

Spettrometria di Massa

Cosa è la spettrometria di massa?

- Metodo analitico per misurare il peso molecolare di un campione
- Sono richieste solo concentrazioni picomolari
- Accuratezza entro lo 0.01% del peso totale del campione ed entro le 5 ppm per piccole molecole organiche
- Per 40 kDa, ci sono 4 Da di errore
- Questo significa che può rilevare sostituzioni di aminoacidi /modificazioni post-traslazionali

Quali informazioni ?

- Informazioni strutturali
- Frammentazione del campione e analisi dei prodotti
- Utile per il sequenziamento dei peptidi & oligonucleotidi
- Identificazione dei composti individuali nei complessi misti

In che campo è usata?

- **Biotecnologia:**
analisi di proteine, peptidi, oligonucleotidi
- **Farmaceutica:**
drugs discovery, combinatorial chemistry, pharmokinetics,
drug metabolism
- **Clinico:**
screening neonatale, analisi dell' emoglobina, drug testing
- **Ambientale:**
qualità del cibo, acqua, aria

Biochimica

- **Misure accurate del peso molecolare :**
purezza del campione, rilevamento delle sostituzioni degli aminoacidi, modificazioni post-traslazionali e ponti disolfuro
- **Monitoraggio delle reazioni :**
attività enzimatica, modificazioni chimiche, digestione proteica
- **Sequenzamento degli aminoacidi**
- **Sequenzamento degli oligonucleotidi**
- **Struttura delle proteine:**
protein folding (H/D exchange), protein-ligand complex formation, macromolecular structure determination

Come funziona uno spettrometro di massa?

- 3 parti fondamentali: la sorgente di ionizzazione, l'analizzatore, il rivelatore
- I campioni sono più facili da manipolare se ionizzati
- Separazione nell'analizzatore secondo il rapporto massa/carica (m/z)
- Rilevazione degli ioni separati e la loro relativa abbondanza
- Segnali mandati al sistema di elaborazione dati e formattati in uno spettro m/z

Spettrometria di massa

- **Serve a misurare la massa delle molecole.**
- **Fornisce la massa molecolare, e anche la *formula* molecolare**
- **La molecola deve essere ionizzata, così da misurare il rapporto massa/carica (m/z) dello ione risultante.**



La sorgente serve a
volatilizzare e
ionizzare il campione

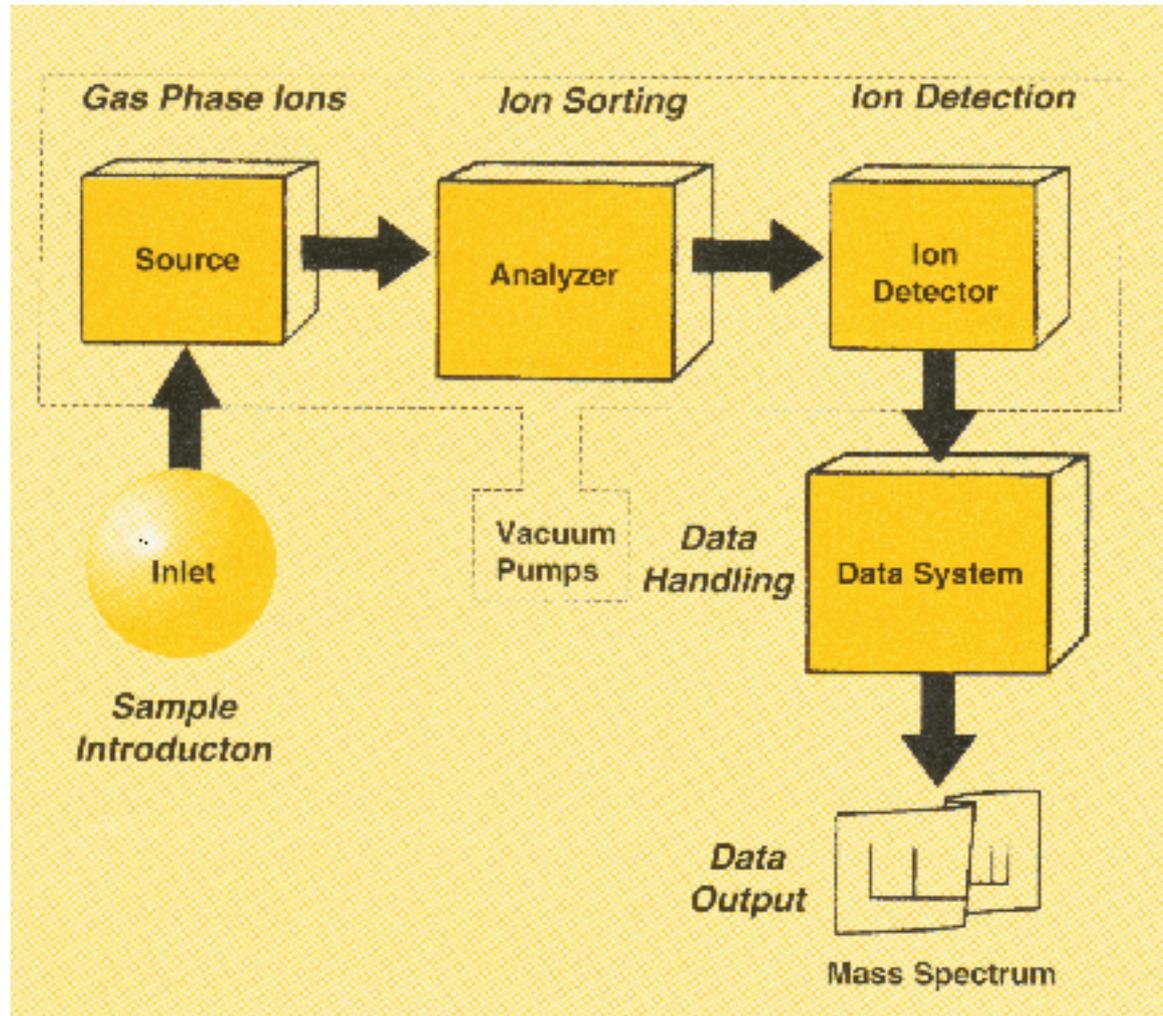
L'analizzatore serve a
misurare il rapporto
 m/z degli ioni prodotti

Il detector serve a
rivelare gli ioni che
arrivano
dall'analizzatore

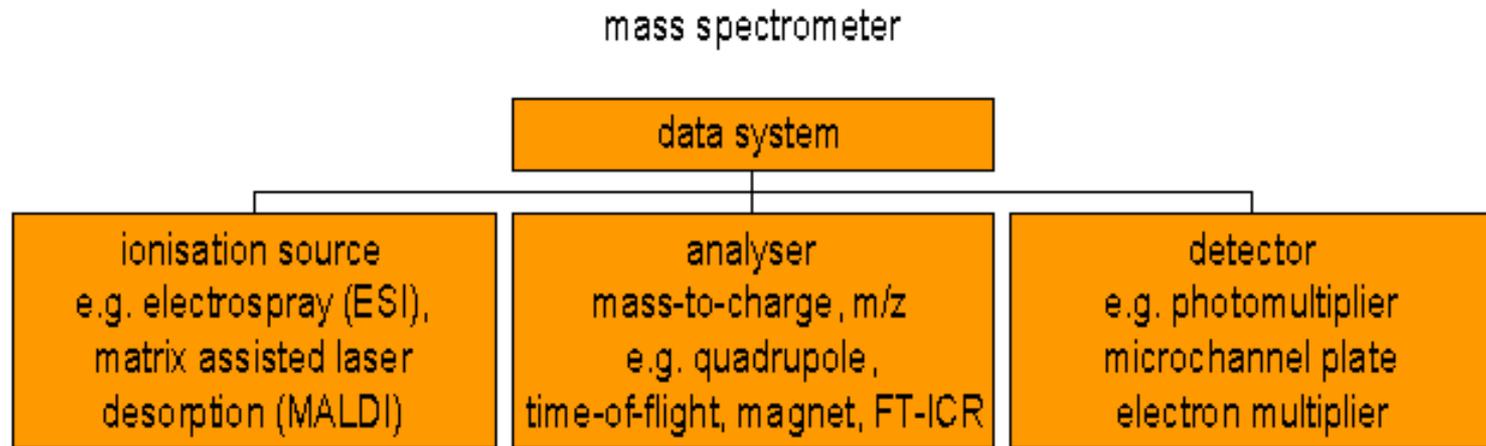
Mass Spectrometer

All Instruments Have:

1. Sample Inlet
2. Ion Source
3. Mass Analyzer
4. Detector
5. Data System

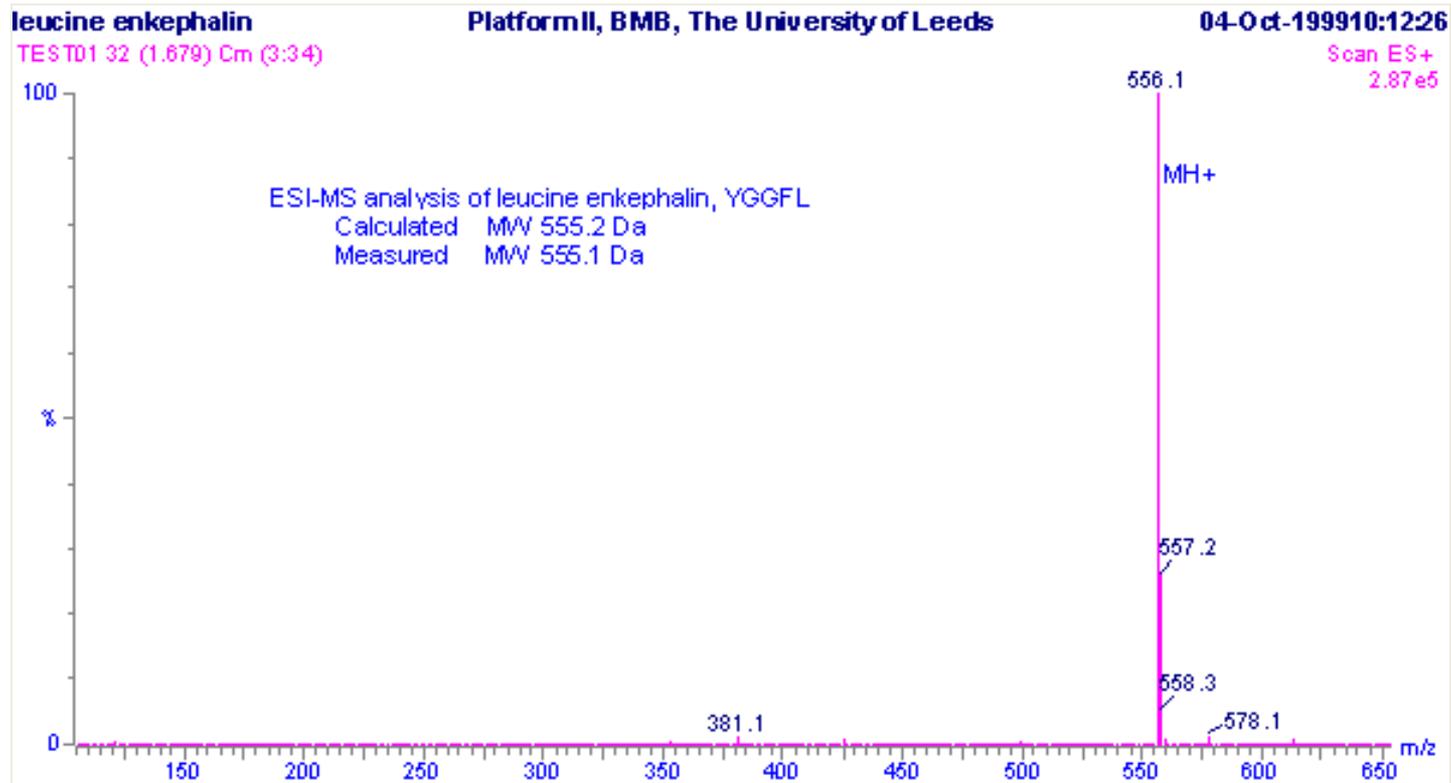


Schema



- L'analizzatore, rilevatore e la sorgente di ionizzazione sono in alto vuoto per permettere il movimento degli ioni
- L'operazione è sotto il controllo del sistema elaborazione dati

Esempio di spettro m/z



- Leucine Enkephalin, Pentapeptide, YGGFL
- Expected Mr = 555.3 Da, Calculated Mr = 555.1 Da (dominant ions at 556.1)

Immissione del campione e ionizzazione

- Direttamente nella sorgente di ionizzazione o attraverso la cromatografia per la separazione delle componenti (HPLC, GC, elettroforesi)
- La ionizzazione può essere caricata positivamente (per proteine) o caricata negativamente (per saccaridi e oligonucleotidi)

Metodi di ionizzazione

- Ionizzazione chimica in pressione atmosferica (APCI)
- Ionizzazione chimica(CI)
- Impatto elettronico (EI)
- **Ionizzazione per Elettrospray (ESI)**
- Bombardamento per atomi veloci (FAB)
- Field Desorption / Field Ionisation (FD/FI)
- **Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI)**
- Ionizzazione per termospray

Rilevamento & Registrazione degli Ioni

- Il rilevatore monitora la corrente degli ioni, la amplifica e poi trasmette il segnale al sistema di elaborazione dati
- Rilevatori comuni: fotomoltiplicatore, moltiplicatore di elettroni, micro-channel plate

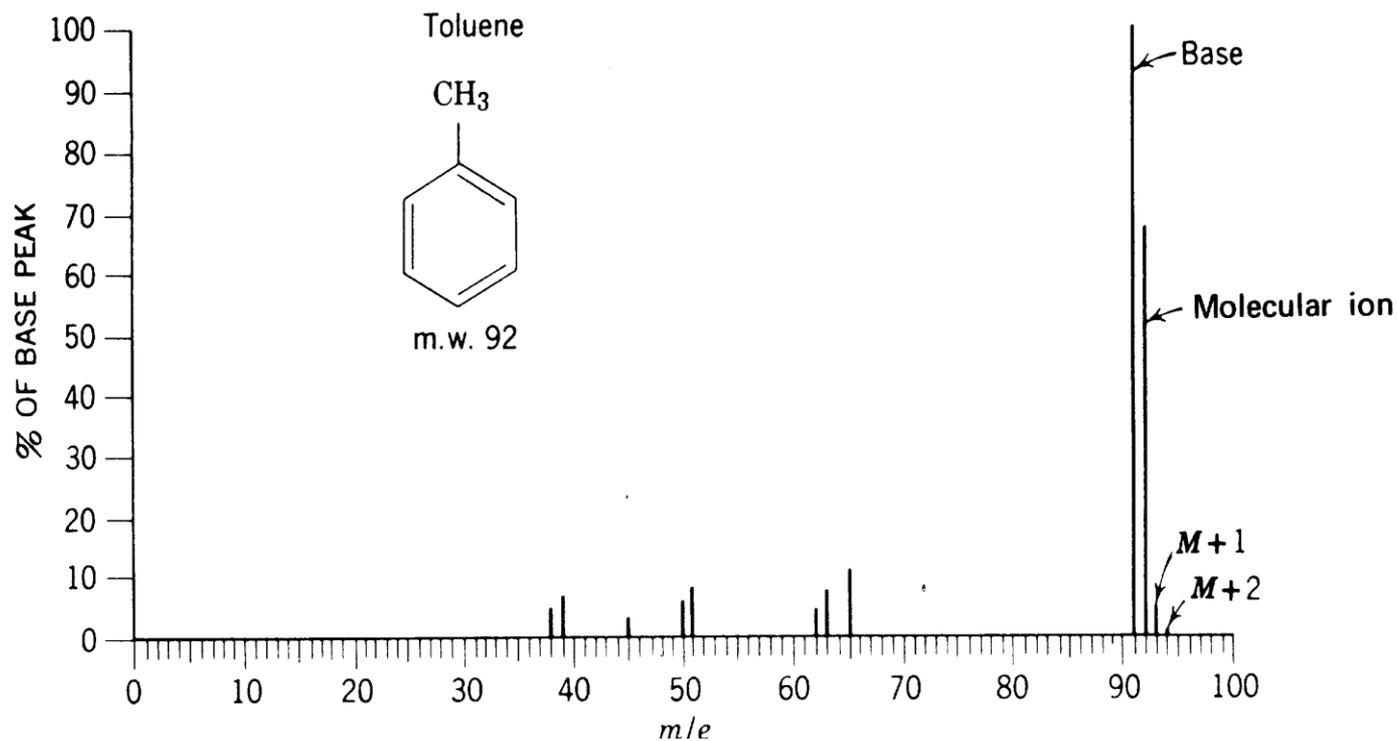
Meccanismi di ionizzazione

- Espulsione di e^- : $M \longrightarrow M^{+\cdot} + e^-$
- Protonazione: $M + H^+ \longrightarrow MH^+$
- Cationizzazione: $M + Cat^+ \longrightarrow M Cat^+$
- Deprotonazione: $MH \longrightarrow M^- + H^+$

