La spettrometria di massa nel 2002
Dalla proteomica alla chimica dell'atmosfera

di Lorenza Operti

Nel corso di "Massa 2002" sono state affrontate numerose tematiche (biomedicina, prodotti naturali, farmaceutica, inquinamento, alimenti, doping, chimica ionica gassosa, beni culturali, organometallica e chimica dell'atmosfera), trattando sia la messa a punto di metodi sperimentali sia applicazioni reali. Vengono qui descritti in dettaglio due campi di frontiera della spettrometria di massa: la SM "imaging" (processi cellulari) e la SM di neutralizzazione-reionizzazione (chimica dell'atmosfera).

Il Congresso Nazionale della Divisione di Spettrometria di Massa della Sci "Massa 2002" si è svolto lo scorso giugno a Cetraro (CS), organizzato congiuntamente dalle Università della Calabria (G. Sindona, A. Napoli), di Catania (S. Foti) e di Palermo (L. Ceraulo).
Come di consuetudine, ogni mezza giornata era dedicata ad una o più tematiche definite, iniziando con una conferenza plenaria ed una key-note ad invito e proseguendo con comunicazioni orali e poster. Gli argomenti affrontati hanno riguardato la biomedicina, i prodotti naturali, la farmaceutica, l'inquinamento, gli alimenti, il doping, la chimica ionica gassosa, i beni culturali, la chimica organometallica e la chimica dell'atmosfera. Le relazioni hanno trattato sia la messa a punto di nuove metodiche sperimentali per migliorare sempre di più le prestazioni strumentali dal punto di vista di sensibilità, rapidità ed automazione, sia esempi di applicazioni reali. Inoltre, ricorrendo quest'anno il 30° anniversario della fondazione della Divisione, per la prima volta è stata presentata una comunicazione a carattere storico. Hanno tenuto relazioni plenarie: Richard M. Caprioli (Direct analysis of tissues using mass spectrometry as a discovery tool in biological research), Dominic M. Desiderio (The use of mass spectrometry to study human protomes), Arnaldo Dossena (LC-MS applications in food chemistry), Daniel Kassel (The ever-expanding roles of mass spectrometry in the 21st century drug discovery laboratory), Giuseppe Pieraccini (Anti-doping vs. doping: a never ending match?), Karoly Veckey (The role of energetics in mass spectrometry). Le relazioni key-notes sono state presentate da: Achille Cappiello (Use of micro and nano Hplc in the analysis of pesticides), Giulia de Petris (The role of Nrms in the discovery of new molecules and processes relevant to the chemistry of atmosphere), Alessandra Di Tullio (Spme-GC-MS of organic compounds from natural and anthropic sources in the cultural heritage and environmental pollution context), Paola Dugo (Micro Hplc-MS for the study of biologically active molecules in food products), Daniele Pezzetta (LC-MS/MS, an essential tool in drug metabolism), Alessandro Saba (Atmospheric pressure photoionization: a new challenger in the ionisation battle), Pietro Traldi (Some unexpected features of Ldi and Esi mass spectrometry in the study of organometallic compounds), Francesca Turco (1940's: mass spectrometry, industry, war).
Tutte le relazioni sono state seguite con estremo interesse dai partecipanti al congresso sempre presenti in gran numero alle attività scientifiche. Non potendo, per ragioni di spazio, esporre in dettaglio tutto quanto presentato al Convegno, ho limitato la scelta a due campi di applicazione della spettrometria di massa che, a mio personale parere, si trovano tra quelli più all'avanguardia.

L. Operti, Presidente della Divisione di Spettrometria di Massa - Università di Torino. lorenza.operti@unito.it

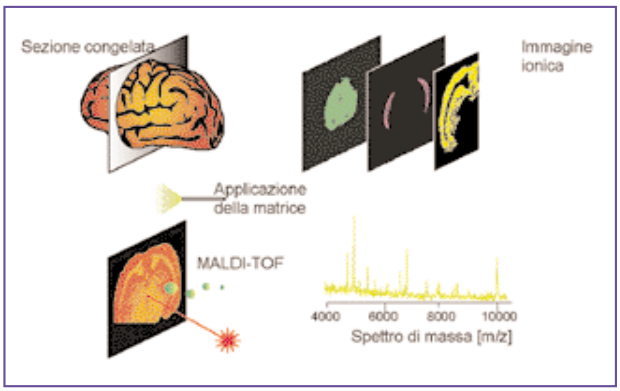

Figura 1 - Schema della procedura per ottenere immagini ioniche a partire da tessuti animali (R.M. Caprioli, Massa 2002, Cetraro (CS), giugno 2002)

La ricerca biomedica

La prima tematica di grande importanza, che sta sperimentando un sempre più rapido sviluppo, è quella della ricerca biomedica, come dimostrato anche dalla recente attribuzione dei Premi Nobel in Chimica 2002 "per lo sviluppo di metodi di ionizzazione per desorbimento soft per analisi spettrometri-

che di massa di macromolecole biologiche" a J.B. Fenn e K. Tanaka. In questo campo, la metodica più avanzata è senza dubbio la spettrometria di massa "imaging", ideata da Richard M. Caprioli (Department of Biochemistry and The Mass Spectrometry Center, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville) nel 1997, in seguito perfezionata, di cui ha presentato alcune applicazioni di diagnostica medica. La tecnica utilizza la ionizzazione per desorbimento laser assistito da matrice (Maldi: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) e fornisce una mappatura di peptidi e proteine nei tessuti animali, mediante la produzione di immagini ioniche, con una sensibilità molto elevata (femto-, attomoli), permettendo di studiare i processi biochimici cellulari. L'intero procedimento è visualizzato in Figura 1.

