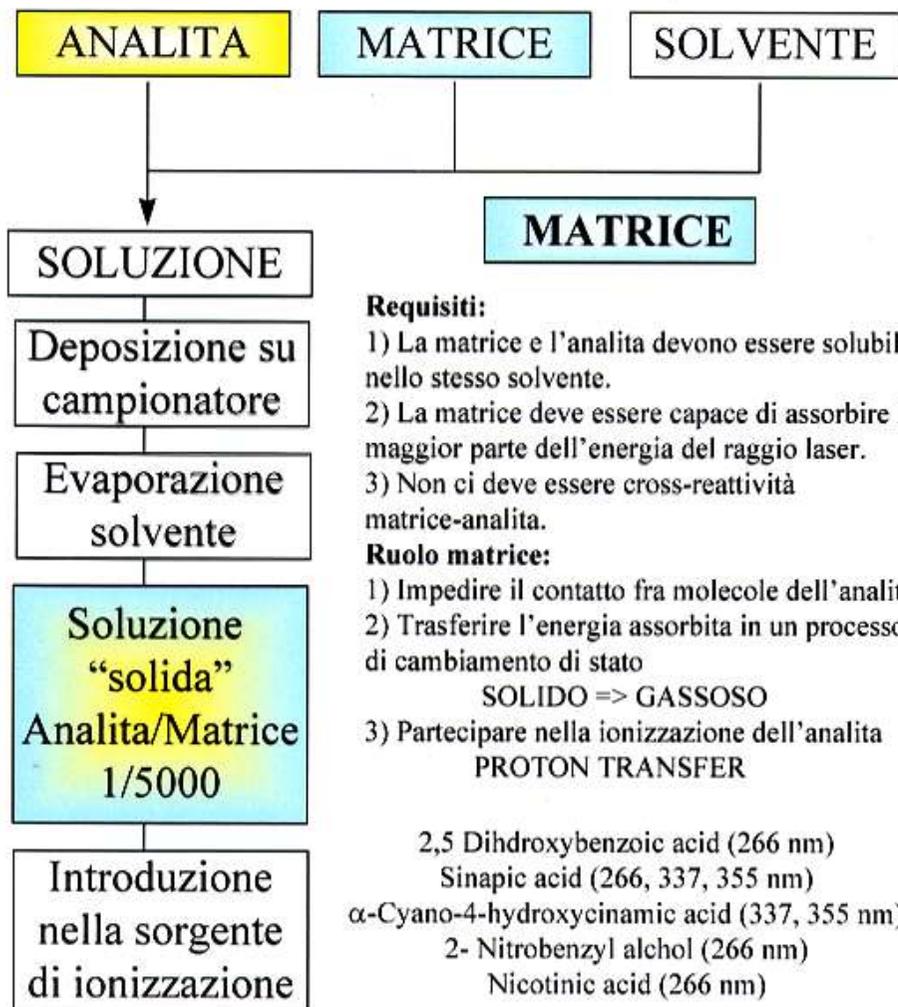
Interfacce di tipo nanoESI (solo differenza di potenziale)



Scelta dell'interfaccia che meglio si adatta alle scelte cromatografiche effettuate

Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)

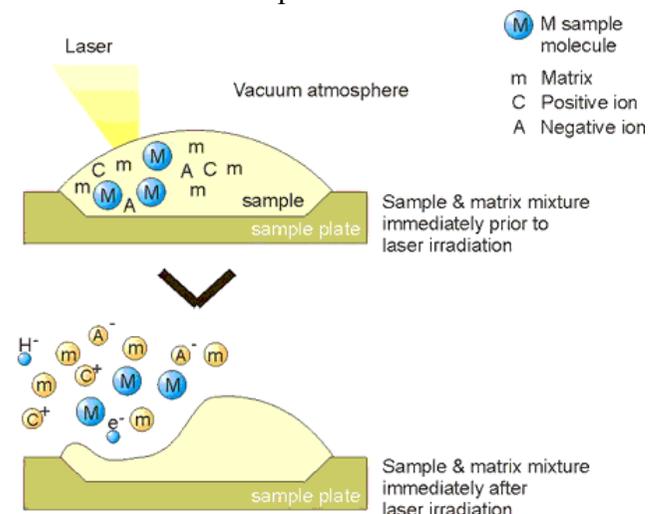
Preparazione Campione:



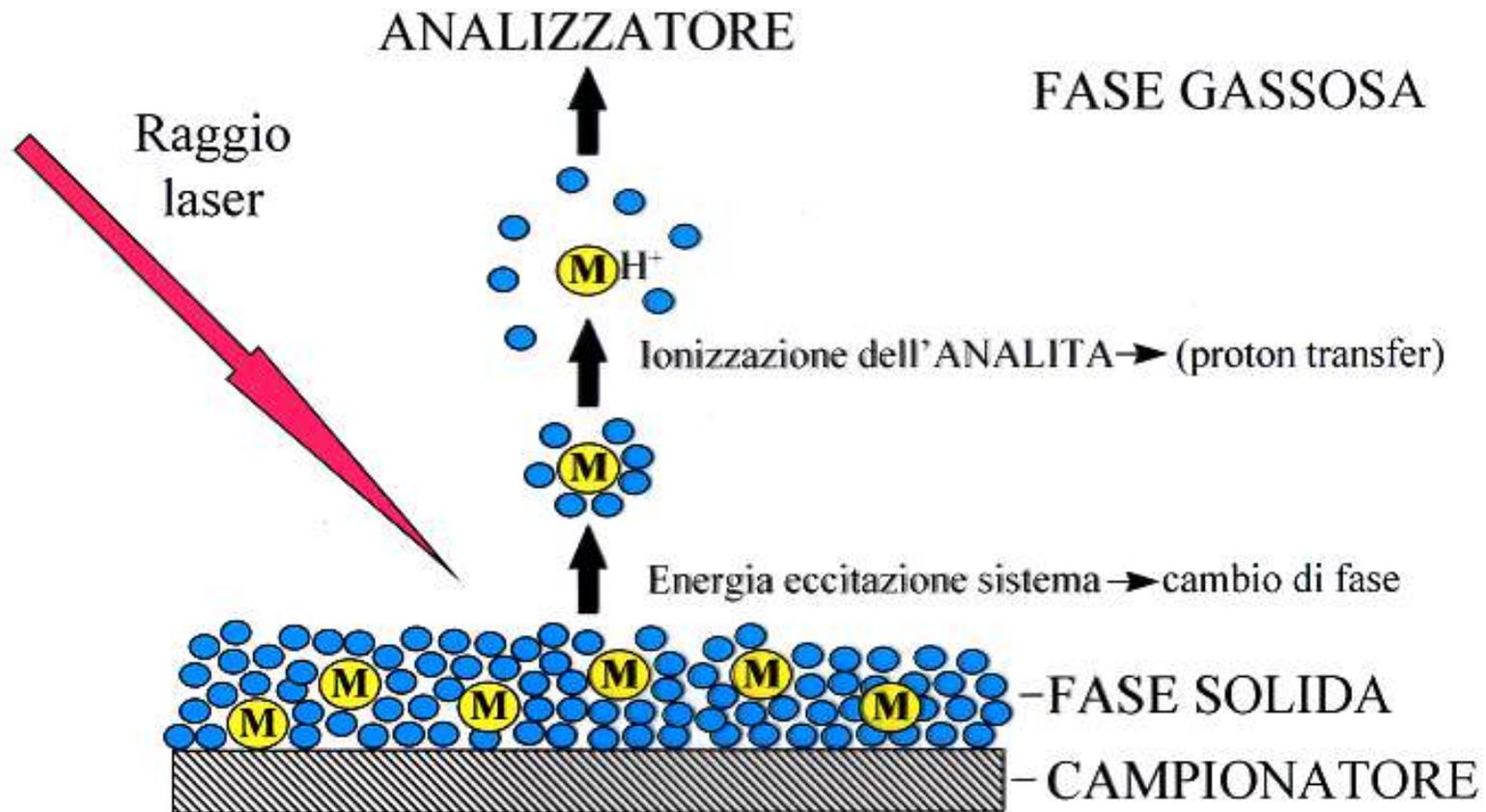
Campione depositato in forma liquida sul "target" per analisi MALDI. Il liquido evapora lasciando una "soluzione solida" analita/matrice.



Campione introdotto in sorgente dopo che è evaporato il liquido (residuo secco). La sorgente è in condizioni di vuoto spinto



Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)



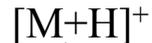
ESI vs MALDI

La metodica di ionizzazione MALDI genera prevalentemente ioni pseudomolecolari, (carichi 1+). La particolarità della ionizzazione di tipo ESI è quella di generare per una singola proteina più stati di carica che si distribuiscono secondo una gaussiana centrata attorno ad un valore di carica specifico. Si è visto che una molecola proteica di solito si distribuisce attorno ad una carica più abbondante che è circa PM/1000. Ovvero, per una molecola che pesa 10000 Da (circa 100 aa) essa si distribuirà (approssimativamente) su una gaussiana centrata sullo stato di carica 10+.

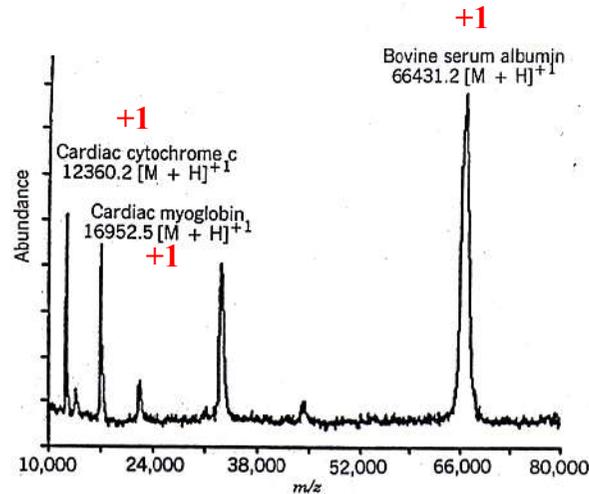
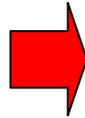
Da notare che nella gaussiana non vengono a mancare stati di carica intermedi rispetto a quelli che sono rilevabili, nel senso che se nello spettro è presente il 10+ e l'8+, di sicuro sarà presente anche il 9+.

MALDI

Prevalenza ioni pseudomolecolari



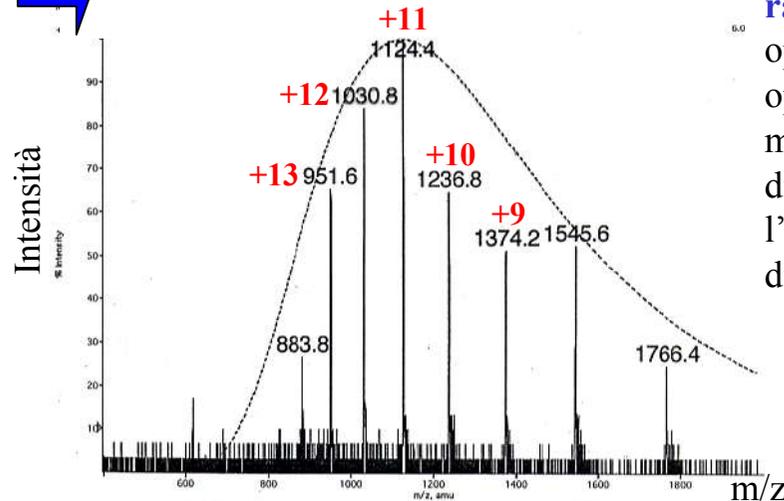
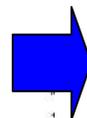
Ione pseudomolecolare: ione con una singola carica