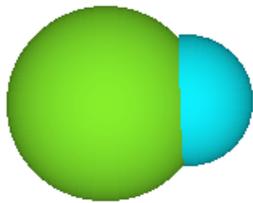
Informazioni dalla spettrometria di massa

➤ **Peso molecolare della sostanza sotto indagine**

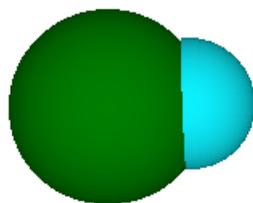
➤ **Frammentazioni**



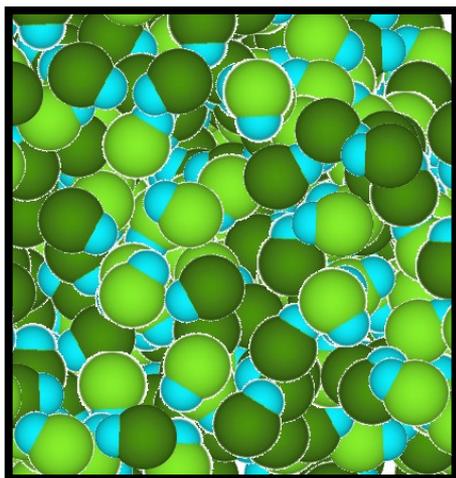
Picchi isotopici: HCl



H^{35}Cl
MW 36
(75%)

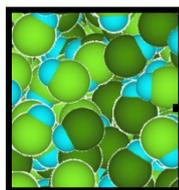


H^{37}Cl
MW 38
(25%)



$6.02 \cdot 10^{23}$ molecole
= 1 mol
= 36.55 g

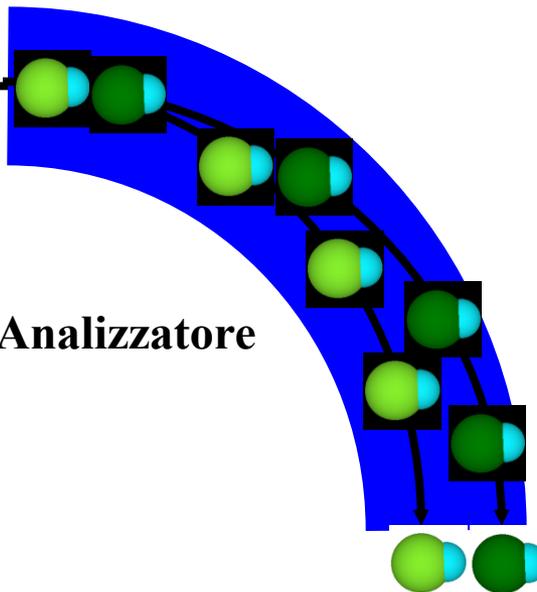
BILANCIA



Sorg.

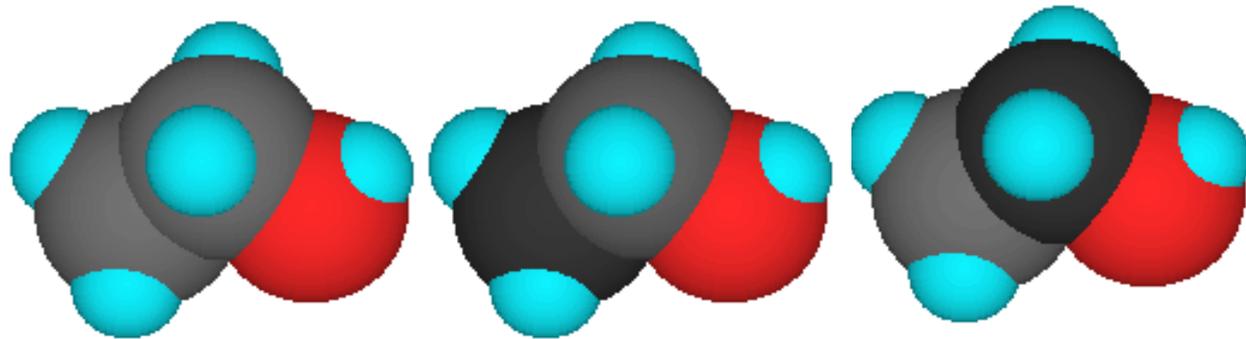
MS

Analizzatore



m/z 36 (75%) m/z 38 (25%)

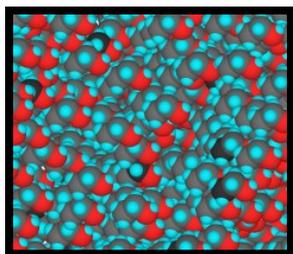
Picchi isotopici: EtOH



$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$
MW 46

$^{13}\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$
MW 47
1.1%

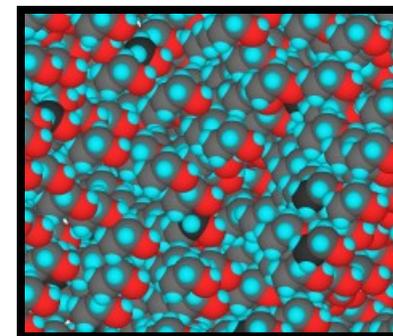
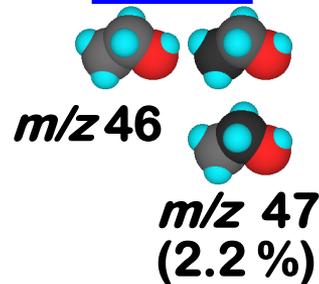
$\text{CH}_3^{13}\text{CH}_2\text{OH}$
MW 47
1.1%



Sorg.

MS

Analizzatore



BILANCIA

$6.02 \cdot 10^{23}$ molecole
= 1 mol
= 46.07 g

Picchi isotopici

M+1

$$1.1\% \bullet (\text{numero di C}) + 0.36\% \bullet (\text{numero di N})$$

M+2

Cl (33% di M)

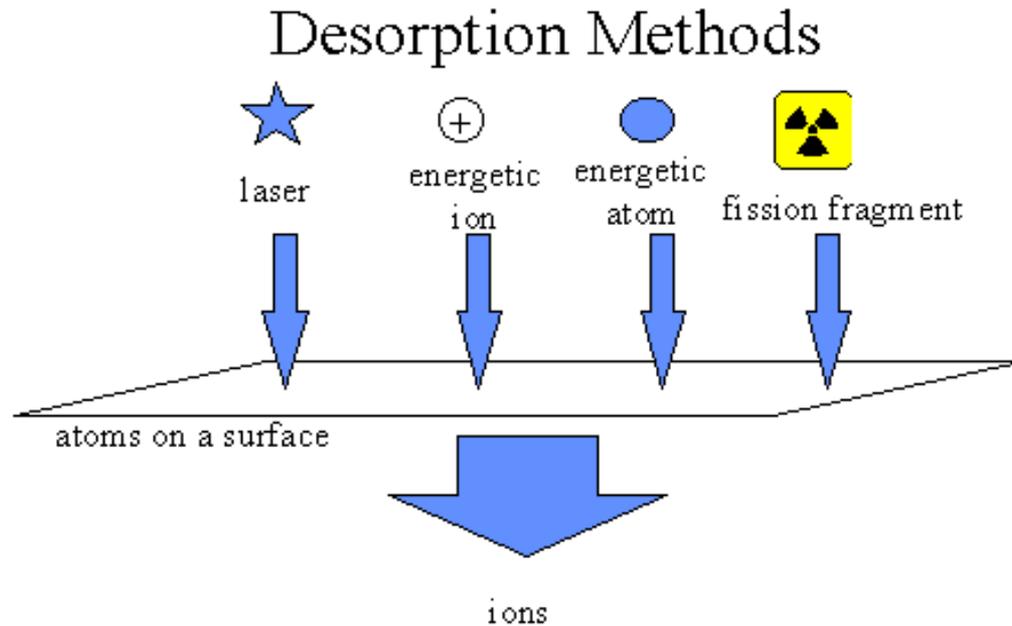
Br (100% di M)

S (4% di M)

Table I. Exact Masses of Isotopes

Element	Atomic Weight	Nuclide	Mass
Hydrogen	1.00797	¹ H	1.00783
		D (² H)	2.01410
Carbon	12.01115	¹² C	12.00000 (std)
		¹³ C	13.00336
Nitrogen	14.0067	¹⁴ N	14.0031
		¹⁵ N	15.0001
Oxygen	15.9994	¹⁶ O	15.9949
		¹⁷ O	16.9991
		¹⁸ O	17.9992
Fluorine	18.9984	¹⁹ F	18.9984
Silicon	28.086	²⁸ Si	27.9769
		²⁹ Si	28.9765
		³⁰ Si	29.9738
		³¹ P	30.9738
Phosphorus	30.974	³² S	31.9721
		³³ S	32.9715
		³⁴ S	33.9679
		³⁵ Cl	34.9689
Sulfur	32.064	³⁷ Cl	36.9659
		⁷⁹ Br	78.9183
Chlorine	35.453	⁸¹ Br	80.9163
		¹²⁷ I	126.9045
Bromine	79.909		
Iodine	126.904		

Tecniche di desorbimento



Sorgente FAB

Sorgente MALDI

Non richiedono volatilizzazione

Metodi di Ionizzazione

- **APCI—Atmospheric Pressure Chemical Ionization**
- **CI—Chemical Ionization**
- **EI—Electron Ionization**
- **ESI—Electrospray Ionization**
- **FAB—Fast Atom Bombardment**
- **FD—Field Desorption**
- **FI—Field Ionization**
- **MALDI—Matrix Assisted Laser Desorption Ionization**
- **TSP—Thermospray Ionization**

Tecniche di ionizzazione

Metodi in fase di Gas

- Electron Impact (EI)
- Chemical Ionization (CI)

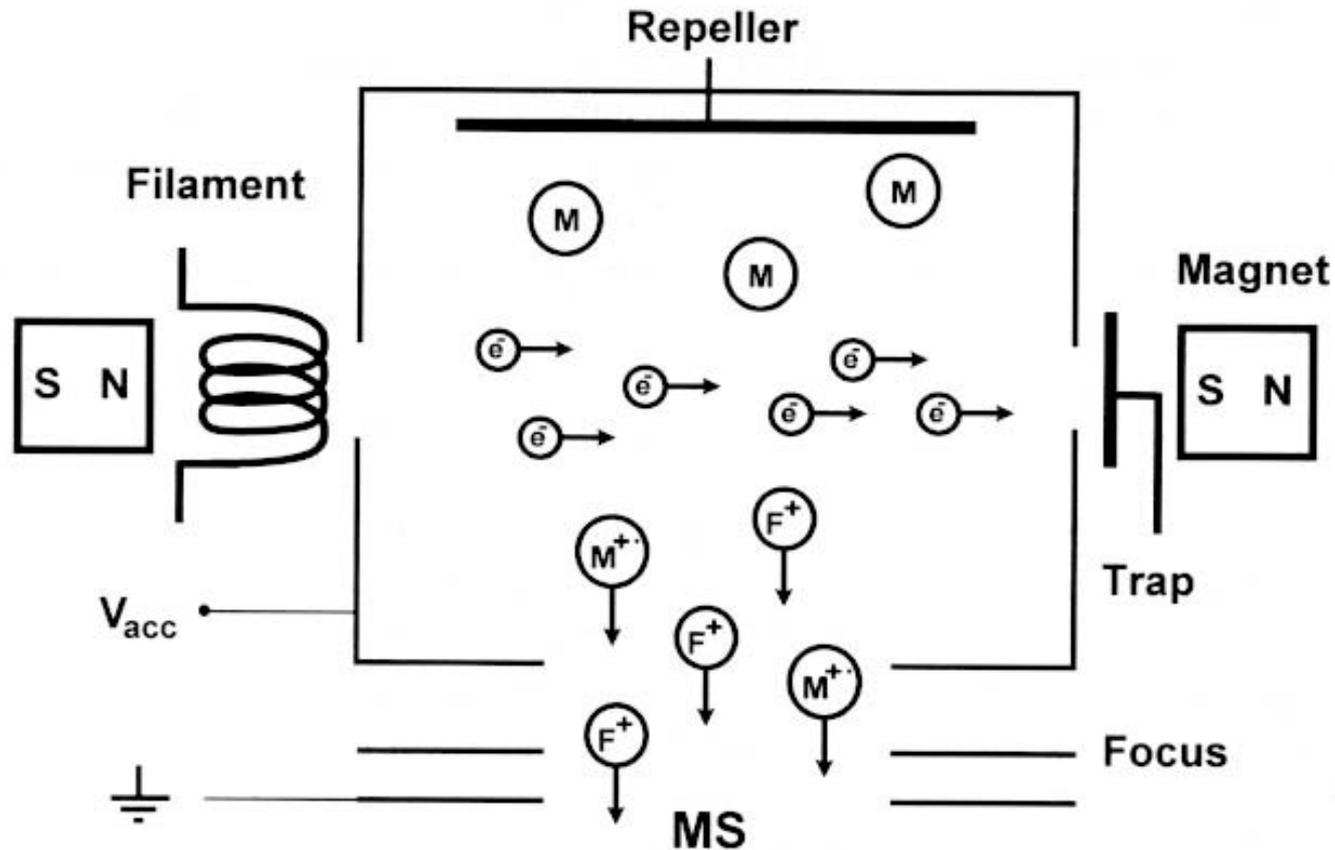
Metodi di desorbimento

- Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)
- Fast Atom Bombardment (FAB)

Metodi Spray

- Electrospray (ESI)
- Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)

Impatto elettronico EI



Electron Impact

(low picomole)

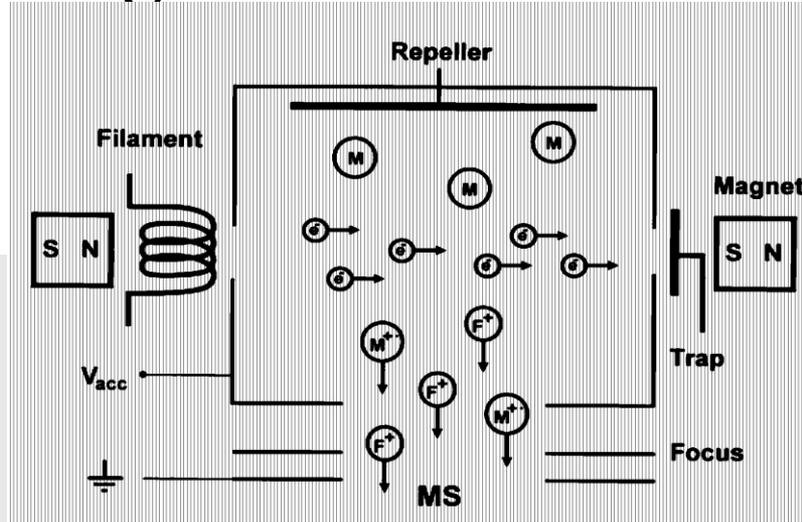
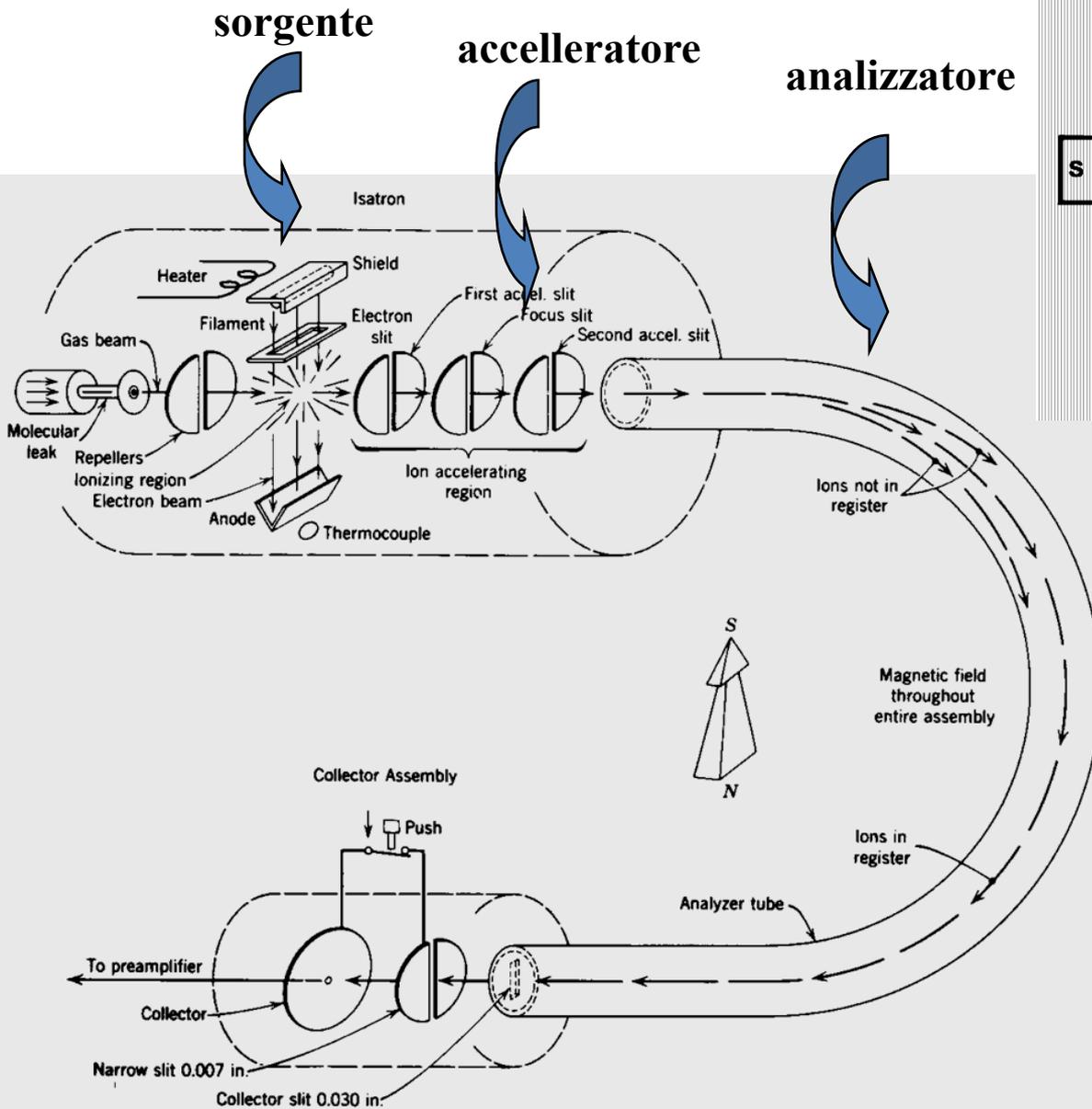
Vantaggi

