

Ionizzazione per elettro-nebulizzazione

Una rivoluzione per la spettrometria di massa

di Andrea Raffaelli, Francesco De Angelis e Gloriano Moneti

Nella corsa allo sviluppo di un'efficiente interfaccia per l'accoppiamento della spettrometria di massa con tecniche di separazione in fase liquida, e in particolare con la cromatografia liquida ad alta risoluzione (Hplc-MS), la svolta decisiva si è avuta intorno alla metà degli anni Ottanta quando J. Fenn mise a punto una sorgente capace di effettuare la ionizzazione per elettro-nebulizzazione (Electrospray, Esi). Quasi contemporaneamente A. Bruins, J. Henion e T. Covey mettevano a punto la tecnica ionspray (Isci), strettamente simile. Il presente lavoro descrive i principi di funzionamento e la strumentazione disponibile per utilizzare la ionizzazione Esi e presenta alcuni esempi di applicazioni sia di tipo qualitativo sia di tipo quantitativo.

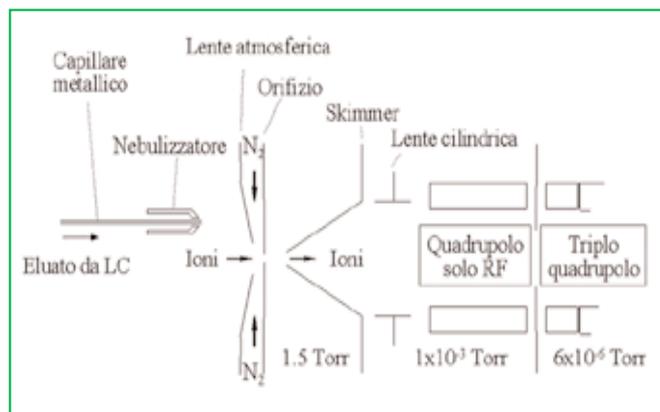


Figura 1 - Schema di un'interfaccia/sorgente per elettro-nebulizzazione con stadi di vuoto multipli

La spettrometria di massa, nata nell'ambito della fisica, ha avuto il suo sviluppo maggiore nell'ambito della chimica organica per la determinazione della struttura di composti di origine naturale o di sintesi. In questo contesto, è risultato determinante lo sviluppo di tecniche per il suo interfacciamento con la gas-cromatografia (GC-MS), che ha consentito l'analisi di miscele anche complesse senza bisogno di preventivi stadi di separazione. L'accoppiamento GC-MS ha giocato in effetti un ruolo determinante per la diffusione della spettrometria di massa come tecnica di caratterizzazione strutturale, e quindi per l'analisi qualitativa di composti organici, come anche per determinazioni quantitative molto accurate con elevata sensibilità. Per molto tempo, comunque, la spettrometria di massa è rimasta fuori, o al massimo ai margini, del campo dello studio dei composti di interesse biologico.

Le tecniche di ionizzazione tradizionali, infatti, mal si prestavano all'analisi di sostanze polari e/o termolabili o addirittura ioniche. La ionizzazione elettronica (EI), in particolare, richiede che l'analita venga portato in fase vapore e quindi ionizzato mediante interazione con elettroni ad alta energia (70 eV in condizioni standard). Chiaramente una sostanza non volatile o che si decompone durante la fase di vaporizzazione non può essere analizzata per questa via. Anche la ionizzazione chimica (CI), seppure più blanda durante la fase di ionizzazione, cosa che diminuisce la frammentazione, richiede pur sempre

che la sostanza da analizzare venga vaporizzata. Dopo un timido approccio mediante una nuova tecnica di ionizzazione, quella mediante desorbimento di campo (Field Desorption, FD), tecnica di notevoli potenzialità ma non di facilissima applicazione, una prima rivoluzione nel settore biologico si è avuta con lo sviluppo della tecnica di ionizzazione mediante bombardamento con atomi veloci (Fast Atom Bombardment, Fab). La principale novità apportata dal Fab era la ionizzazione ottenuta direttamente dalla soluzione, senza bisogno di preventiva vaporizzazione del campione. In questo modo era possibile l'analisi di tutte quelle sostanze che non erano adatte alle tecniche EI o CI. Con il Fab sono state analizzate diverse classi di sostanze di interesse biologico, tra cui oligosaccaridi, peptidi, antibiotici, vitamine, glicolipidi, oligonucleotidi e piccole proteine.