ESI

Prevalenza ioni multicarica

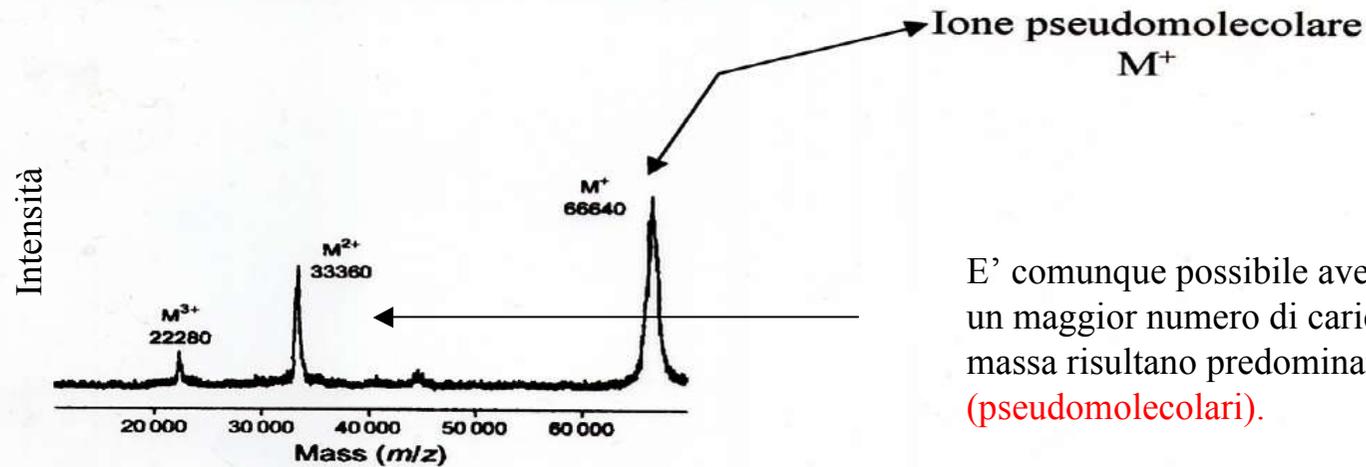
$[M+nH]^{n+}$



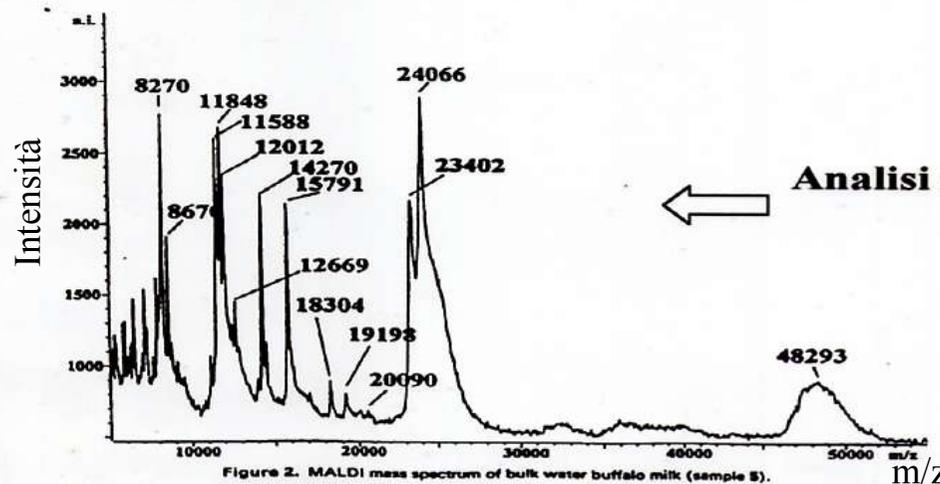
Questa considerazione sulla carica delle molecole ionizzate è importante da tenere in considerazione per quanto riguarda l'accoppiata con l'analizzatore di massa. Vedremo infatti che ogni analizzatore è capace di analizzare un determinato range m/z e quindi è opportuno adottare le opportune combinazioni in modo da non correre il rischio di ottenere uno ione che l'analizzatore non è in grado di "vedere".

MALDI - alcune considerazioni

La spettrometria di massa del tipo MALDI-TOF per le sue caratteristiche è adatta alla analisi di miscele complesse, in quanto nel processo di ionizzazione si forma a partire da una determinata molecola in modo predominante un singolo ione, solitamente definito **pseudomolecolare** e cioè recante una sola carica (MH^+). Lo spettro di massa risultante è solitamente di rapida ed intuitiva interpretazione.



E' comunque possibile avere anche ioni $2+$ o con un maggior numero di cariche, ma nello spettro di massa risultano predominanti gli ioni monocarica (**pseudomolecolari**).



Analisi di miscele proteiche complesse

Classico caso di peptidi derivanti da “**in gel digestion**” per l’ottenimento di dati di **peptide mass fingerprinting**