- Affidabile
- Librerie Fragmentation
- No Supression
- Campioni insolubili
- Interfacciabile al GC
- Campioni non polari

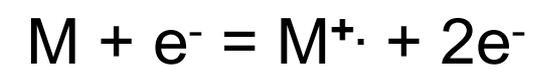
Svantaggi

- Parent Identification
- Campione volatile necessario
- Stabilità termica necessaria
- Non interfacciabile al LC
- Composti con masse basse (<1000 amu)
- Solids Probe Requires Skilled Operator

Spettrometro di massa EI/magnetico



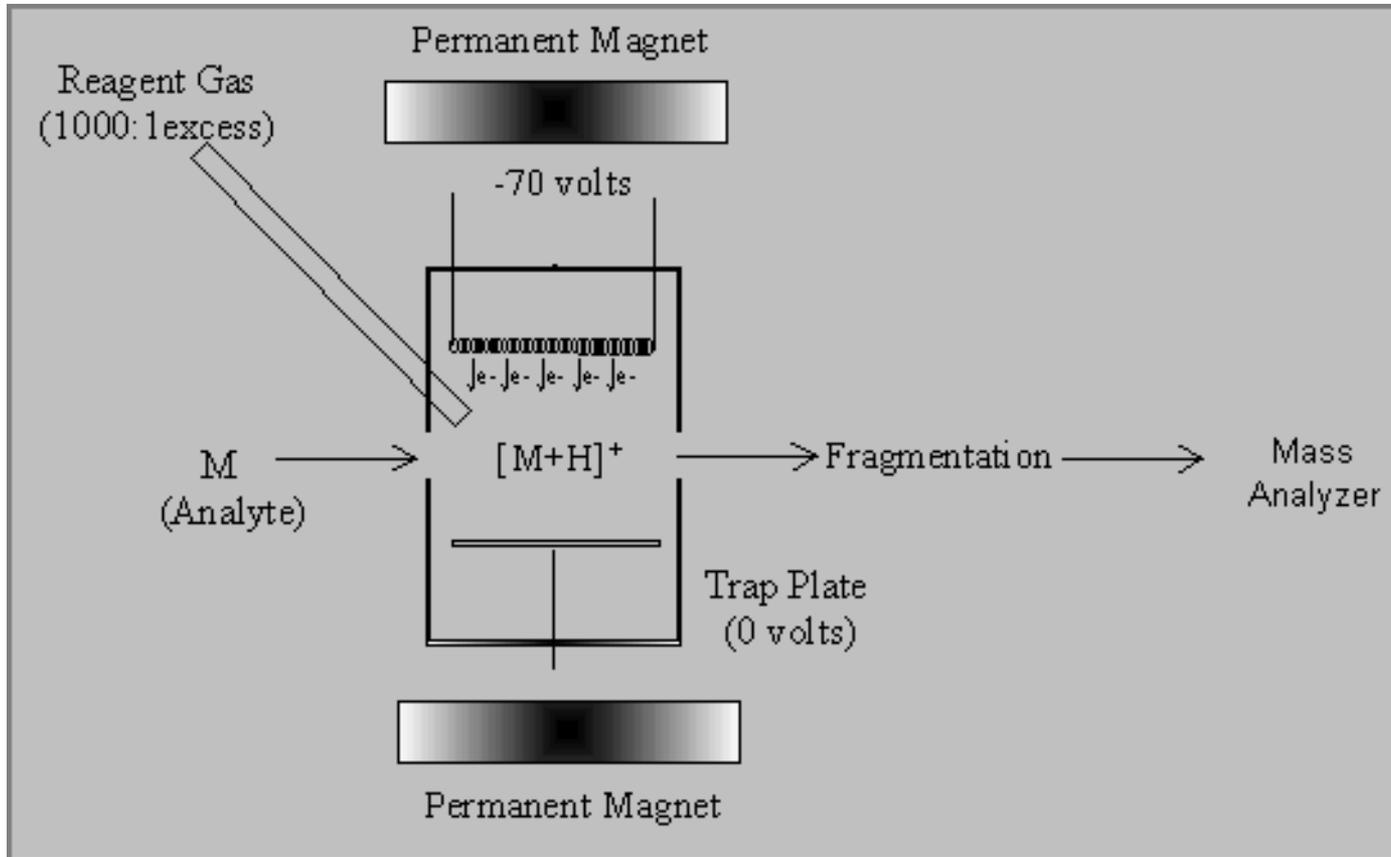
- L'apparecchio è sotto alto vuoto, con una pressione intorno ai 10⁻⁵-10⁻⁶ Tor.
- Il campione deve essere allo stato di vapore.
- Le molecole dal campione vaporizzato sono colpite da elettroni ad elevata energia (tipicamente 70 eV) emessi da un filamento incandescente.
- La grandissima parte degli ioni ha carica unitaria e si tratta quindi di ioni-radicali



Problemi con EI

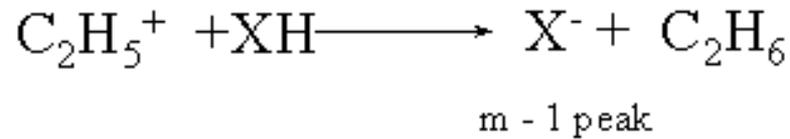
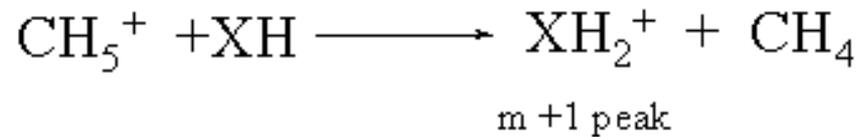
- **Lo ione molecolare può non essere visibile**
- **Eccessiva frammentazione**
- **La sostanza deve essere volatilizzata**

Chemical Ionization



Ionizzazione chimica CI

ionization



Chemical Ionization

(low picomole)

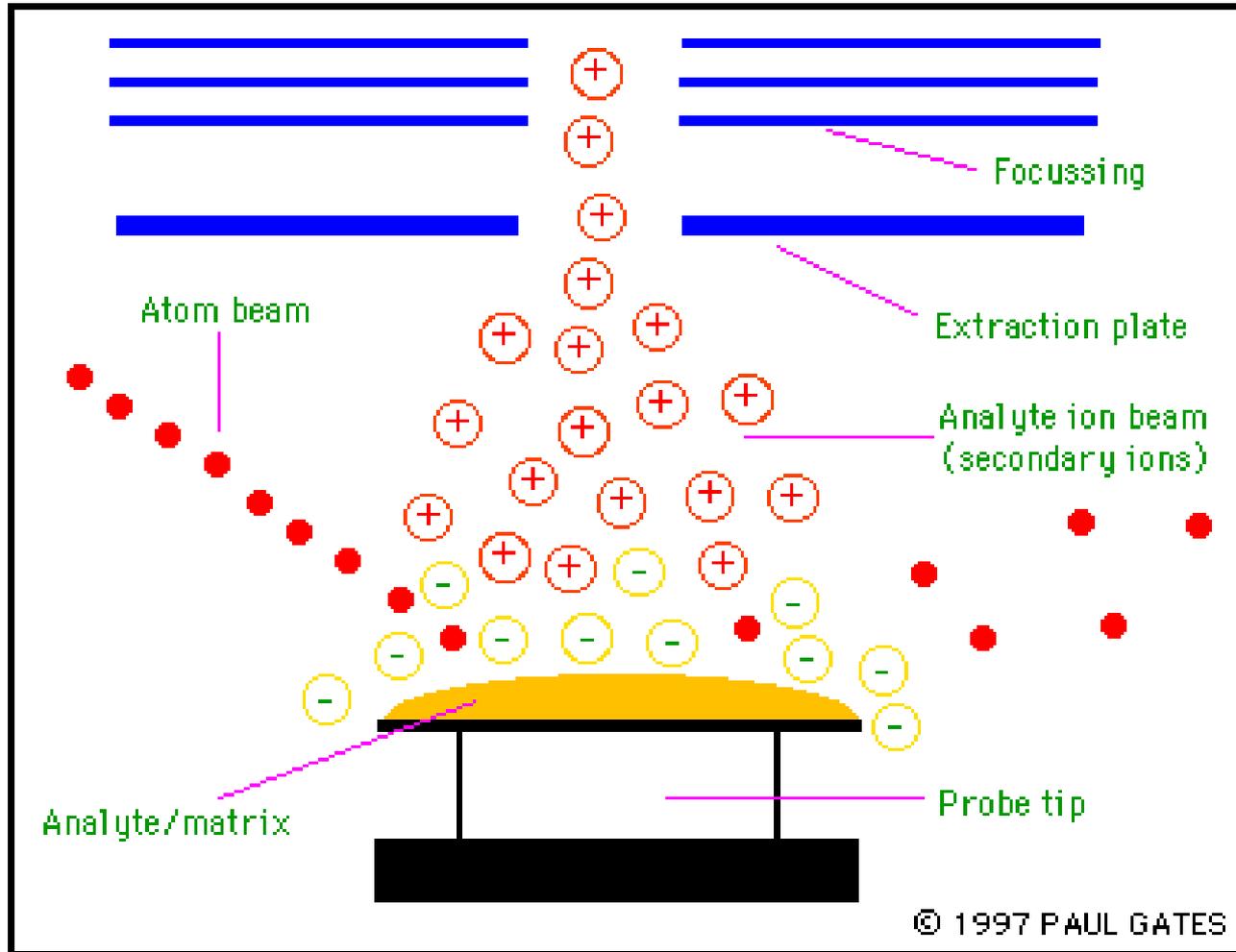
Advantages

- Parent Ion
- Interface to GC
- Insoluble Samples

Disadvantages

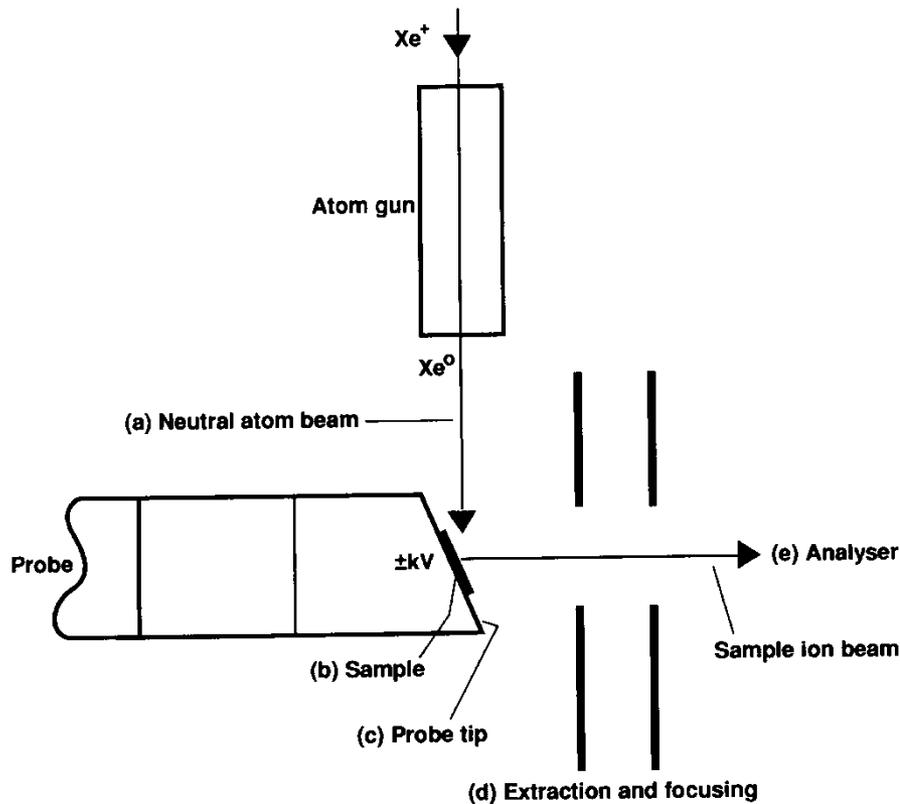
- No Fragment Library
- Need Volatile Sample
- Need Thermal Stability
- Quantitation Difficult
- Low Mass Compounds (<1000 amu)
- Solids Probe Requires Skilled Operator

FAB (fast atom bombardment)



Consiste nel disperdere il campione in una matrice (tipicamente glicerina) su cui vengono sparati atomi pesanti neutri ad elevata velocità.

Gli atomi veloci sono prodotti dal cosiddetto cannone atomico in cui viene introdotto il gas, Ar o Xe, che per effetto di una sorgente elettronica, diventano Ar^+ . oppure Xe^+ .. Questi ioni vengono fatti entrare in una camera di collisione in cui è presente Argon o Xenon gassoso; gli ioni, urtando gli atomi cedono la loro energia cinetica generando così un flusso di atomi neutri che escono dalla camera di collisione ad elevata velocità ed impattano contro la matrice che contiene disperso il campione da analizzare.



Alla fine della camera di collisione vi è un potenziale positivo che provvede a respingere eventuali ioni che con si siano scontrati con Xe o Ar gassoso.

Le matrici del FAB

Glicerolo $C_3H_8O_3$, m/z 92.0473

- La matrice più usata nel FAB
- Scelta migliore per i composti polari
- Utilizzabile per FAB positivi e negativi
- Problemi per la formazione di addotti che complicano la lettura degli spettri

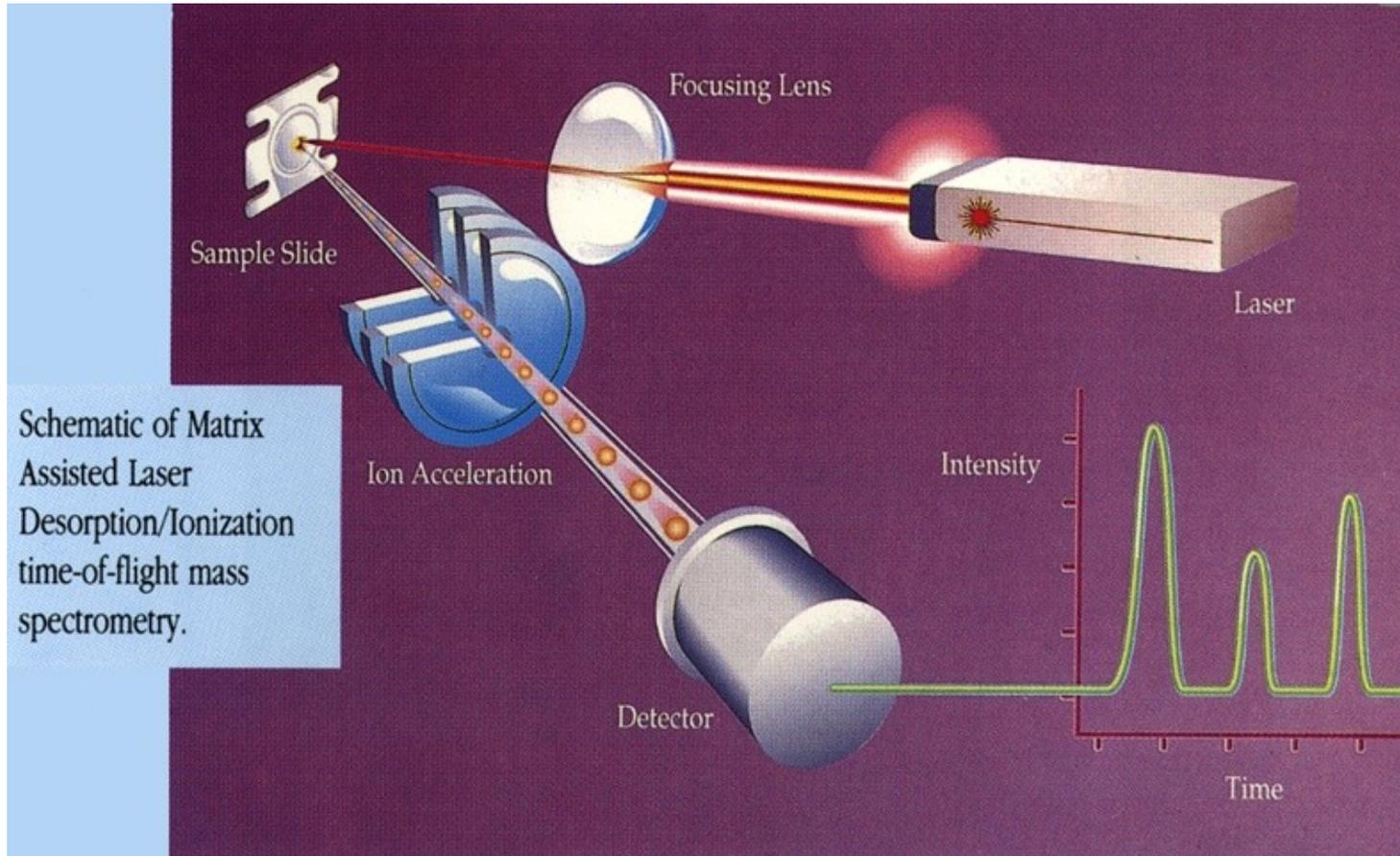
Tioglicerolo $C_3H_8O_2S$, m/z 108.0245

- maggiore acidità
- più volatile del glicerolo
- Problemi per la formazione di addotti che complicano la lettura degli spettri