Nel frattempo cominciava lo sviluppo di metodi per l'interfacciamento tra la spettrometria di massa e la cromatografia in fase liquida. Nel corso degli anni questo accoppiamento, che sulla carta si presentava estremamente arduo, ha visto la messa a punto di molte interfacce, tra cui sono da ricordare l'introduzione diretta del liquido in sorgente (Direct Liquid Introduction, Dli) [1], la cinghia mobile (Moving Belt Interface, Mbi) [2], l'interfaccia a separatore inerziale (Particle Beam Interface, Pbi) [3] e la termonebulizzazione (Thermospray, TS) [4]. La nuova rivoluzione si è però avuta con l'introduzione delle tecniche di ionizzazione a pressione atmosferica (Atmospheric Pressure Ionization, Api). In particolare operano secondo questo principio la ionizzazione chimica a pressione atmosferica (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, Apci) [5], che opera la ionizzazione in fase vapore, e la elettro-nebulizzazione (Electrospray Ionization, Esi), che opera la ionizza-

A. Raffaelli, CNR - Istituto per la Chimica dei Composti Organo Metallici - Sezione di Pisa, raffa@dcc.unipi.it; F. De Angelis, Dipartimento di Chimica, Ingegneria Chimica e Materiali - Università de L'Aquila, deangelis@aquila.infn.it; G. Moneti, Dipartimento di Farmacologia - Università di Firenze, cism@ds.unifi.it

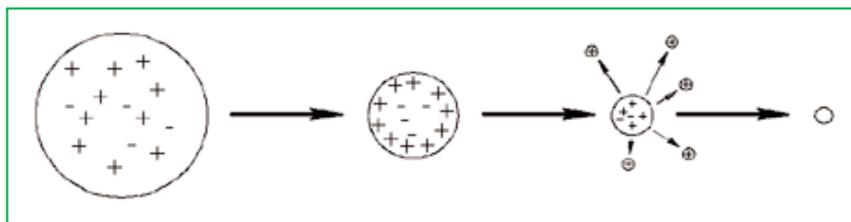


Figura 2 - Rappresentazione schematica del processo di evaporazione ionica

zione dalla fase liquida. A queste due va aggiunta la tecnica ionspray (Isi) che consiste in una elettronebulizzazione con assistenza pneumatica. Grazie a questa famiglia di tecniche di ionizzazione, la spettrometria di massa è diventata oggi un pilastro delle tecniche analitiche utilizzate in campo biologico, con la possibilità di analizzare anche proteine di peso molecolare relativamente elevato (fino a circa 100 kDa) e frammenti abbastanza consistenti di acidi nucleici. Questo articolo si propone di descrivere la tecnica Esi, presentandone i principi di funzionamento, le varie condizioni operative e alcune applicazioni sia nel campo delle caratterizzazioni strutturali (qualitative) sia in quello della determinazioni di sostanze presenti in miscele complesse (quantitative).

Descrizione e principi di funzionamento

Nel corso dei primi anni Ottanta John Fenn, assieme ai suoi collaboratori, metteva a punto quella che sarebbe divenuta in breve tempo la tecnica di ionizzazione più utilizzata per l'accoppiamento LC-MS e, più in particolare, nel campo dei composti di interesse biologico: l'elettronebulizzazione [6]. Preferiamo utilizzare in questo articolo il termine completamente italiano "elettronebulizzazione" anziché la traduzione parziale "elettro-spray" del termine originale Electrospray. Tale tecnica di ionizzazione sfrutta la formazione di una nebbia di particelle cariche ottenuta mediante azione di un forte campo elettrico su un effluente liquido attraverso un capillare tenuto ad alto potenziale (4-5 kV). Strettamente imparentata con la Esi è la tecnica Isi, messa a punto poco dopo da Andries P. Bruins in collaborazione con Tom Covey e Jack Henion presso la Cornell University [7]. In questo caso la nebulizzazione non avviene solo per effetto del campo elettrico, ma si ha anche l'assistenza di un gas di nebulizzazione (in genere aria o azoto), che rende tutto il sistema più stabile e meno critico. Le due tecniche poi, oggi, sono in realtà una sola, dato che in ogni caso è prevista l'assistenza pneumatica, per cui verranno trattate insieme utilizzando il termine più diffuso, di Esi. Una tipica sorgente è schematizzata nella Figura 1.