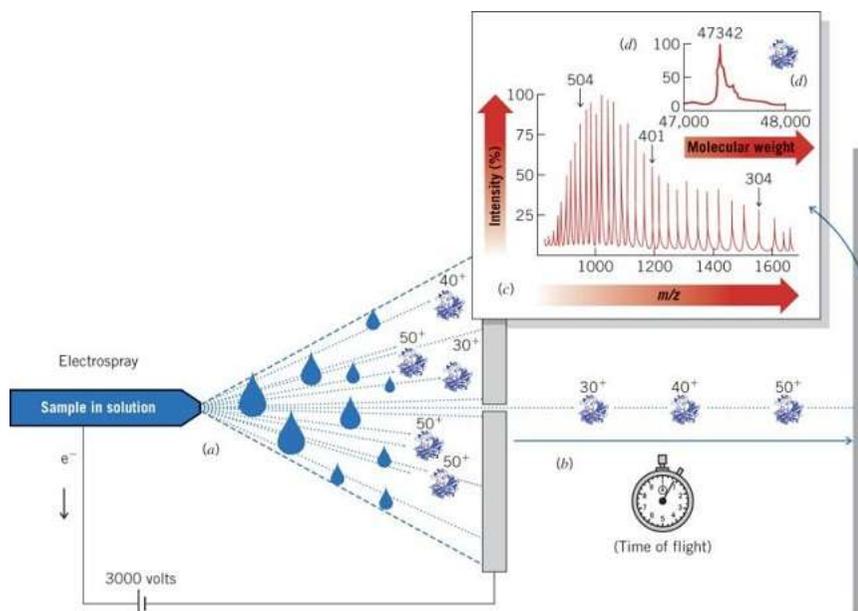
ESI - alcune considerazioni

La spettrometria di massa basata sulla ionizzazione mediante ESI (Ion-Spray) forma per una determinata molecola proteica più ioni che differiscono tra loro per il numero di cariche. Il numero delle cariche portato dalla molecola, qualora questa lo consenta, risulta essere molto elevato.

⇒

molecole proteiche ad elevato peso molecolare possono essere analizzate mediante spettrometri di massa caratterizzati da analizzatori che raggiungono bassi limiti superiori di m/z , come ad esempio i quadrupoli.

ESI-MS → Spettro Intensità vs. m/z → Deconvoluzione → Spettro Intensità vs. massa



Deconvoluzione

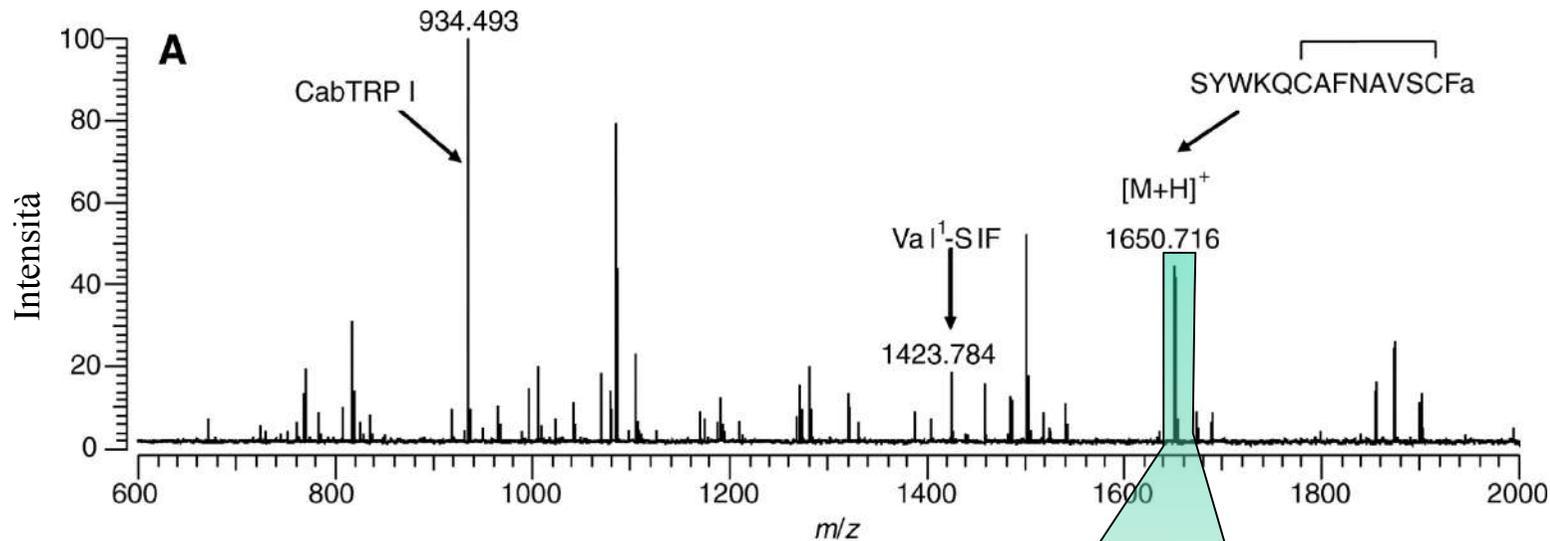
La deconvoluzione di uno spettro di massa consente di passare da uno spettro di tipo **I vs. m/z** ad uno spettro **I vs. massa**. In questo processo, tutti i segnali di m/z relativi alle varie specie recanti cariche diverse della medesima proteina confluiscono su un solo picco relativo al suo peso molecolare. Esistono degli algoritmi che consentono di fare questo in modo automatico. L'ipotesi di base su cui si basano questi algoritmi è che i due segnali (ovvero i valori m/z) in questione appartengano alla medesima proteina e che essi si diversifichino per uno stato di carica pari a 1 (i.e. il picco con valore di m/z più piccolo ha uno stato di carica maggiore). Vedasi più avanti nelle diapositive.

NB: la spettrometria di massa fornisce dei valori di massa/carica (m/z). Per risalire alla massa delle molecole è necessario conoscere/risalire alla carica relativa al segnale m/z !