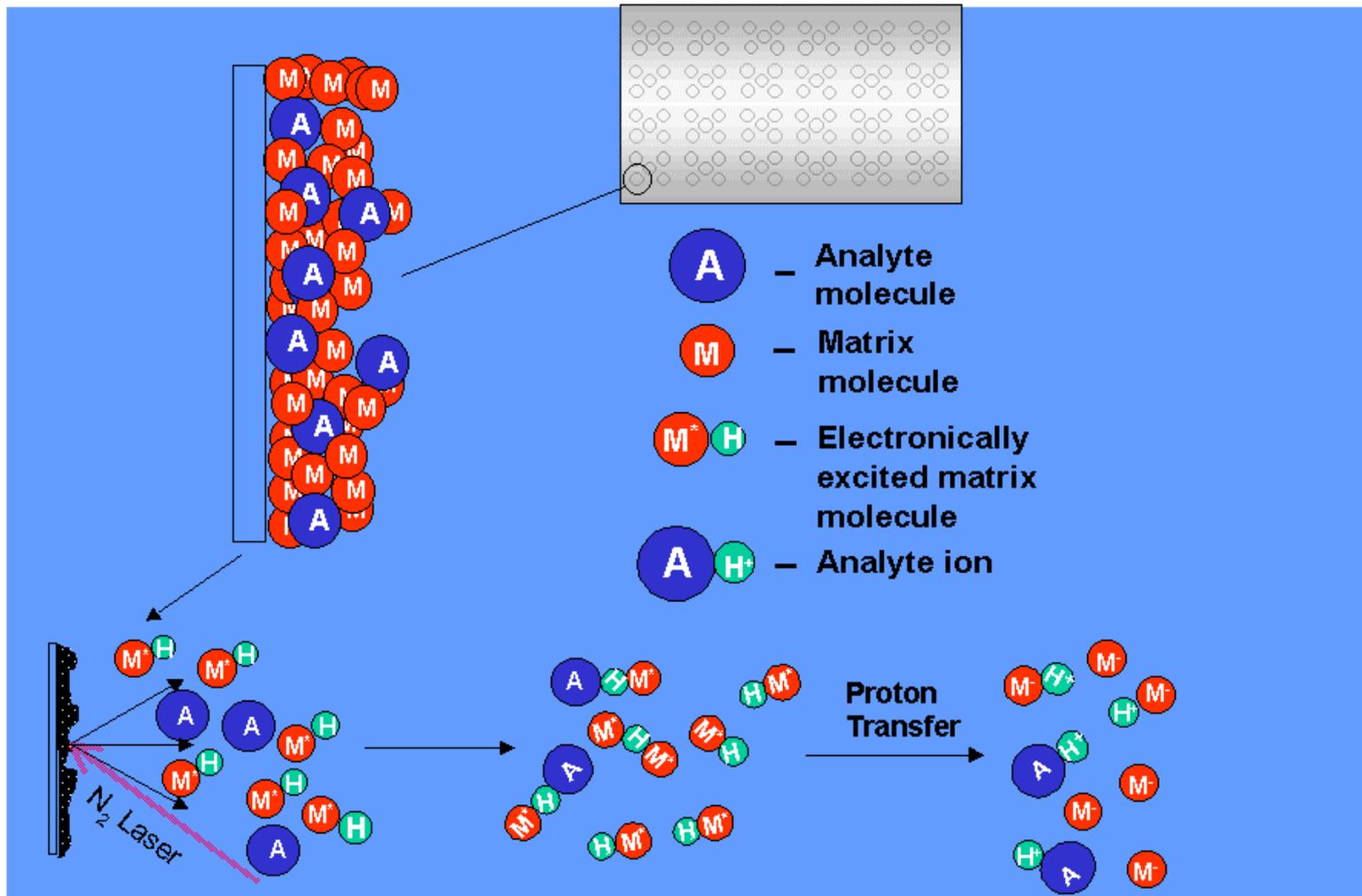
Vantaggi e svantaggi

- **Bassa sensibilità**
- **Limite di massa registrabile: 2000-3000 Dalton**
- **Interferenza della matrice**

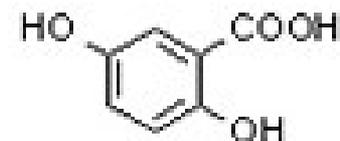
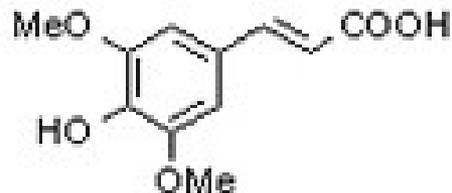
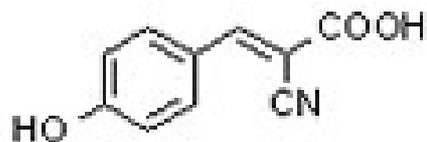
MALDI



La ionizzazione Maldi prevede l'irradiazione con una luce laser (λ 337 nm) di una piccola superficie (100 μm di diametro) in cui è posto il campione, cristallizzato con una matrice, con conseguente riscaldamento dell'area di irradiazione e e vaporizzazione delle molecole organiche .



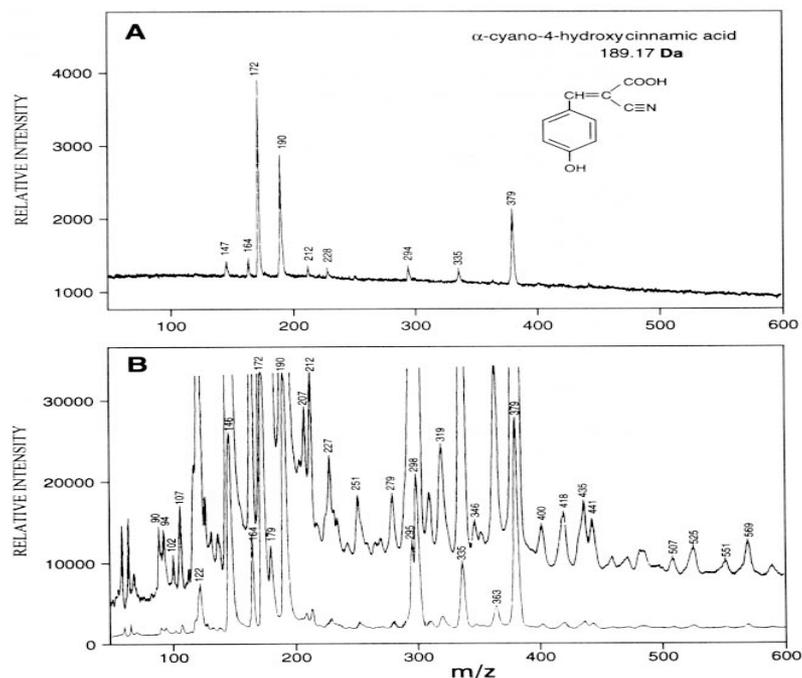
La matrice assorbe energia dall'irradiazione della luce laser, si riscalda e può agire conseguentemente come donatore di protoni formando ioni pseudomolecolari di tipo $[M+H]^+$. Per composti con una elevata affinità per i cationi si possono formare anche addotti di tipo $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$.



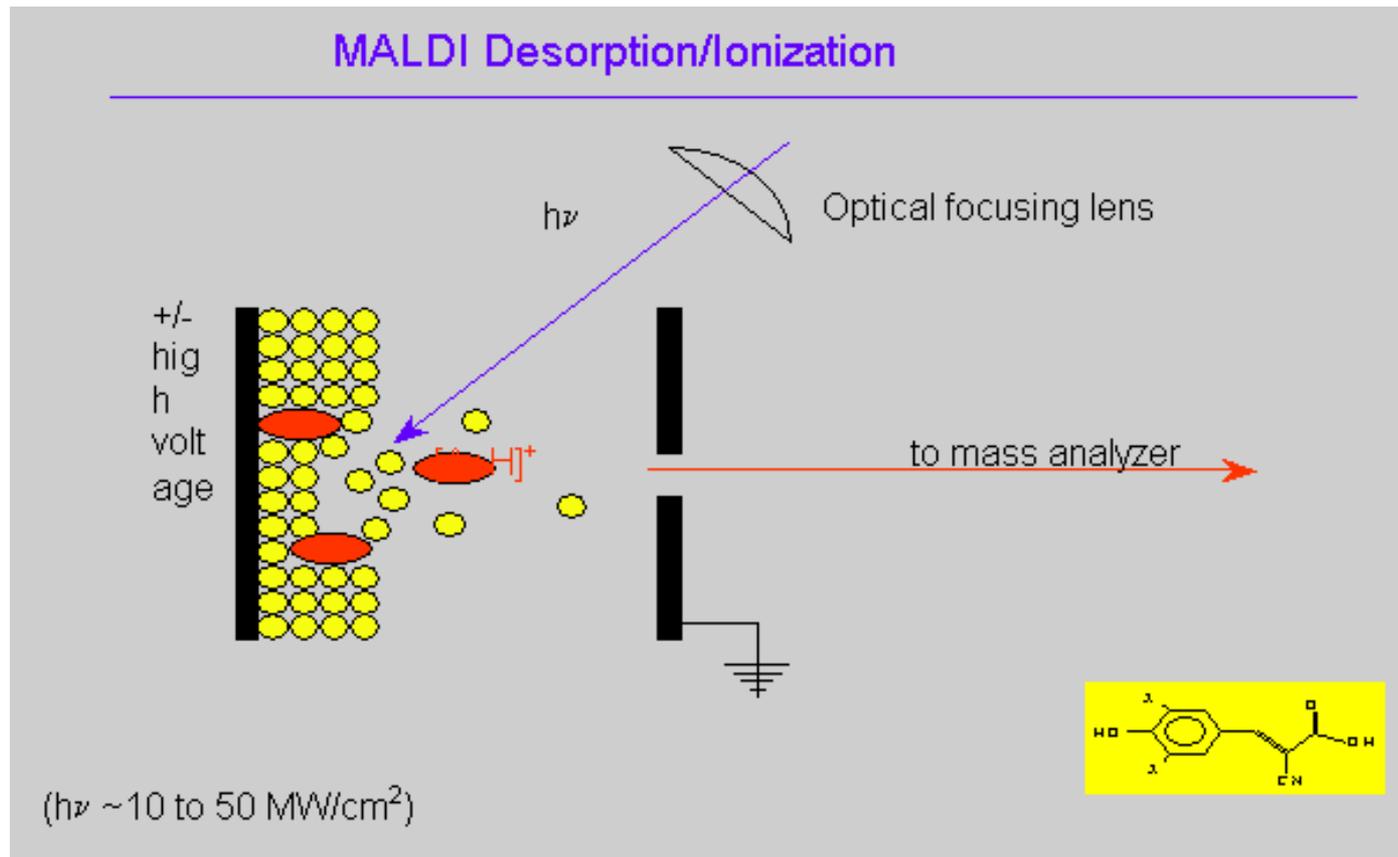
alpha-cyano-hydroxycinnamic acid (CHCA)

sinapinic acid (SA)

2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)



MALDI—Matrix Assisted Laser Desorption Ionization



MALDI

(low femtomole)

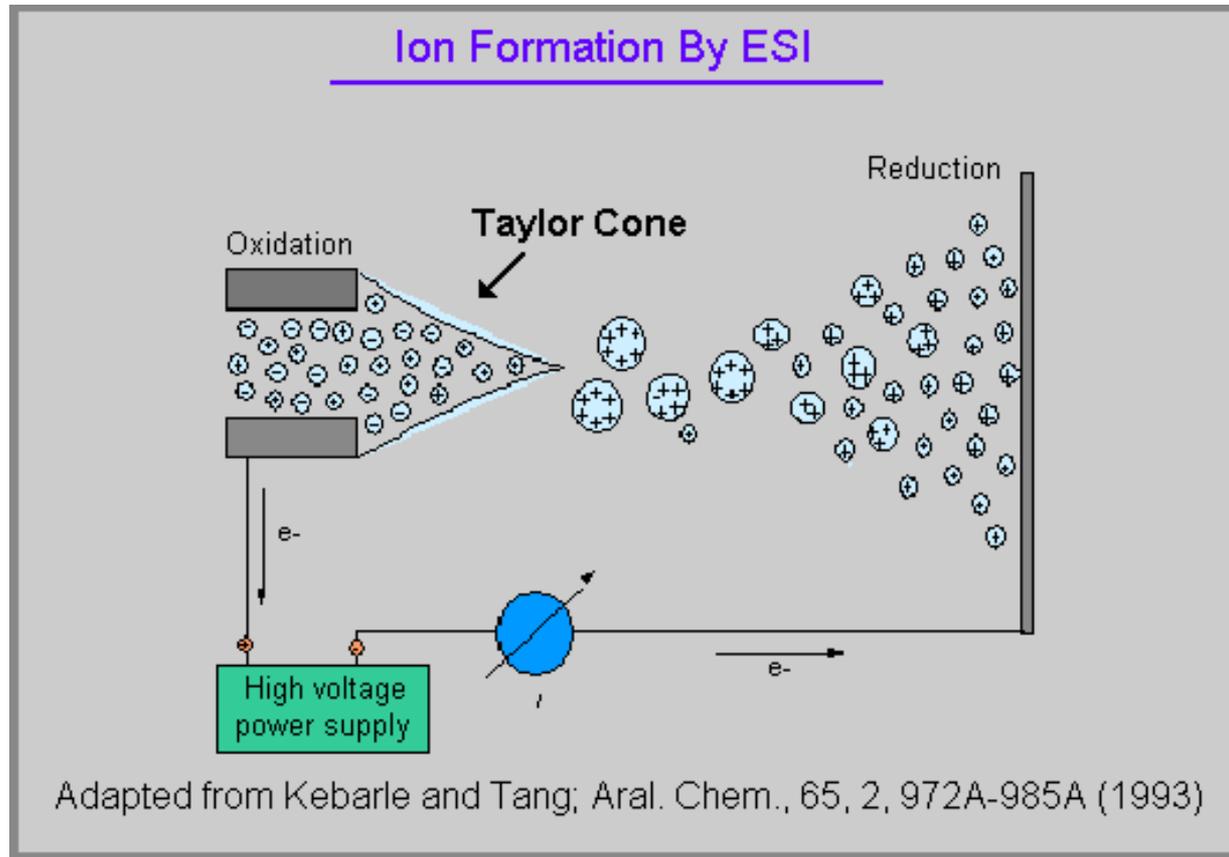
Advantages

- Parent Ion
- High Mass Compounds (>100,000 amu)
- Thermally Labile Compounds (R.T.)
- Easy to Operate

Disadvantages

- No Fragment Library
- Wide variety of matrices
- Quantitation Difficult

ESI—Electrospray Ionization



ESI

(low femtomole to zeptomole)