A parte la lieve differenza nel produrre la nebbia di particelle cariche, il meccanismo di ionizzazione prosegue nello stesso modo nei due casi, secondo il principio della "evaporazione ionica" (Ion Evaporation), schematizzato nella Figura 2. In pratica si hanno goccioline di soluzione in cui gli ioni di un segno sono in quantità maggiore degli ioni dell'altro segno. In seguito all'evaporazione del solvente, le dimensioni della gocciolina diminuiscono e quindi, rimanendo costante la carica, il campo elettrico

aumenta considerevolmente fino a che, con un meccanismo a tutt'oggi oggetto di discussione tra i ricercatori, gli ioni non riescono più a rimanere sulla superficie, e vengono "evaporati" nella fase gassosa. Tutto il processo avviene a temperatura ambiente e pressione atmosferica, quindi in condizioni estremamente blande, che in genere non provocano alcuna decomposizione dell'analita prima della ionizzazione né alcuna frammentazione

degli ioni ottenuti. Gli ioni vengono comunque guidati dall'ottica ionica dello strumento all'interno dell'analizzatore, ovviamente sotto alto vuoto come in tutti gli spettrometri di massa, mentre tutto quello che non è carico viene tenuto al di fuori da un gas inerte che fluisce in controcorrente.

Il campione deve essere introdotto mediante un flusso continuo di soluzione. Questo può essere realizzato in tre modi, a seconda delle esigenze: a) infusione continua di una soluzione contenente l'analita mediante una pompa a siringa; b) "Iniezione di flusso" (Flow Injection Analysis, Fia), ossia iniezione della soluzione di campione, attraverso un iniettore da Hplc, nel flusso continuo di un'opportuna fase mobile (in pratica una specie di Hplc senza la colonna cromatografica); c) accoppiamento con tecniche di separazione in fase liquida (principalmente Hplc e elettroforesi capillare).

Gli spettri di massa ottenuti sono caratterizzati da ioni quasi molecolari (ioni $[M+H]^+$ per gli ioni positivi; $[M-H]^-$ per gli ioni negativi), e da ioni addotto con cationi o anioni presenti nella soluzione (ioni $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ ecc. per gli ioni positivi; $[M+Cl]^-$, $[M+HCOO]^-$, $[M+CH_3COO]^-$ ecc. per gli ioni negativi), in genere senza ioni di frammentazione non desiderati. Gli ioni di frammentazione, utili per avere informazioni strutturali, possono essere ottenuti modificando opportuni parametri nella sorgente a pressione atmosferica oppure, meglio, mediante spettrometria di massa tandem su strumenti multianalizzatore, quale ad esempio uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo. Un'altro aspetto di estrema importanza, che ha contribuito in maniera determinante, almeno all'inizio, alla diffusione della tecnica Esi, è la possibilità di analizzare biopolimeri, anche di peso molecolare elevato, su apparecchi aventi un intervallo di misura limitato, grazie alla formazione di ioni multicarica. La spettrome-