DISTRIBUZIONE ISOTOPICA

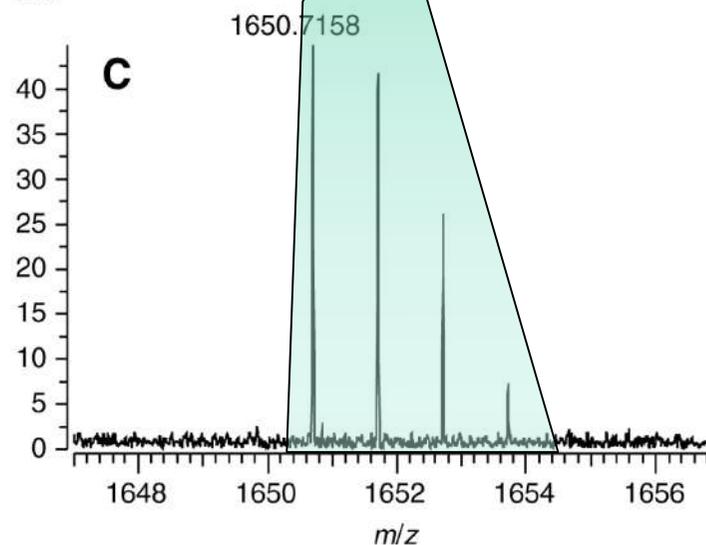
Determinazione dello stato di carica di uno ione (segnale m/z) mediante la distribuzione isotopica

Isotopo	Protoni	Neutroni	Concentrazione	Tempo di dimezzamento
^{12}C	6	6	99%	stabile
^{13}C	6	7	1%	stabile
^{14}C	6	8	$1 \cdot 10^{-10}\%$	5730 anni



Spettro di massa visto in modo dettagliato (zoom sul singolo segnale m/z) rivela un pattern particolare, che è dovuto alla presenza del ^{13}C . Il ^{13}C infatti rappresenta l'1% di tutto il C presente. Ogni 100 atomi di C, uno è un ^{13}C . Ovvero: 99 ^{12}C e 1 ^{13}C .

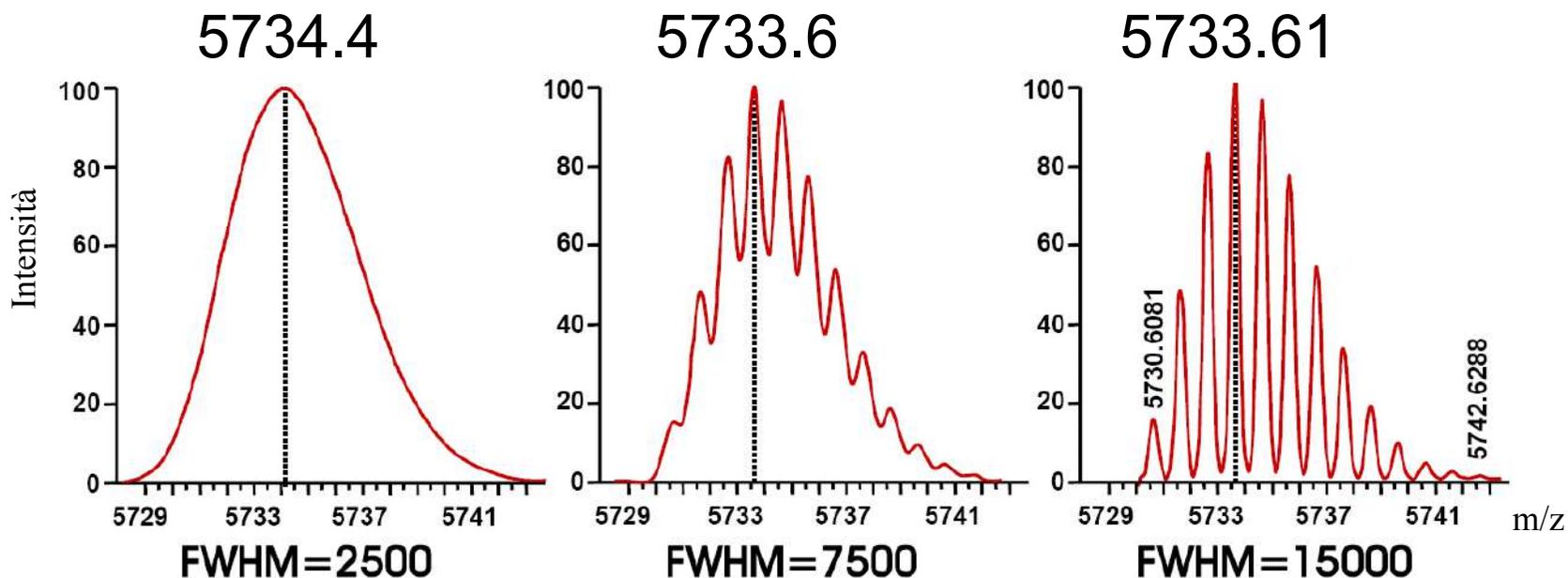
Questo porta ad avere molecole che, a seconda del numero di C che in esse sono presenti possono avere un numero diverso di ^{13}C .



DISTRIBUZIONE ISOTOPICA

Per poter visualizzare una distribuzione isotopica devo avere uno spettrometro di massa che mi offre una **elevata risoluzione** (vedasi più avanti quando parleremo degli analizzatori)

Isotopenmuster von $[M+H]^+$ von bovinem Insulin $[C_{254}H_{378}N_{65}O_{75}S_6]^+$
(P01327), $m_{\text{mono}}=5730.61081$, $m_{\text{average}}=5734.58948$