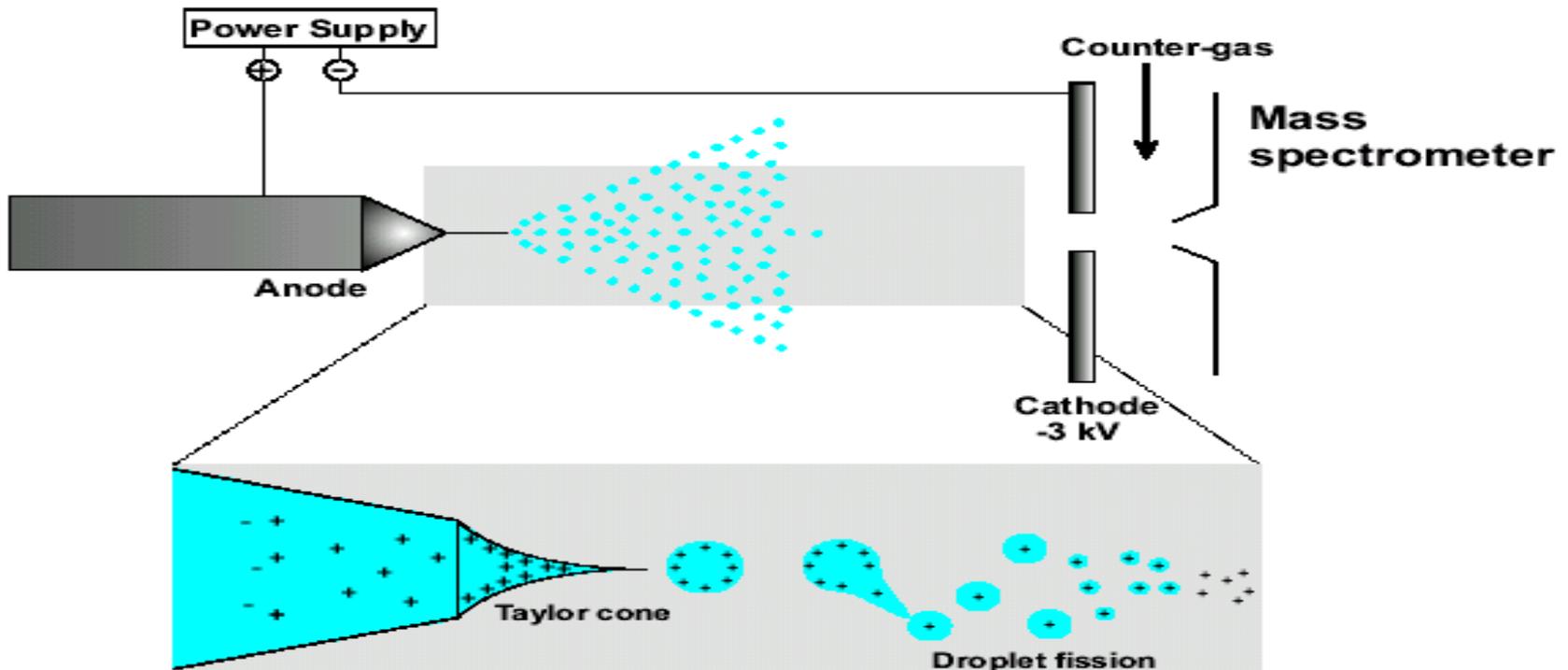
Advantages

- Parent Ion
- High Mass Compounds (>100,000 amu)
- Thermally Labile Compounds (<0° C)
- Easy to Operate
- Interface to HPLC
- Zeptomole sensitivity with nanospray

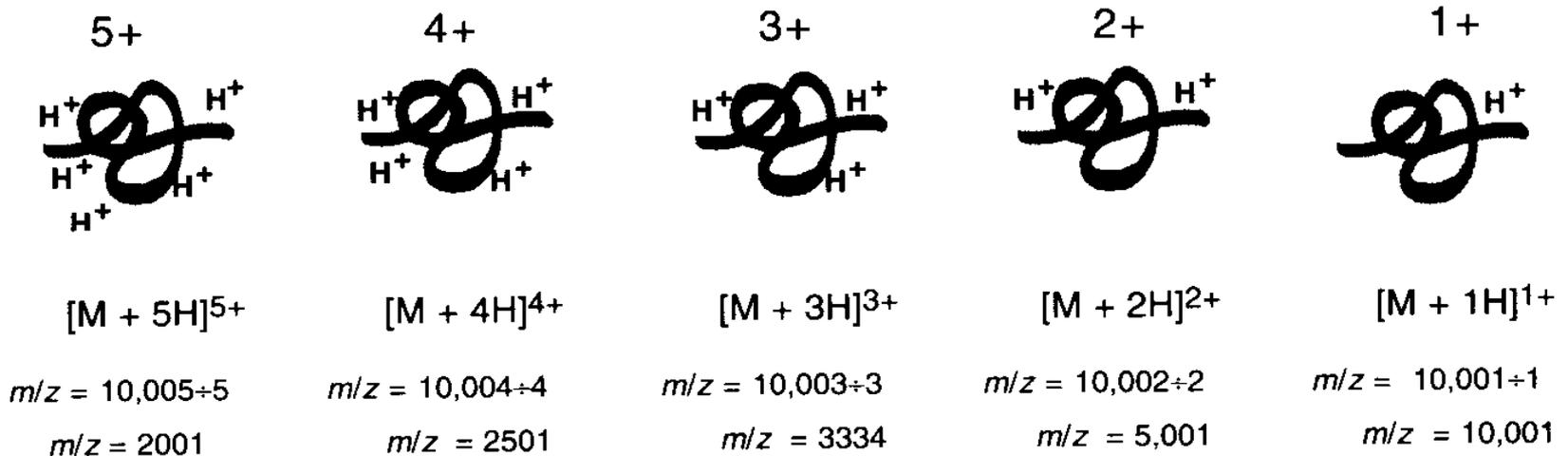
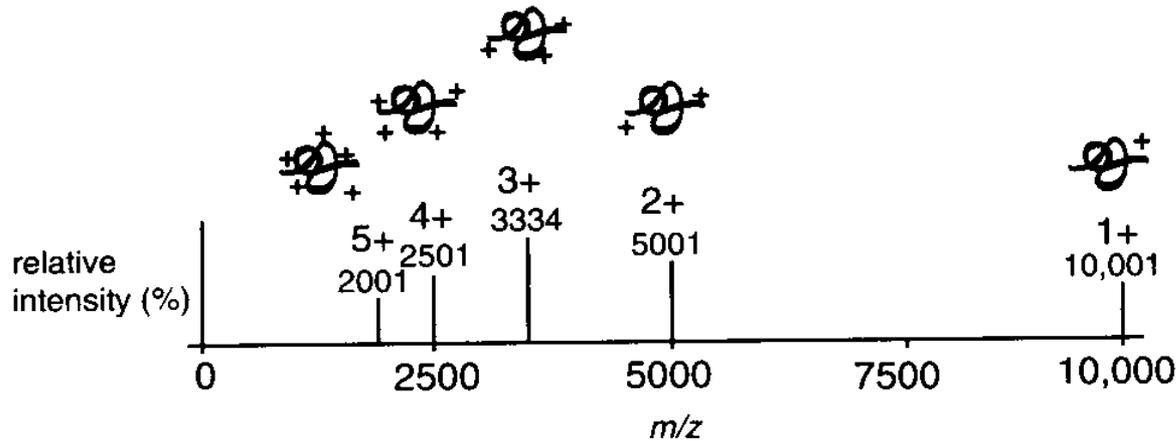
Disadvantages

- No Fragmentation
- Need Polar Sample
- Need Solubility in Polar Solvent (MeOH, ACN, H₂O, Acetone are best)
- Sensitive to Salts
- Suppression

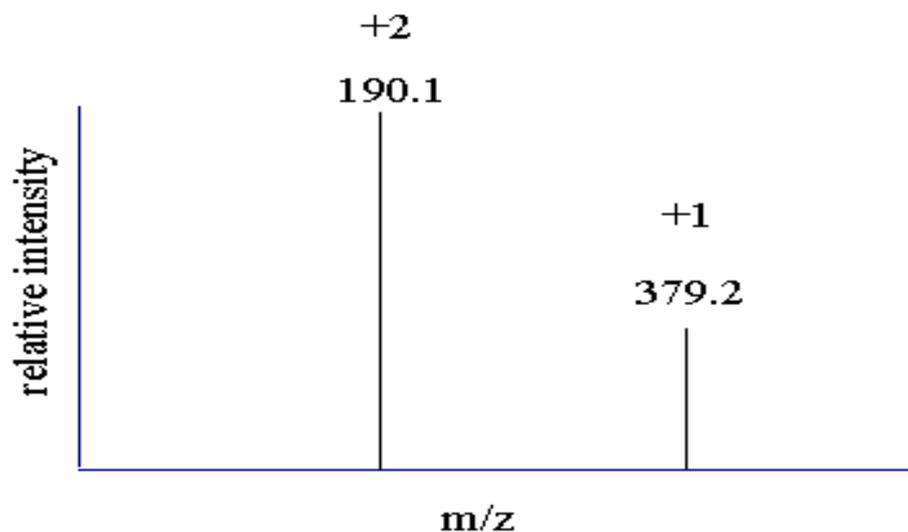
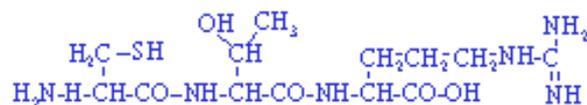
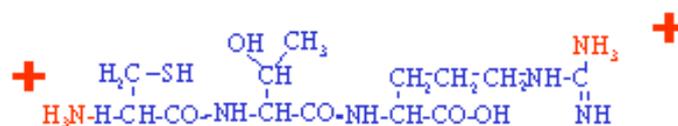
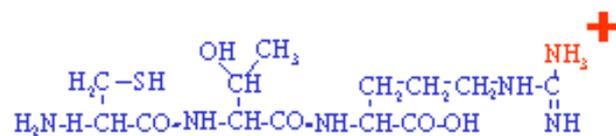
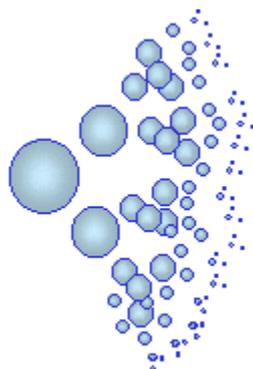
- La sostanza è introdotta in soluzione in un ago capillare e ne fuoriesce sotto forma di aerosol (goccioline di diametro di 1-2mm).
- Tra l'ago e il mantello della camera (elettrodo cilindrico) è creata una differenza di potenziale di alcuni KV che induce sulle goccioline un eccesso di carica positiva.
- A causa delle loro ridotte dimensioni, il solvente evapora rapidamente da ogni gocciolina che diventa sempre più piccola; la densità di carica aumenta finché diventa così alta da determinare l'espulsione di ioni di soluto dalla gocciolina.
- Gli ioni così prodotti sono poi spinti attraverso un sistema di fenditure fino ad entrare nella zona a bassa pressione dove sono accelerate verso l'analizzatore



Una delle caratteristiche dell'ESI è la possibilità di generare ioni multicarica. Per molti composti il numero di cariche è proporzionale alla grandezza del composto in esame per cui il rapporto m/z per le molecole che arrivano all'analizzatore è dell'ordine di 500-2000. Inoltre il numero di cariche assunte dalla molecola dipende sia dalla presenza di gruppi basici che dal pH del solvente.



IonSource.Com



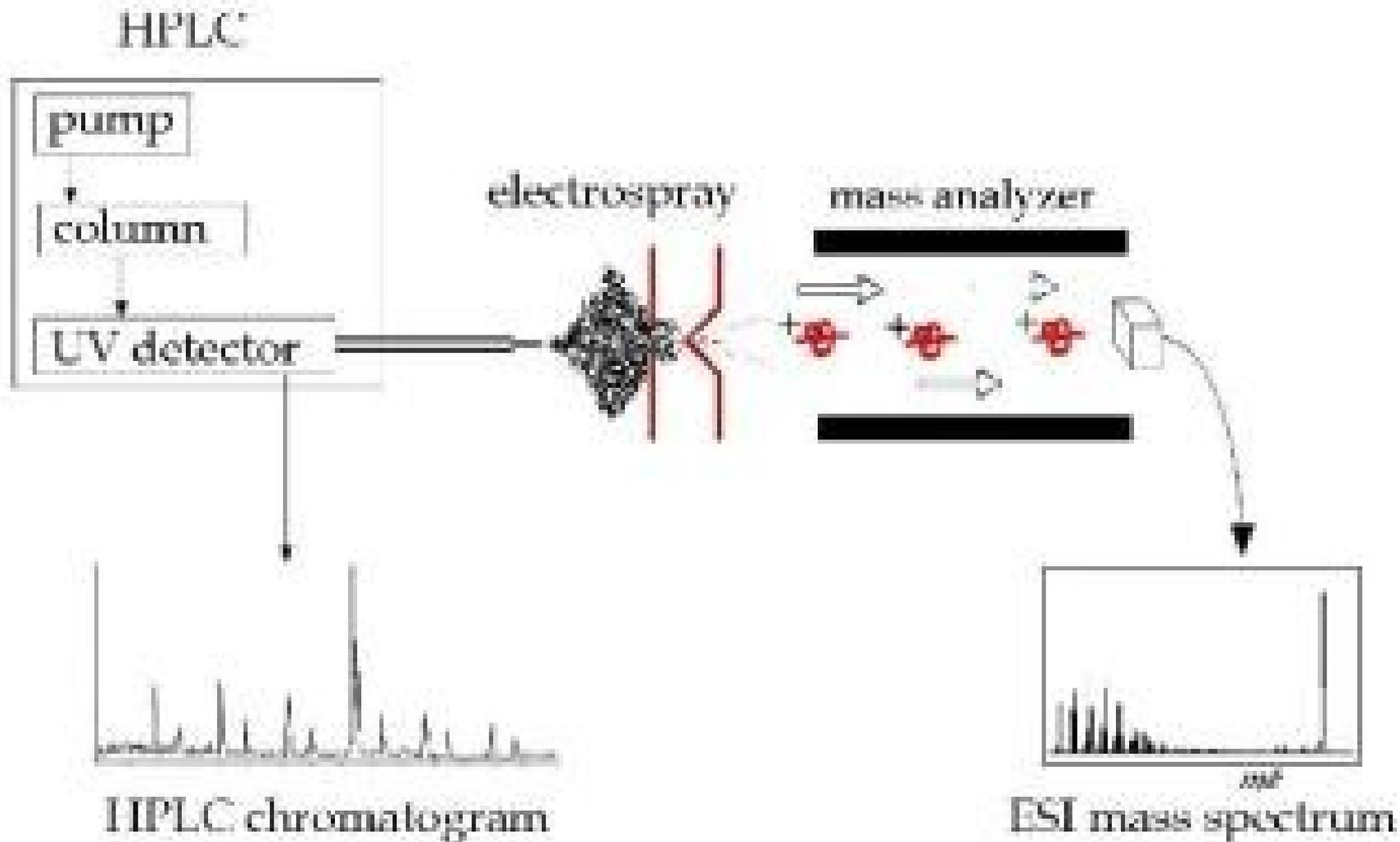
Qual è la massa

Vantaggi e svantaggi

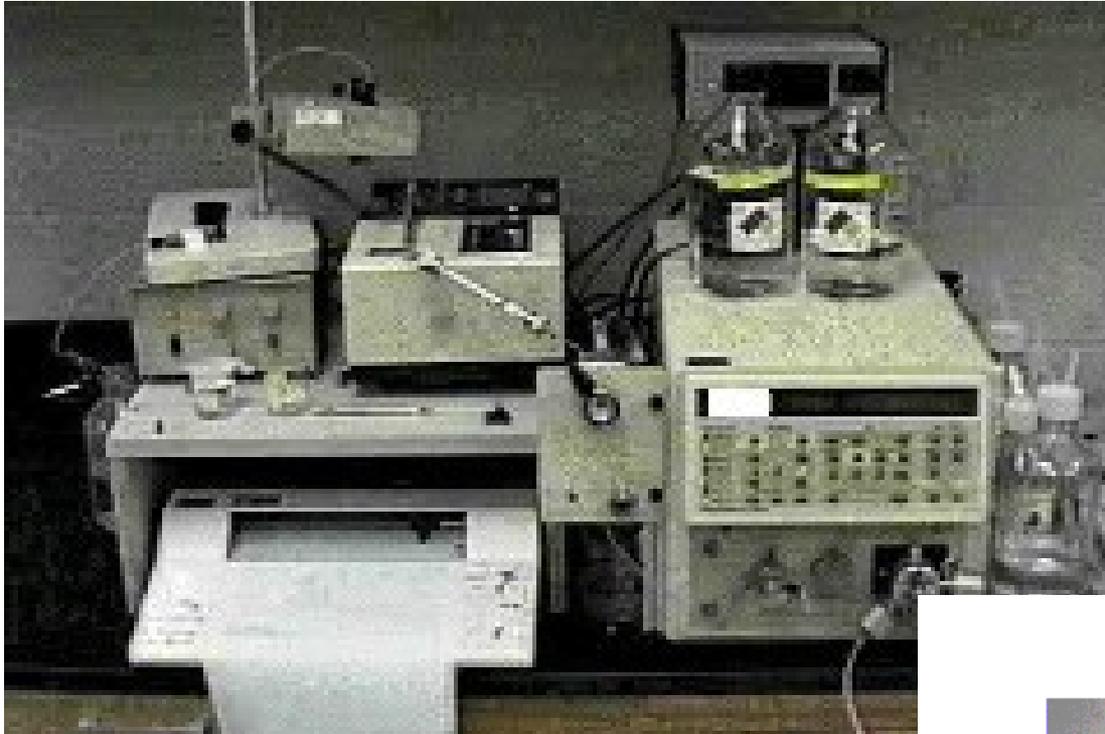
- ✓ **Analisi di molecole molto grandi**
- ✓ **Elevata sensibilità senza interferenza delle matrici**
- ✓ **Assenza di frammentazione**
- ✓ **Accoppiamento con HPLC**
- ✓ **Sistemi MS/MS**
- ✓ **Formazione di ioni multicarica misti con riduzione della sensibilità**