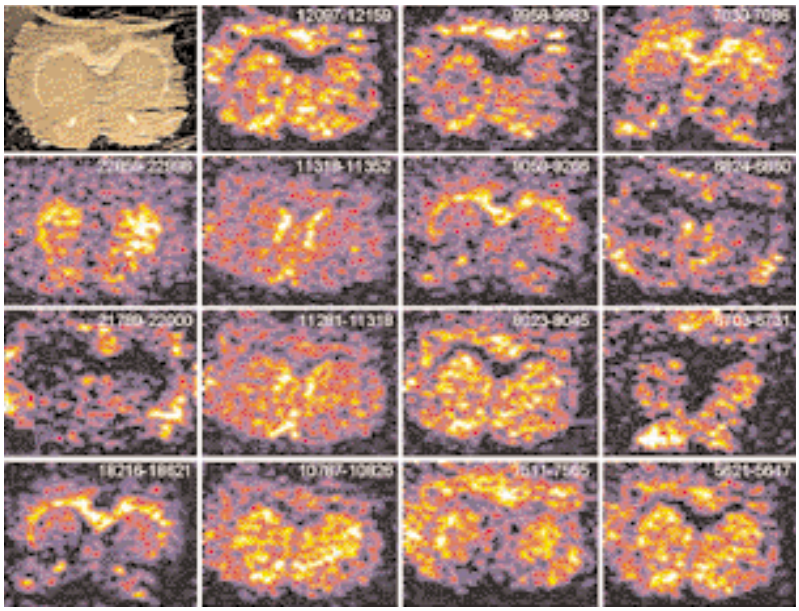

Figura 2 - Mappe di densità ionica a diversi m/z di una sezione di cervello di topo (R.M. Caprioli, Massa 2002, Cetraro (CS), giugno 2002)

Il campione è costituito da sezioni di tessuto animale, preventivamente congelato e poi ricoperto mediante spray da uno strato sottile di matrice, una sostanza che deve avere la caratteristica di assorbire a bassa energia.

Le macromolecole biologiche presenti nel campione vengono desorbite col laser formando ioni singolarmente protonati, $(M + H)^+$, con M = massa molecolare. Lo spettro di massa risultante da un singolo *"shot"* del laser mostra, quindi, i picchi $(M + H)^+$ corrispondenti a tutti i peptidi e le proteine presenti sulla superficie del tessuto nell'area colpita. Nelle applicazioni presentate, ottenute con uno strumento opportunamente perfezionato, l'area su cui incide il raggio laser è stata ridotta ad un diametro di 35 μm e, accumulando i segnali di 10-100 colpi di laser, si registra uno spettro di massa con centinaia di picchi che possono coprire un intervallo di 50.000 Da con una accuratezza di 2 Da su 30.000. Spostando man mano il laser si esegue una scansione della superficie del campione con l'acquisizione di spettri di massa corrispondenti a zone del tessuto contigue. Un software scritto appositamente per questo scopo, il Msit (Mass Spectrometry Image Tool), costruisce un'immagine nel piano xy che visualizza la distribuzione (presenza ed intensità relativa) di una determinata sostanza, ad un rapporto massa/carica prefissato, nel tessuto in esame. Comunemente vengono generate mappe individuali per verificare la presenza e la posizione, anche in tempi successivi, di proteine selezionate in precedenza sulla base di informazioni biochimiche di altro tipo.

Con tutti i parametri strumentali ottimizzati ed automatizzati, mediante il perfezionamento del software Msit, l'intero processo porta ad una immagine di 1.000 pixel, di un tessuto di un diametro di circa 10 mm in 30-50 minuti. La Figura 2 mostra le mappe ottenute dall'analisi di una sezione di cervello di topo; la prima in alto a sinistra è una immagine ottica della sezione, mentre le altre si riferiscono a mappe di densità ionica ai valori m/z indicati.