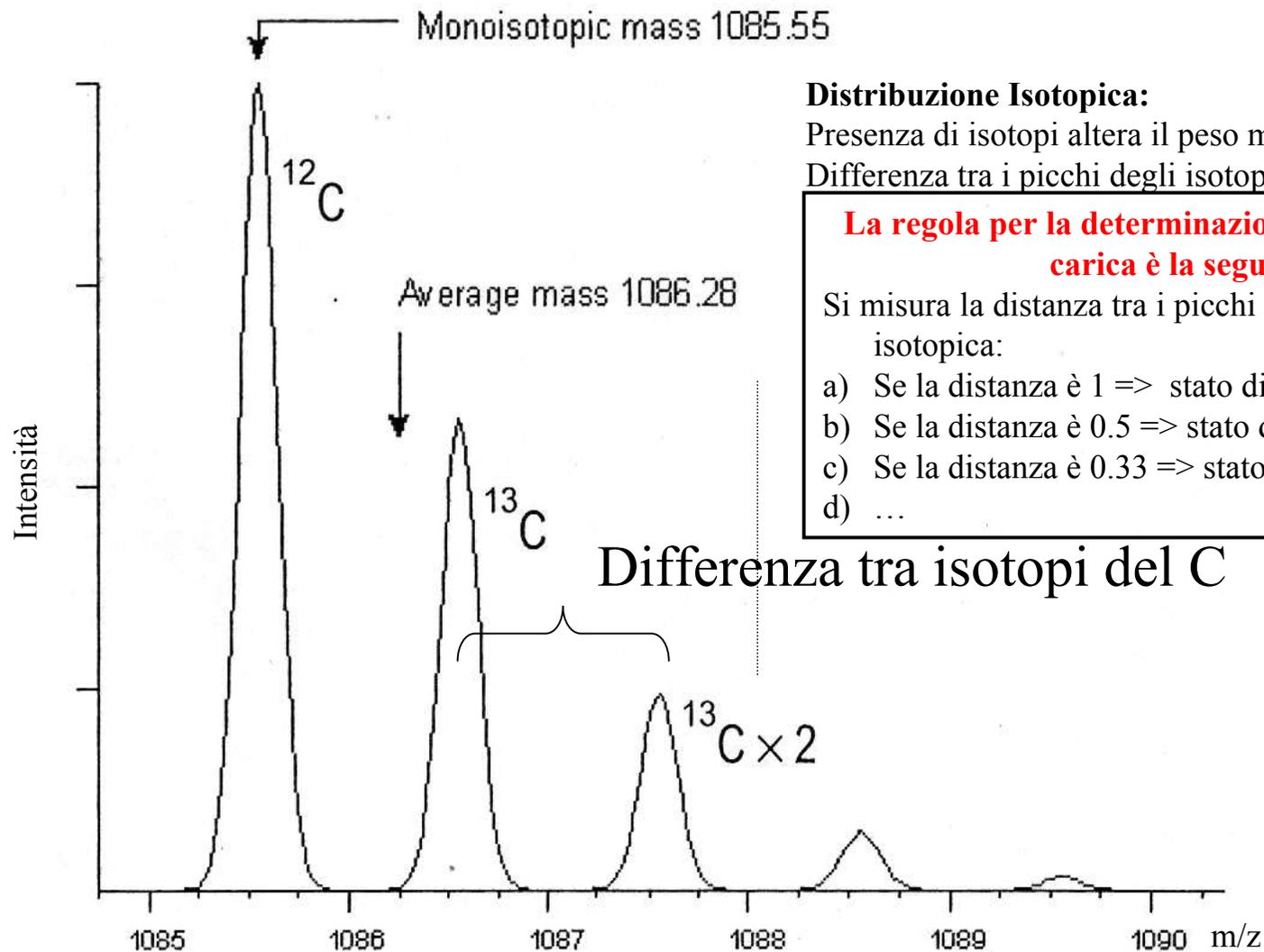
Peso molecolare AVERAGE

Quando non riesco a visualizzare la distribuzione isotopica, i vari picchi che la compongono “formano” un singolo picco. Sull’apice del picco leggo il peso average.

Peso molecolare monoisotopico (riferito alla molecola con solo ^{12}C)

Quando la risoluzione è adeguata, si riescono a vedere i singoli picchi della distribuzione isotopica

DISTRIBUZIONE ISOTOPICA



Distribuzione Isotopica:

Presenza di isotopi altera il peso molecolare

Differenza tra i picchi degli isotopi indica lo stato di carica.

La regola per la determinazione dello stato di carica è la seguente:

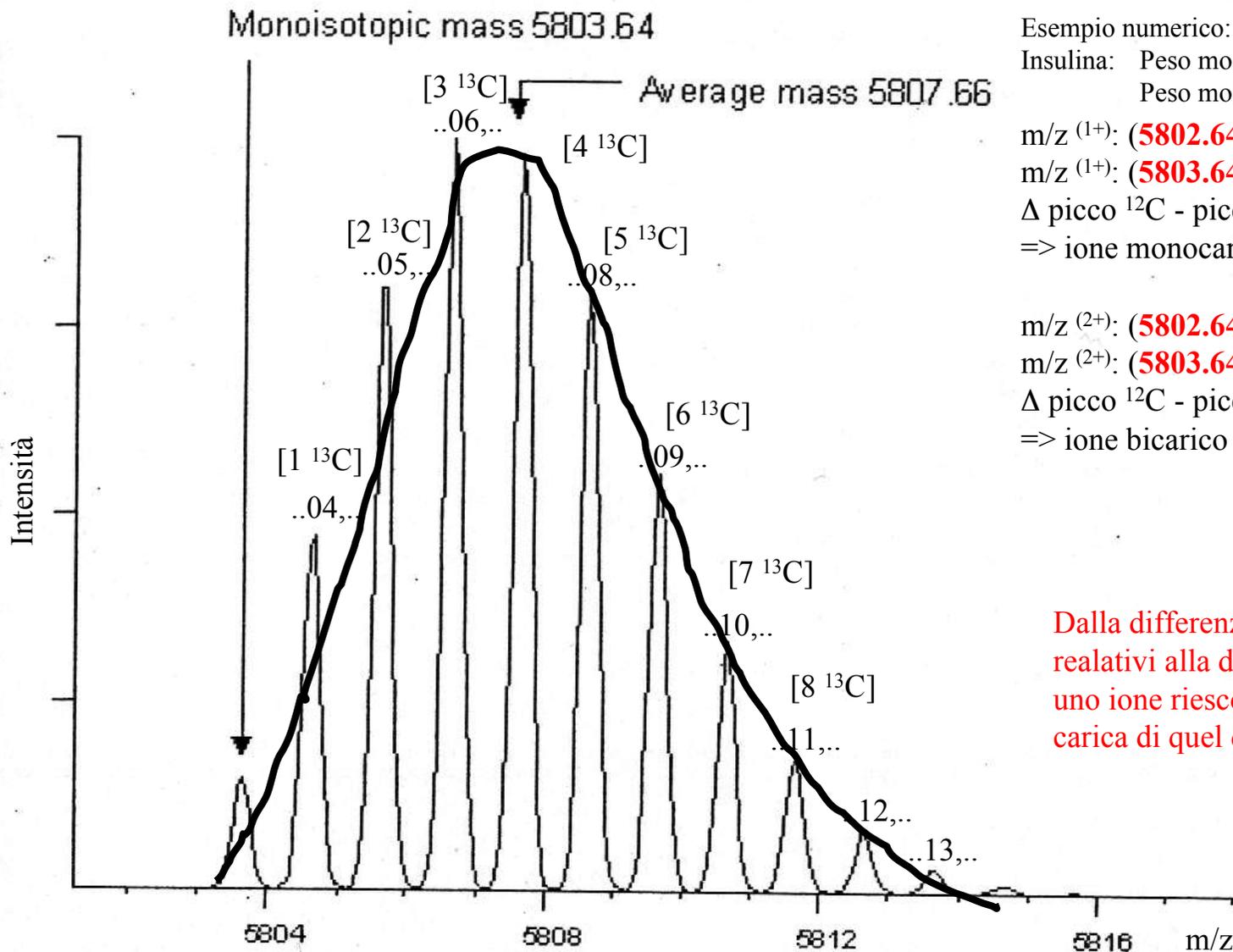
Si misura la distanza tra i picchi della distribuzione isotopica:

- a) Se la distanza è 1 => stato di carica 1+
- b) Se la distanza è 0.5 => stato di carica 2+
- c) Se la distanza è 0.33 => stato di carica 3+
- d) ...

Fig. 49: Predicted isotope distribution of the peptide HLKTEAEMK at resolution 5000 (FWHM).

DISTRIBUZIONE ISOTOPICA

$m/z = [\text{massa (M)} + nH] / nH$ - la dove la carica è data per addizione di H^+ . Come valore, la massa di un H^+ è uguale al valore della sua carica, ovvero 1.



Esempio numerico:

Insulina: Peso molecolare solo ^{12}C : 5802.64
 Peso molecolare 1 x ^{13}C : 5803.64

$m/z^{(1+)}: (5802.64+1)/1 = 5803.64$ [solo ^{12}C]

$m/z^{(1+)}: (5803.64+1)/1 = 5804.64$ [1 ^{13}C]

Δ picco ^{12}C - picco $^{13}C = 1$

=> ione monocarico (1+)

$m/z^{(2+)}: (5802.64+2)/2 = 2902.32$ [solo ^{12}C]

$m/z^{(2+)}: (5803.64+2)/2 = 2902.82$ [1 ^{13}C]

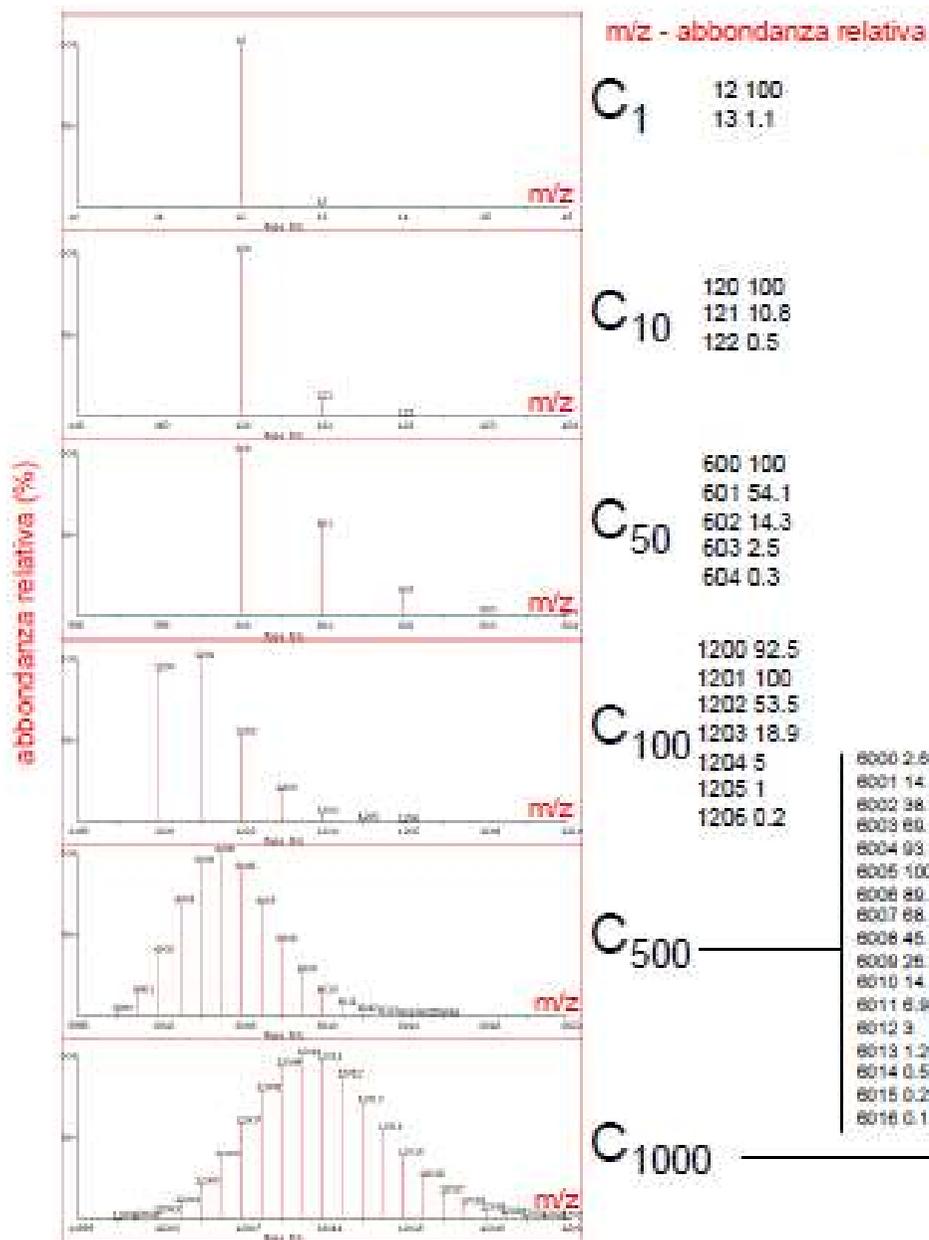
Δ picco ^{12}C - picco $^{13}C = 0.5$

=> ione bicarico (2+)



Dalla differenza tra i picchi di massa relativi alla distribuzione isotopica di uno ione riesco a risalire allo stato di carica di quel determinato ione

DISTRIBUZIONE ISOTOPICA



Per **peso molecolare MONOISOTOPICO** s'intende il peso molecolare calcolato sulla base del picco m/z con solo atomi ¹²C (il picco più a sx della distribuzione isotopica - attenzione che per molecole/proteine ad elevato peso molecolare a volte il picco più a sx non corrisponde alla molecola con solo ¹²C a causa della bassa abbondanza di quest'ultima).

All'aumentare del numero di C inclusi in una molecola aumenta la probabilità che uno di essi sia un ¹³C. Ecco che aumenta l'intensità del picco della distribuzione isotopica relativa alla molecola con 1 x ¹³C. Per molecole con più di 100 atomi di C, il picco più intenso sarà quello relativo al 1 x ¹³C, per quelle con più di 200 atomi di C sarà quello con 2 x ¹³C e così via. Il **peso molecolare AVERAGE** è quello che risulta considerando l'apice del picco non risolto risultante dalla combinazione dei picchi della distribuzione isotopica.