LC-MS

L'ESI è la sorgente di ionizzazione di prima scelta negli apparecchi LC-MS. Il problema da considerare derivano dalla necessità di interfacciare la camera di ionizzazione, che è sotto vuoto spinto, e l'apparecchio HPLC a pressione ordinaria



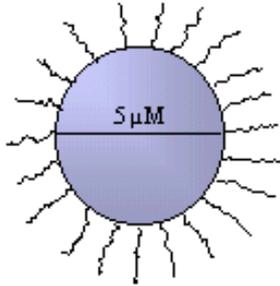
HPLC



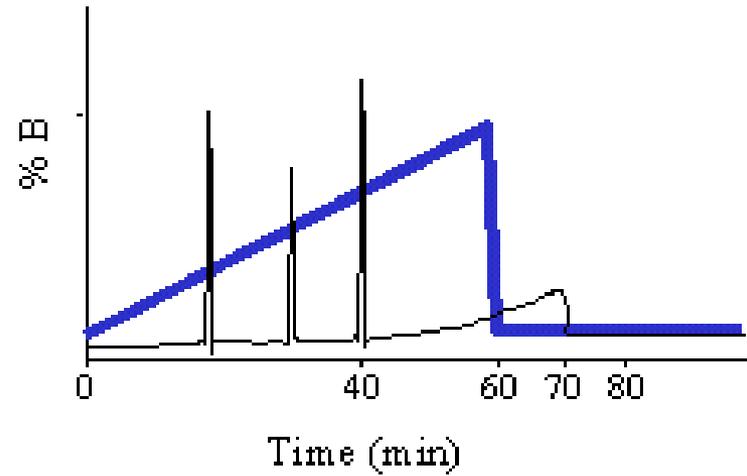
Può essere
Solido-liquido
Liquido-liquido

Column Selection



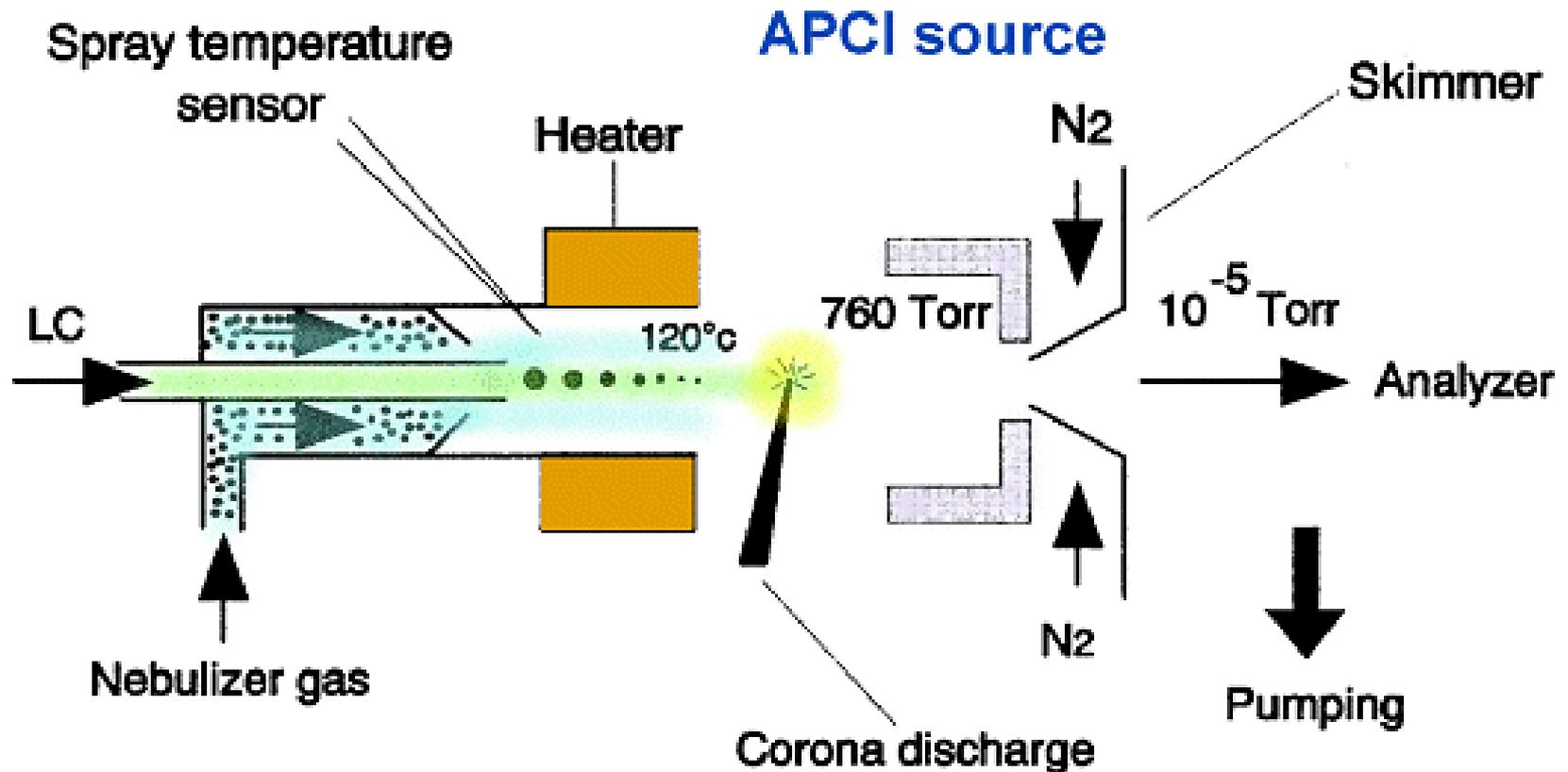


To give you an idea of scale a 5 μM silica particle is 50,000 Å across. You could fit 166,300 Å pores across the equator of this particle. As you can see the C18 chains are not to scale.



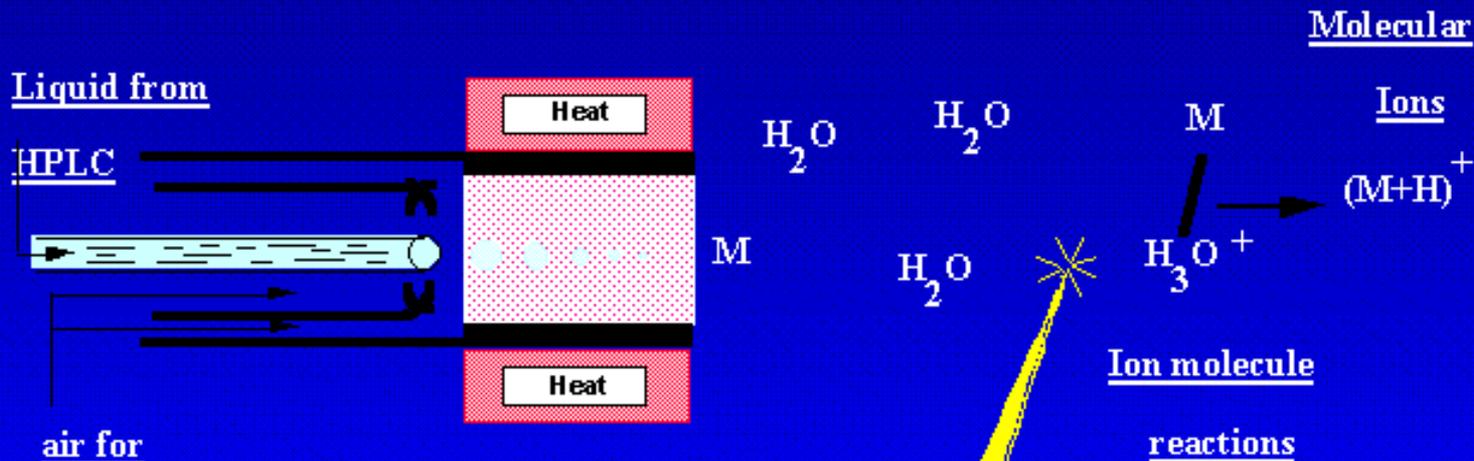
Cromatogramma ottenuto in gradiente

APCI—Atmospheric Pressure Chemical Ionization



Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)

Heated Pneumatic Nebulizer for HPLC Interfacing



★ Nebulization
La nebulizzazione è favorita dal gas

★ Vaporization
La vaporizzazione dal riscaldamento

★ Corona Discharge (6KV)
La ionizzazione da una scarica elettrica

APCI

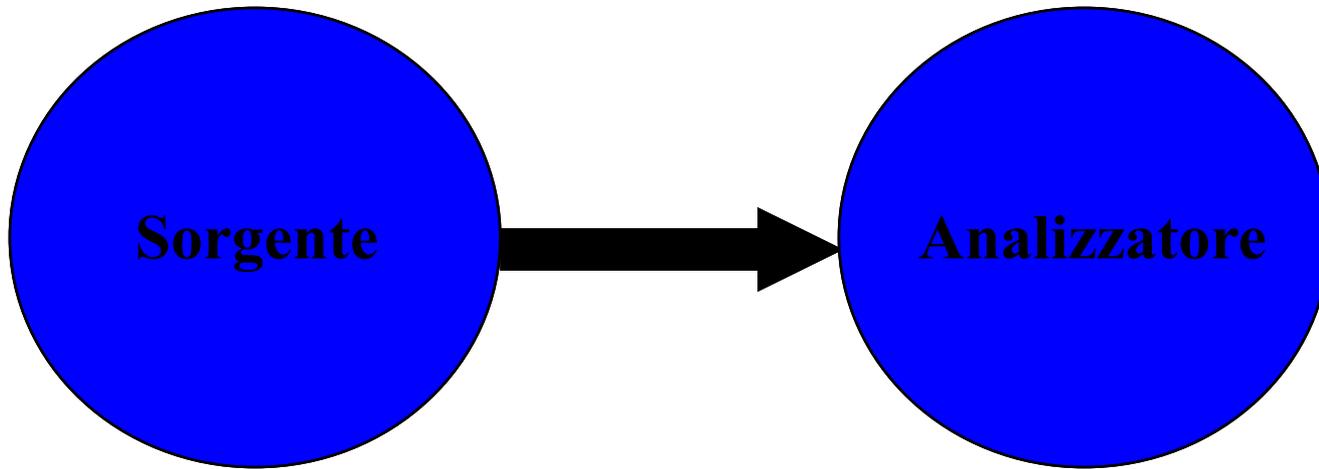
(high femtomole)

Advantages

- Parent Ion
- Insensitive to Salts
- Interface to HPLC
- Can use Normal Phase Solvents
- Handles High Flow Rates

Disadvantages

- Need Volatile Sample
- Need Thermal Stability



Sorgenti:

- Sorgente **EI** (impatto elettronico)
- Sorgente **CI** (ionizzazione chimica)
- Sorgente **FAB** (fast atom bombardment)
- Sorgente **electrospray**
- Sorgente **MALDI** (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization).

Analizzatori:

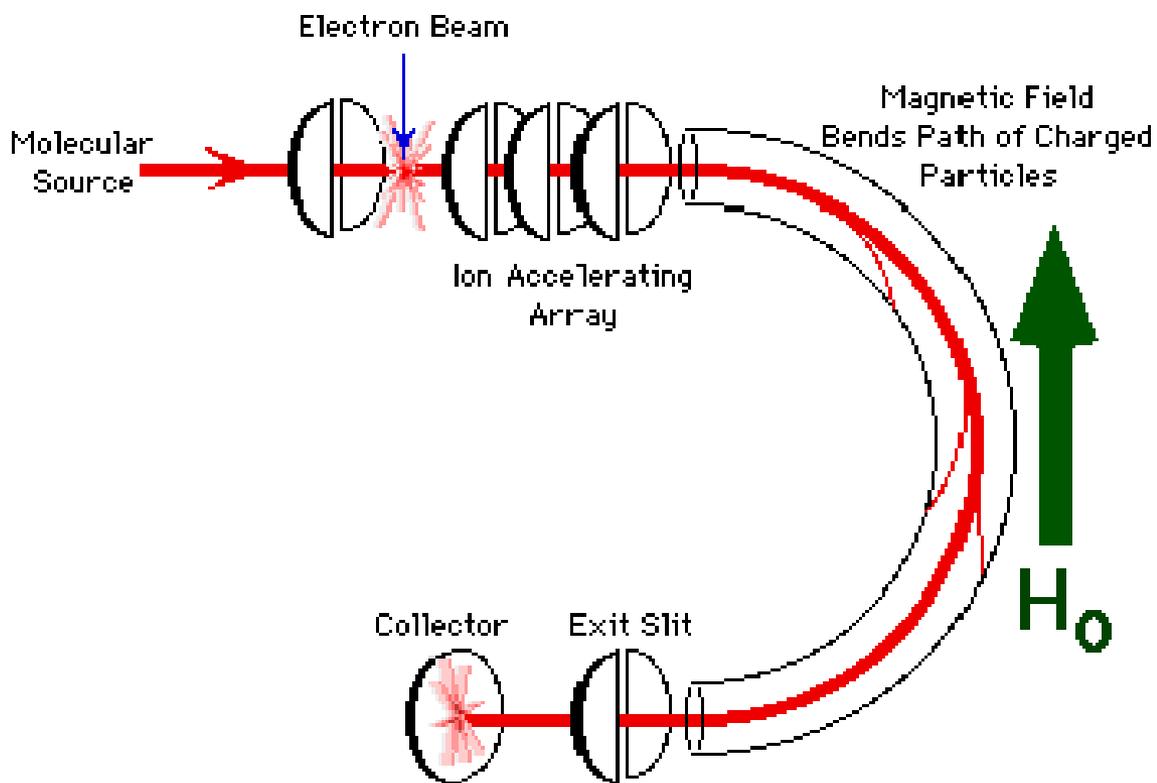
- Analizzatore **magnetico**
- Analizzatore a **quadrupolo**
- Analizzatore a **trappola ionica** (ion-trap)
- Analizzatore **TOF** (time of flight – tempo di volo)

Gli analizzatori

Magnetico

Un campo magnetico è in grado di far deviare particelle cariche in movimento, per cui gli ioni provenienti dalla sorgente possono seguire la curvatura del tubo. L'entità della deviazione dipende dall'intensità del campo magnetico, dall'energia fornita dal potenziale elettrostatico e dal rapporto m/z dello ione. In particolare per ogni valore di potenziale elettrostatico e campo magnetico, solo ioni con un ben preciso rapporto m/z riusciranno ad attraversare la fenditura posta alla fine dell'analizzatore, ed arrivare quindi al collettore di ioni, che genera un segnale elettrico dipendente dall'intensità della corrente ionica che lo colpisce.

Gli ioni sono accelerati da un intenso potenziale elettrostatico verso l'analizzatore.