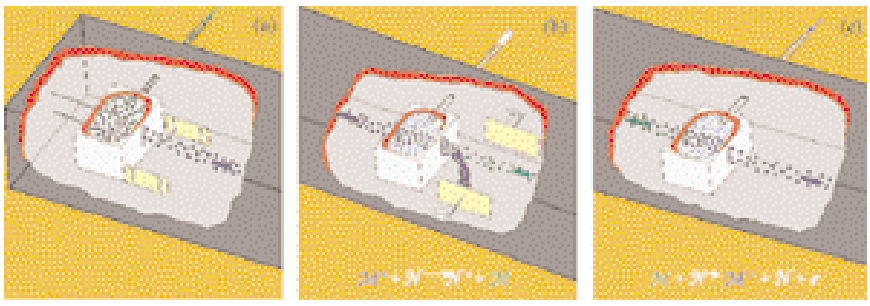

Figura 3 - Schema di uno spettrometro di massa di neutralizzazione-reionizzazione: (a) sorgente, (b) cella di neutralizzazione, (c) cella di reionizzazione (G. de Petris, Massa 2002, Cetraro (CS), giugno 2002)

La chimica dell'atmosfera

La seconda tematica di notevole attualità riguarda la scoperta di nuove molecole e processi, rilevanti nella chimica dell'atmosfera, mediante la spettrometria di massa di neutralizzazione-reionizzazione (Nrms: Neutralization Reionization Mass Spectrometry). L'importanza di tali studi è legata al fatto che numerose molecole, dette "elusive", la cui esistenza è stata ipotizzata nell'ambiente terrestre ed extra-trerrestre, non sono però mai state sintetizzate in laboratorio secondo procedure convenzionali, perché sono altamente instabili o reattive nell'ambiente di reazione in cui vengono preparate.

Il gruppo in cui opera Giulia de Petris (Dipartimento di Studi di Chimica e Tecnologia delle Sostanze Biologicamente Attive, Università "La Sapienza", Roma) ha messo a punto metodi di preparazione che, utilizzando la spettrometria di massa, minimizzano le interazioni intermolecolari e, di conseguenza, eliminano processi di decomposizione e isomerizzazione delle sostanze in esame.

Le caratteristiche principali di tale metodica sono che: 1) è possibile utilizzare una grande varietà di reazioni ione/molecola per generare ioni a connettività desiderata; 2) la neutralizzazione è un processo "verticale" (i tempi non sono sufficienti per eventuali riarrangiamenti) e le specie neutre formate mantengono la medesima connettività degli ioni da cui derivano; 3) il tempo di vita dei neutri è maggiore del tempo necessario per passare dalla cella di neu-

tralizzazione a quella di reionizzazione (ca. 1 μs), fissandone in tal modo un limite inferiore. La Figura 3 mostra le parti fondamentali di uno spettrometro di massa a neutralizzazione-reionizzazione (il blu indica gli ioni e il verde le specie neutre). In sorgente (a) avviene la sintesi, in condizioni di ionizzazione chimica, della specie ionica, precursore del neutro che si desidera esaminare. Questi ioni, ad un rapporto m/z determinato, vengono selezionati ed accelerati verso la prima cella, dove sono neutralizzati mediante processi di scambio di carica con un neutro opportuno (b).
All'uscita della cella le specie cariche sono deflesse ed eliminate dallo spettrometro di massa, mentre le specie neutre continuano per inerzia il loro cammino rettilineo. Nella seconda cella tutti i neutri presenti vengono reionizzati (c) e gli ioni sono infine rivelati dall'ultimo analizzatore. Se tra questi è presente la specie ionica sintetizzata all'inizio dell'esperimento, allora il neutro corrispondente è esistito ed è vissuto sufficientemente a lungo da compiere il cammino tra la prima e la seconda cella. L'esperimento è estremamente sofisticato e la messa a punto di tutti i parametri, tra i quali la scelta delle molecole più adatte per la formazione dello ione iniziale, per la sua neutralizzazione e successiva reionizzazione, richiede grande attenzione e cura. Uno dei primi esempi di applicazione della Nrms è stata la preparazione del radicale HO_3. La sua importanza nella chimica dell'atmosfera è strettamente legata a quella dei radicali eccitati OH, generati in processi fotochimici tra H e O_3. La formazione di questi radicali OH anche durante la notte indicava l'esistenza di molecole "reservoir" con un tempo di vita abbastanza lungo.
I risultati degli esperimenti spettrometrici di massa hanno dimostrato che tale specie esiste e che ha connettività H-O-O-O. La più recente scoperta del tetraazoto, N_4, che ha una struttura caratterizzata da due unità N_2 legate strettamente e unite tra loro da un legame più debole, è un risultato di grande importanza per la chimica inorganica fondamentale, come pure per la ricerca di materiali ad alta densità di energia (Hedm: High Energy Density Material), i propellenti verdi della prossima generazione.

Conclusioni

Come è chiaro da quanto descritto nei due esempi, queste non sono applicazioni di routine della spettrometria di massa o, forse, non lo sono ancora. Pur avendo finalità scientifiche notevolmente diverse, sono accomunate dal fatto di portare a risultati sperimentali come nessuna altra metodica nota ad oggi è in grado di fare. Comune è anche la necessità di una strumentazione altamente sofisticata, interamente dedicata ad un tema di ricerca, in evoluzione e perfezionamento continui. L'utilizzo di metodi spettrometrici di massa, così proiettati verso il futuro, richiede un forte impegno per un crescente sviluppo strumentale con vantaggi e benefici che riguardano sicuramente la spettrometria di massa, ma che si riflettono anche sull'intera comunità scientifica.