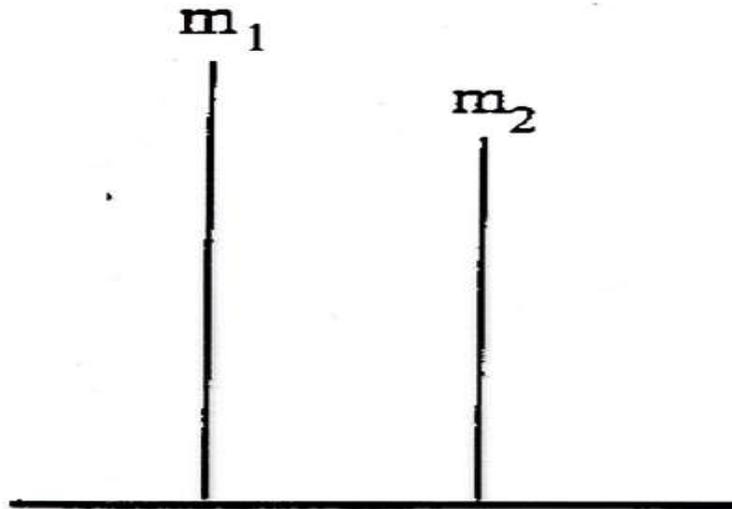
NB: **il peso molecolare average** non corrisponde esattamente al valore deducibile dal picco con un più elevato n° di ¹³C ma risulta dalla costruzione grafica del picco di massa non risolto (ci si si avvicina comunque molto)

DECONVOLUZIONE di uno spettro di massa derivante da analisi ESI di una molecola proteica

NB: m_1 e m_2 sono i due valori m/z misurati sperimentalmente => valori noti

Se m_2 è maggiore di m_1 allora n_1 è maggiore di n_2 . Dove n rappresenta lo stato di carica delle molecole

L'ipotesi è che i due picchi siano "adiacenti" nella gaussiana e che quindi rappresentino stati di carica che si differenziano per 1 => $n_1 = n_2 + 1$



$$m_1 = \frac{M + n_1}{n_1}$$

$$m_2 = \frac{M + n_2}{n_2}$$

con:

$$m_2 > m_1 \quad e \quad n_1 > n_2$$

Assumendo che gli ioni siano addotti tra la molecola neutra e protoni, si ha anche la relazione tra n_1 e n_2 :

$$n_1 = n_2 + 1$$

$$(*) \quad n_2 = \frac{m_1 - 1}{m_2 - m_1} \quad e \quad M = n_2(m_2 - 1)$$

DECONVOLUZIONE di uno spettro di massa derivante da analisi ESI di una molecola proteica

ESERCIZIO

m_2	m_1	n_2 calc.	n_2	M
1884.2	1696.1	9.01	9	16948.8
1696.1	1542.0	10.00	10	16951.0
1542.0	1413.6	11.00	11	16951.0
1413.6	1304.9	12.00	12	16951.2
1304.9	1211.8	13.01	13	16950.7
1211.8	1131.1	14.00	14	16951.2
1131.1	1060.4	14.98	15	16950.5
1060.4	998.2	16.03	16	16950.4
998.2	942.8	17.00	17	16951.4
942.8	893.1	17.95	18	16951.4
893.1	848.4	18.96	19	16949.9
848.4	808.1	20.03	20	16948.0

Valore medio: 16950.4
 Dev. Standard: 1.1

Provate prima a ricavare l'uguaglianza riportata nella diapositiva precedente (*)

Provate poi a ricavare i valori di n_2 per ciascuna coppia fornita.

Provate poi a ricavare il peso molecolare della proteina sulla base del valore di n_2 e di m_2

Sulla base dei valori di peso molecolare ottenuti, calcolate il peso molecolare medio e la sua deviazione standard.