Double-Focusing Magnetic Sector

Advantages

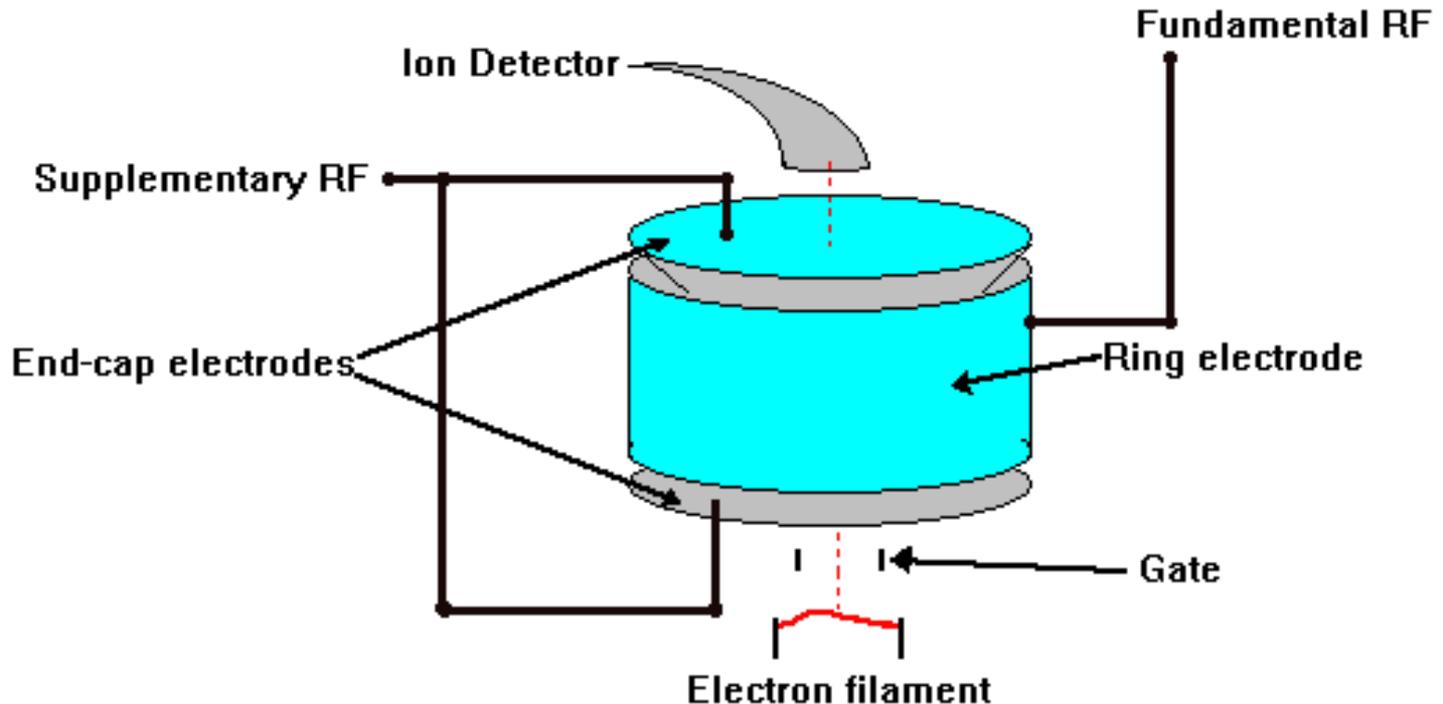
- Very High Resolution (60,000)
- High Accuracy (<5 ppm)
- 10,000 Mass Range

Disadvantages

- Very Expensive
- Requires Skilled Operator
- Difficult to Interface to ESI
- Low resolution MS/MS without multiple analyzers

Ion trap

La trappola ionica è un analizzatore a quadrupolo con barre iperboliche piegato su se stesso in modo da formare un anello. L'elettrodo centrale (il "buco della ciambella") è eliminato, ed il voltaggio continuo ed alternato sono applicati tra l'elettrodo esterno e gli elettrodi inferiore e superiore, che diventano due superfici convesse. Due piccoli buchi sugli elettrodi inferiore e superiore permettono la introduzione e l'uscita degli ioni. E' possibile intrappolare per un tempo lungo a piacere gli ioni e farli frammentare grazie alla presenza di un gas.



Quadrupole Ion Trap

Advantages

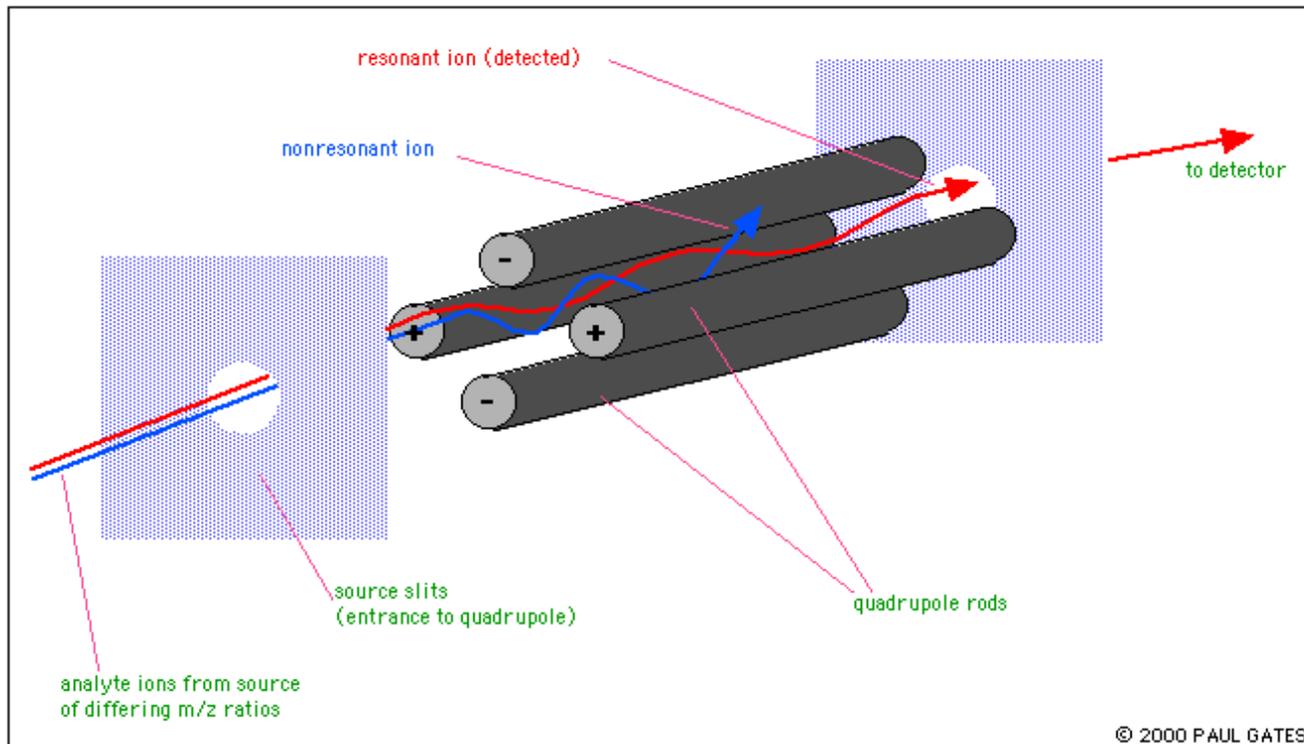
- Inexpensive
- Easily Interfaced to Many Ionization Methods
- MS/MS in one analyzer

Disadvantages

- Low Resolution (<4000)
- Low Accuracy (>100ppm)
- Space Charging Causes Mass Shifts
- Low Mass Range (<4000)
- Slow Scanning

Quadrupolo

L'analizzatore a quadrupolo consiste in un tubo rettilineo in cui è fatto il vuoto ed in cui sono presenti quattro barre parallele, disposte simmetricamente intorno all'asse del tubo, di sezione circolare oppure iperbolica. Le barre diametralmente opposte sono in contatto elettrico tra di loro, mentre tra barre adiacenti è applicata un voltaggio formato da due componenti: una differenza di potenziale continua e una oscillante ad alta frequenza. **Lo ione entra nell'analizzatore parallelamente all'asse z , ed è spinto dai campi elettrici continuo e oscillante a seguire una traiettoria a spirale .**



$$+\Phi_0 = +(U - V \cos wt)$$

$$-\Phi_0 = -(U - V \cos wt)$$

$$\Phi = \Phi_0 \frac{x^2 - y^2}{r_0} = \frac{(x^2 - y^2)(U - V \cos wt)}{r_0}$$

$$F_x = m \frac{d^2x}{dt^2} = -Ze \frac{\partial \Phi}{\partial x}$$

$$F_y = m \frac{d^2y}{dt^2} = -Ze \frac{\partial \Phi}{\partial y}$$

$$m \frac{d^2x}{dt^2} + \frac{2Ze}{mr_0^2} (U - V \cos wt)x = 0$$

$$m \frac{d^2y}{dt^2} + \frac{2Ze}{mr_0^2} (U - V \cos wt)y = 0$$

Quadrupole Mass Filter

Advantages

- Inexpensive
- Easily Interfaced to Many Ionization Methods

Disadvantages

- Low Resolution (<4000)
- Low Accuracy (>100ppm)
- MS/MS requires multiple analyzers
- Low Mass Range (<4000)
- Slow Scanning

II TOF

Il TOF è un tubo vuoto non sottoposto a campo elettrico e magnetico in cui è fatto il vuoto e si basa sul principio che ioni di differente m/z acquistano, nella fase di accelerazione, differenti velocità.

$$v = (2zV_{acc} / m)^{1/2}$$

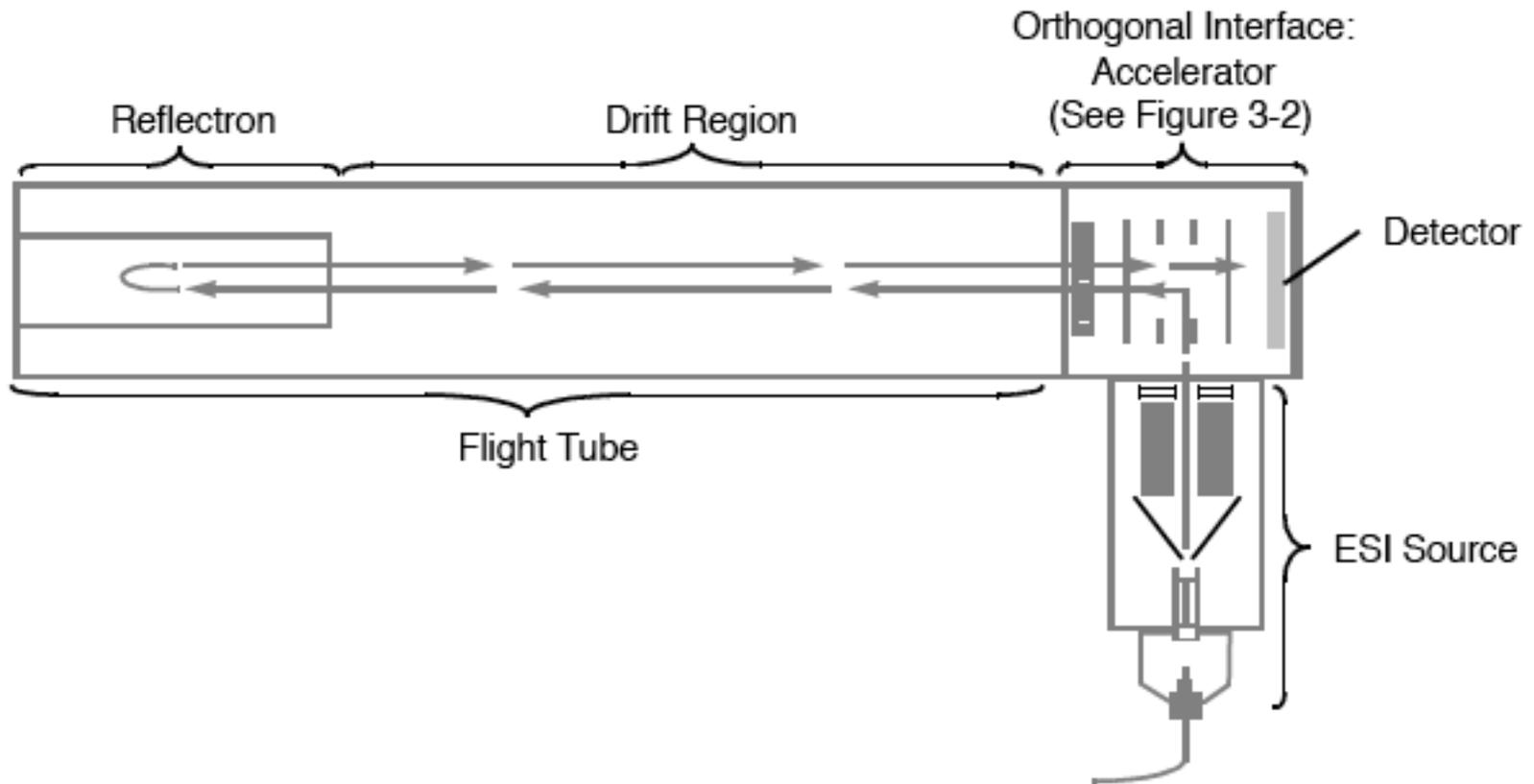
Per cui impiegheranno tempi differenti per percorrere un determinato spazio L

$$t = (m/2zV_{acc})^{1/2}L$$

Elaborando questa espressione si ottiene la relazione tra tempo di volo e rapporto massa/carica:

$$t = a (m/z)^{1/2} + b$$

Reflectron Time-of-Flight (TOF)

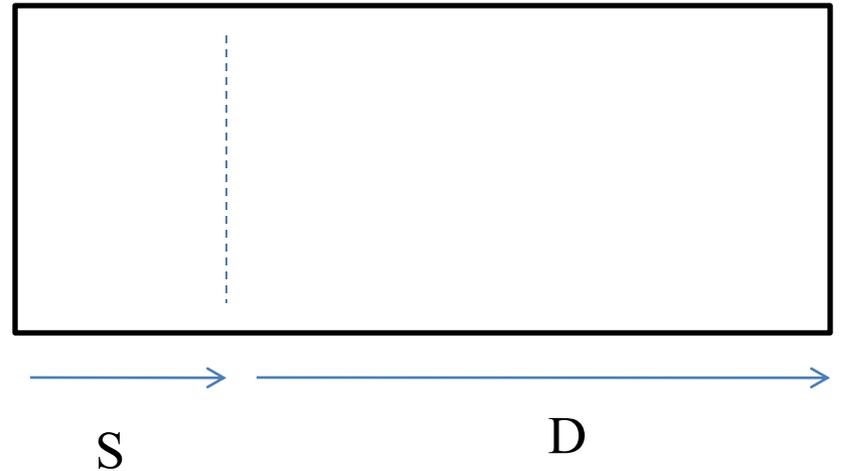


$$\frac{1}{2}mv^2 = ZeEs$$

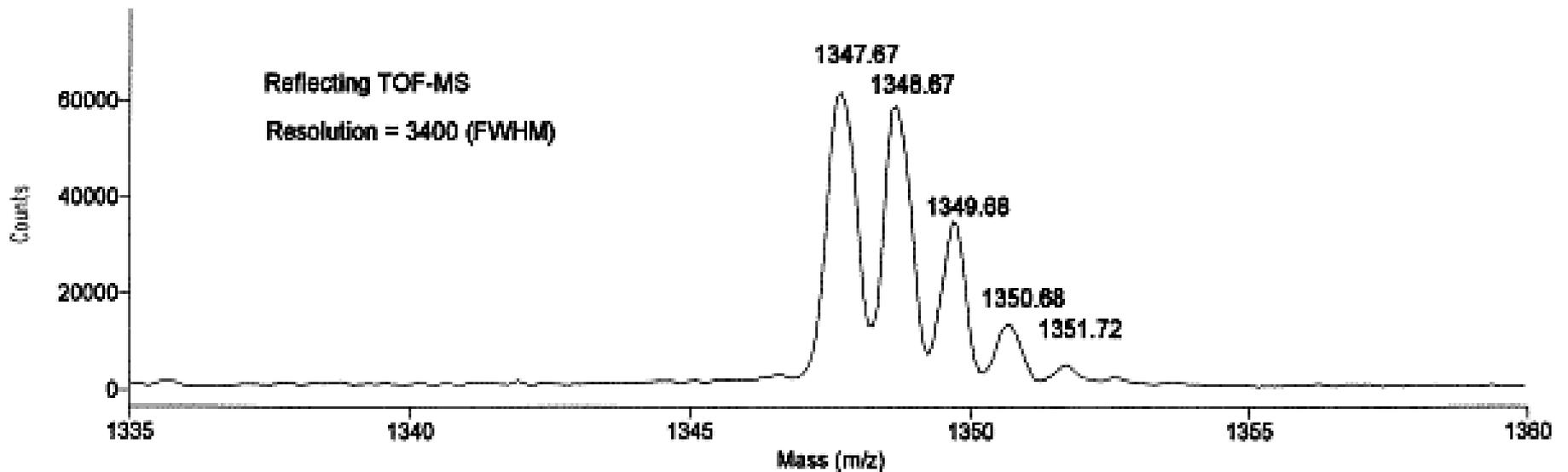
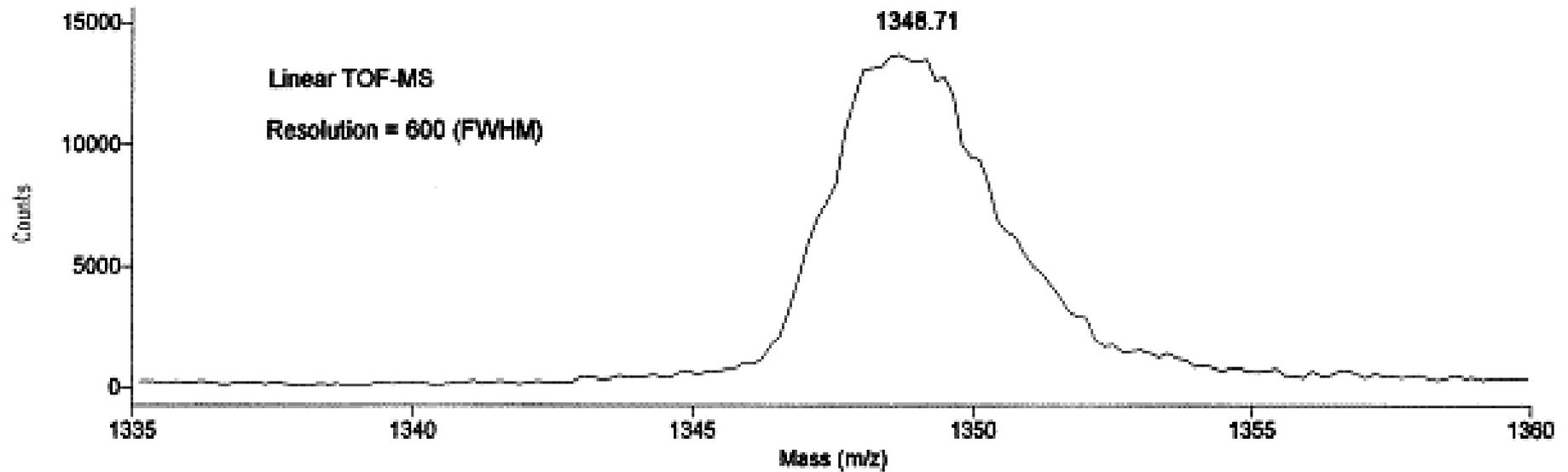
$$v = \left(\frac{2ZeEs}{m}\right)^{\frac{1}{2}}$$

$$t = \frac{D}{v} = \left(\frac{m}{2ZeEs}\right)^{\frac{1}{2}} D$$

$$\frac{m}{Z} = 2eEs \left(\frac{t}{D}\right)^2$$



Risoluzione



Reflectron Time-of-Flight (TOF)

Advantages

- High Resolution (>20,000 in some models)
- High Accuracy (<5ppm)
- 10,000 Mass Range
- Fast Scanning

Disadvantages

- Low Resolution for MS/MS (PSD)

Linear Time-of-Flight (TOF)

Advantages

- Extremely High Mass Range (>1 MDa)
- Fast Scanning

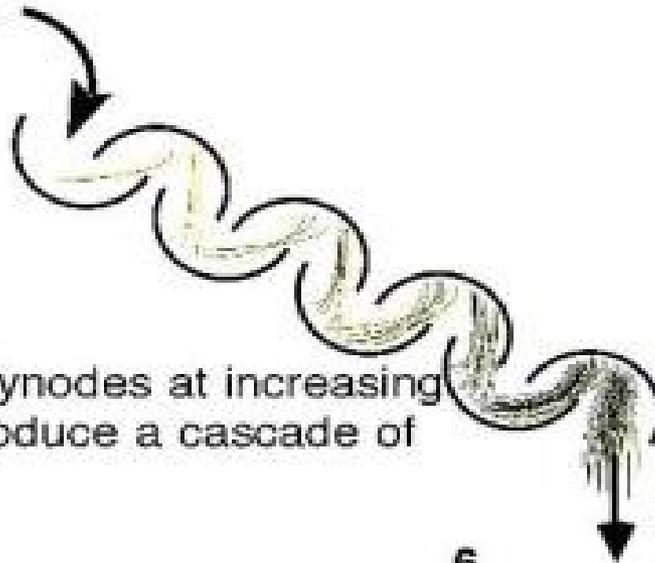
Disadvantages

- Low Resolution (4000)
- Low Accuracy (>200ppm)
- MS/MS not possible

Il detector

Il detector converte l'energia cinetica delle particelle in arrivo in segnale elettrico. Sia ioni che particelle neutre dotate di energia cinetica passano attraverso la zona di volo alla cui fine è posto un dinodo. Quest'ultimo rappresenta una speciale superficie capace di emettere una corrente di elettroni in risposta all'urto con una particella dotata di energia cinetica. A causa di una differenza di potenziale positiva, la corrente elettrica giunge ad un secondo dinodo e causa un rilascio di corrente amplificata.

one ion in



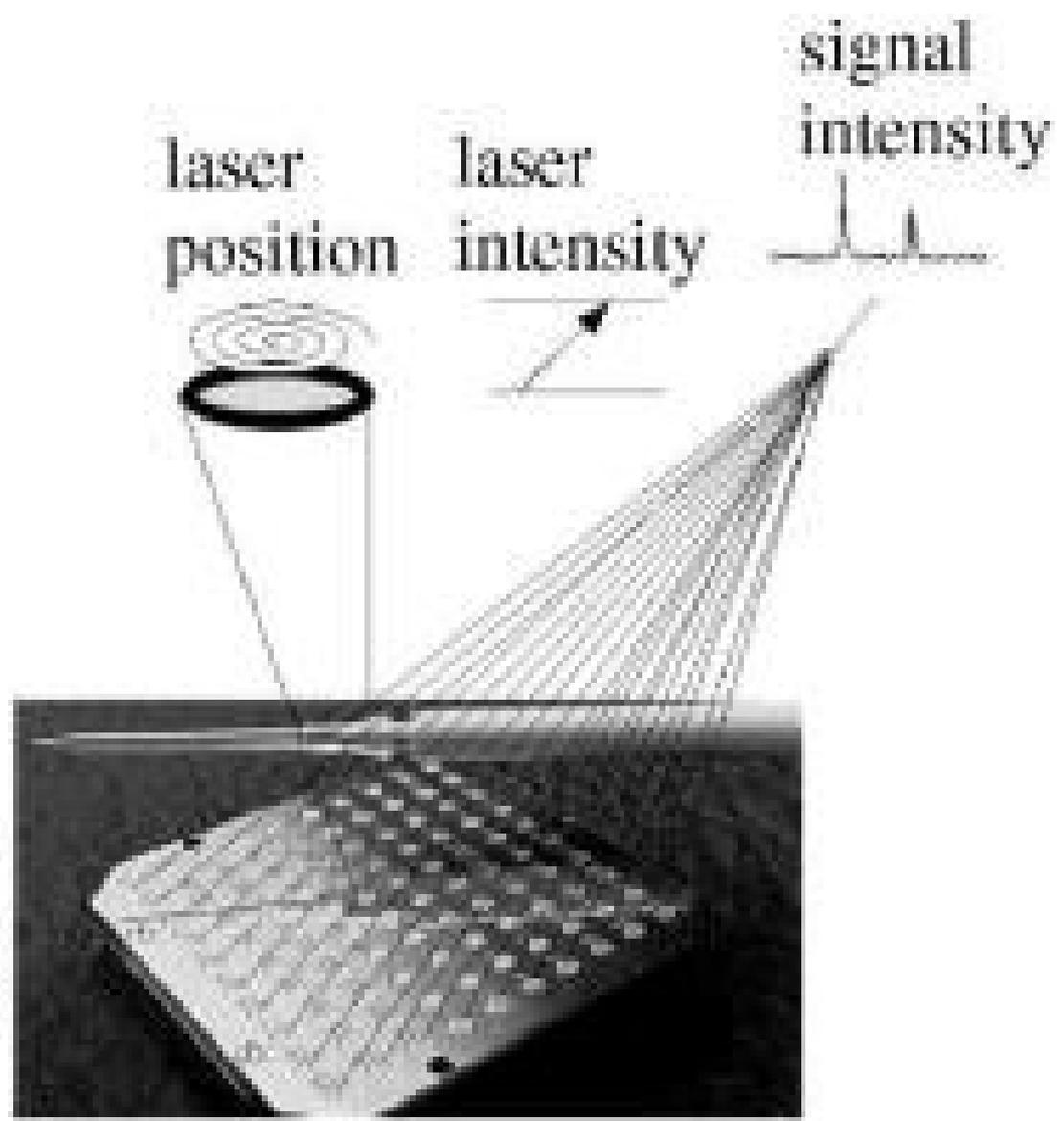
A series of dynodes at increasing potentials produce a cascade of electrons.

10^6 electrons out

La spettrometria di massa è un metodo molto potente per analizzare la struttura dei composti organici ma ha tre limitazioni fondamentali:

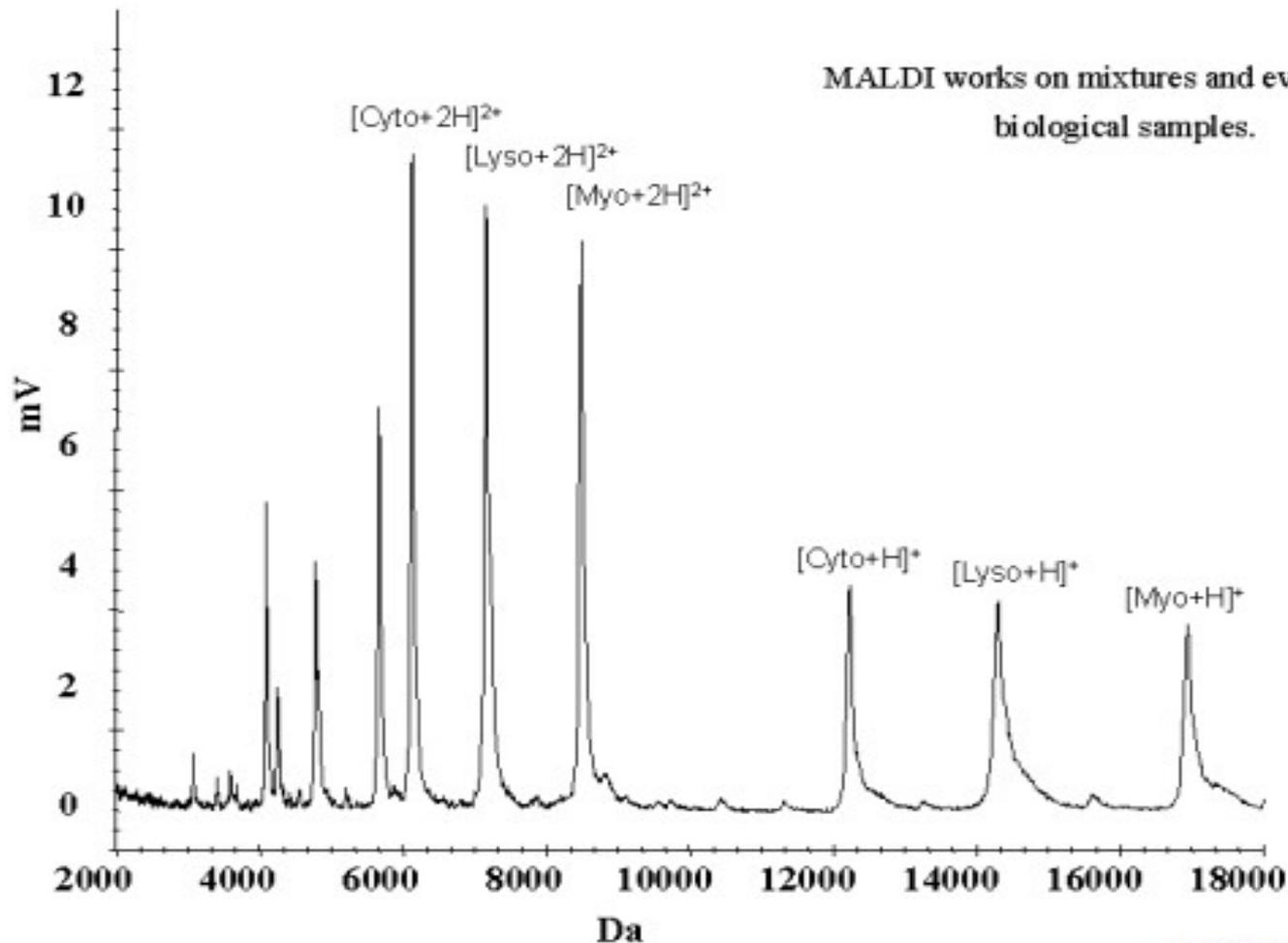
- 1 I composti possono essere caratterizzati solo con campioni molto puliti**
- 2 Questa tecnica non ha la capacità di dare una analisi sensibile e selettiva alla miscela complessa.**
- 3 Per grandi molecole come i peptidi gli spettri sono molto complessi e difficile da interpretare.**

multiple sample
analysis with
MALDI



Profiler MALDI-TOF

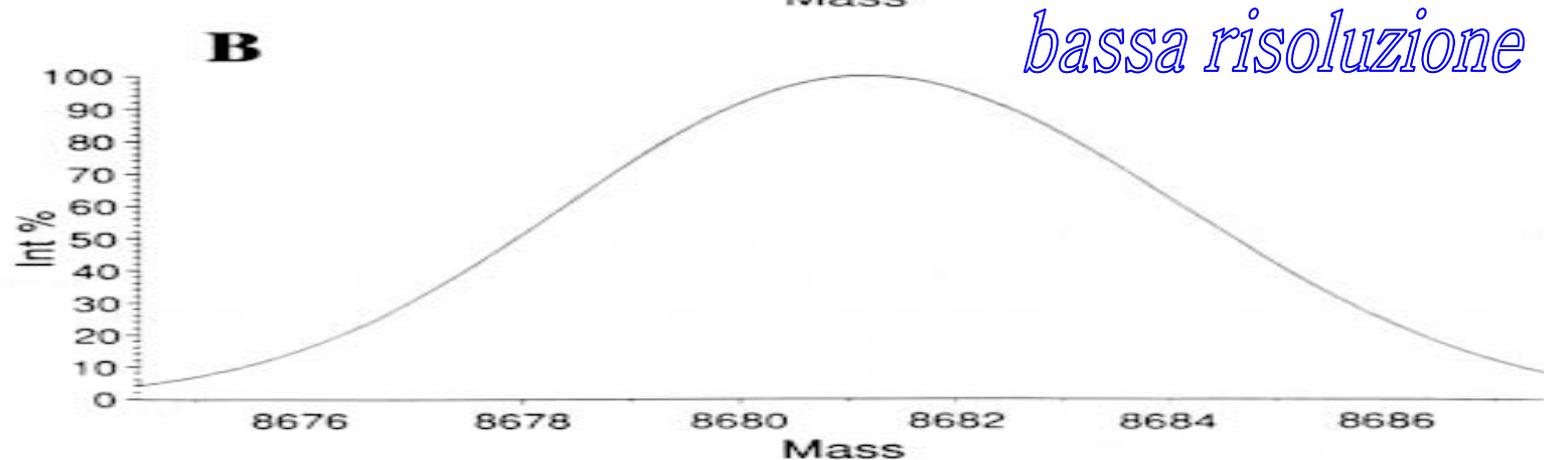
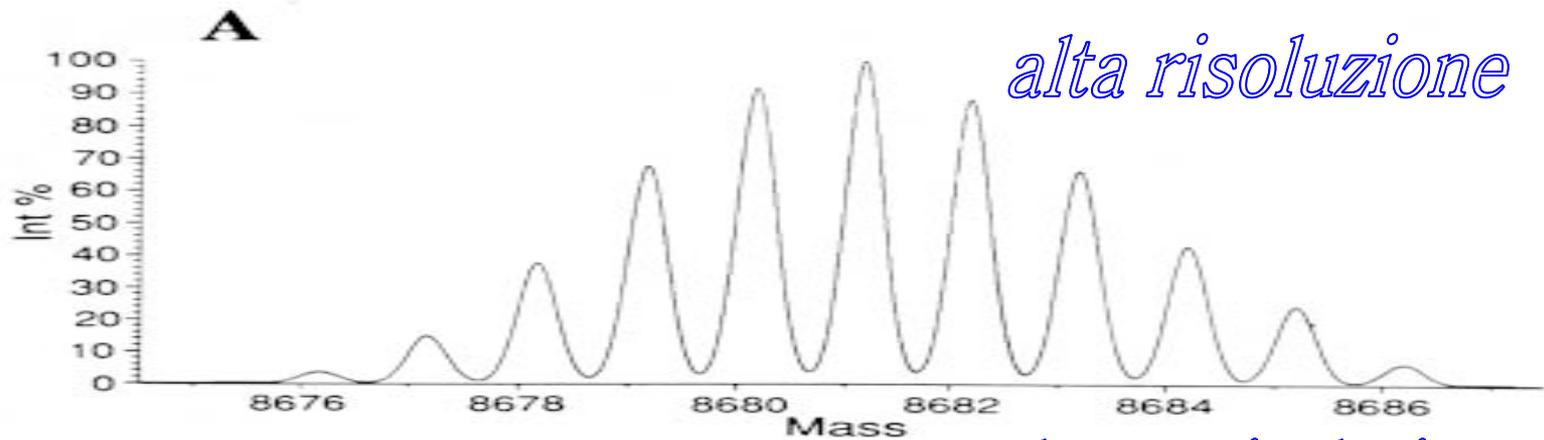
Protein Mixture



Informazioni ottenibili dalla spettrometria di massa di un polipeptide.

- ✓ **Peso molecolare**
- ✓ **Sequenza amminoacidica dallo studio delle frammentazioni**

Esempio lo spettro di massa della proinsulina bovina di formula molecolare $C_{381}H_{586}N_{107}O_{114}S_6$ non mostra un solo picco corrispondente allo ione molecolare $[M+H]^+$ a m/z 8676.1 (massa monoisotopica), ma un insieme di picchi che tengono conto della distribuzione isotopica. Il picco a maggiore intensità ha massa nominale di 8681 ed è esso stesso costituito da 10 differenti specie isotopiche. In totale i picchi presenti nello spettro contengono 62 specie isotopiche.



Spettrometria di massa tandem

MS/MS

Utilissima per l'analisi di miscele

Ci sono due analizzatori in serie separati da una camera di collisione dove la frammentazione è indotta per impatto con un gas inerte

- ✓ Si registra lo spettro della miscela mettendo in linea MS1 e MS2 in modo da far giungere tutti gli ioni prodotti dalla sorgente al detector
- ✓ Si tara MS1 in modo da consentire l'uscita di un determinato ione
- ✓ Lo ione giunge nella camera di collisione, genererà dei frammenti che saranno analizzati da MS2 e registrati dal detector