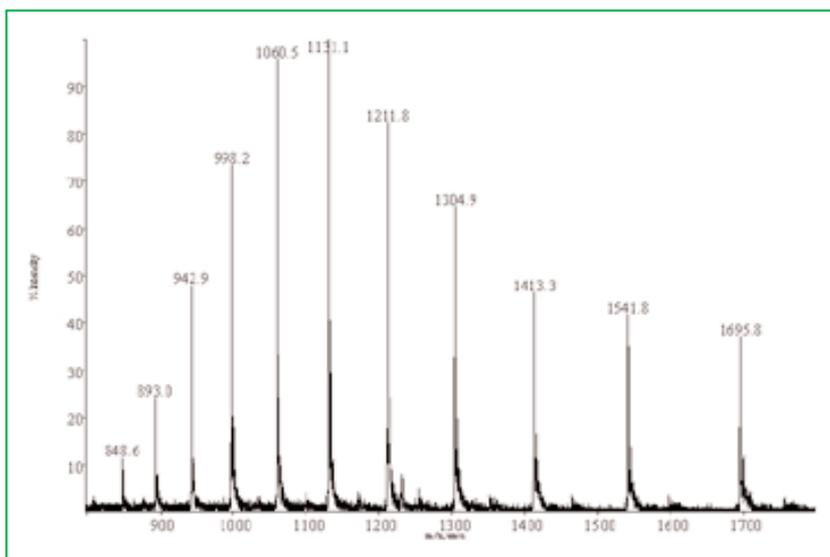


Figura 3 - Spettro Esi-MS della mioglobina equina, con la serie di ioni multicarica

tria di massa, ricordiamo, è in grado di fornire il rapporto massa/carica, più che la massa di uno ione. Questo fatto era passato in secondo piano con le tecniche di ionizzazione tradizionali, dato che la carica era, nella grande maggioranza dei casi, unitaria. La possibilità di dislocare più cariche su uno ione consente di rivelarlo anche su strumenti con intervallo di scansione limitato. Tale caratteristica, riportata per la prima volta ancora dal gruppo di Fenn [8], costituisce oggi uno dei metodi più accurati, tra quelli conosciuti, per misurare il peso molecolare di proteine e altri biopolimeri. La Figura 3 riporta lo spettro Esi della mioglobina equina. Si nota una serie di picchi che hanno la caratteristica di diventare più "fitti" man mano che si procede verso rapporti massa/carica più bassi. Questo è il tipico aspetto di una serie di ioni multicarica. Ovviamente, nel caso di un composto incognito, noi non sappiamo quante cariche ci siano su ogni ione della serie. Sappiamo però che le cariche su uno qualsiasi della serie saranno una in più di quello immediatamente alla sua destra. Se il numero di cariche su uno ione, avente rapporto m/z m_1 è n_1 e sul successivo, a rapporto m/z m_2 è n_2 , è possibile scrivere queste tre relazioni indipendenti:

$$\begin{aligned} m_1 &= (M+n_1)/n_1 \\ m_2 &= (M+n_2)/n_2 \\ n_2 &= n_1 + 1 \end{aligned}$$

dove M è il peso molecolare della proteina. Risolvendo questo sistema di tre equazioni in tre incognite (M , n_1 e n_2) otteniamo:

$$\begin{aligned} n_1 &= m_2^2 / (m_1 - m_2) \\ M &= n_1(m_2 - 1) \end{aligned}$$

ricavando quindi il peso molecolare della nostra proteina. Ogni coppia di picchi può essere utilizzata per avere una misura indipendente del peso molecolare, per cui alla fine potremo me-

Tabella 1 - Calcolo di M per la mioglobina equina

m_1	m_2	n_1 calc.	n_1	M
1.695,8	1.541,8	10,0052	10	16.948,0
1.541,8	1.413,3	10,9907	11	16.948,8
1.413,3	1.304,9	12,0286	12	16.947,6
1.304,9	1.211,8	13,0054	13	16.950,7
1.211,8	1.131,1	14,0037	14	16.951,2
1.131,1	1.060,5	15,0071	15	16.951,5
1.060,5	998,2	16,0064	16	16.952,0
998,2	942,9	17,0325	17	16.952,4
942,9	893,0	17,8758	18	16.954,2
893,0	848,6	19,0901	19	16.948,0

Ossia: $M_{\text{medio}} = 16.950,4 \pm 2,2$

diare i risultati, mentre la deviazione standard ci darà una indicazione dell'accuratezza del metodo (Tabella 1). I dati di letteratura dicono che la mioglobina equina ha un peso molecolare monoisotopico (calcolato considerando tutti gli atomi di carbonio come ^{12}C , idrogeno ^1H , ossigeno ^{16}O , azoto ^{14}N e così via) di 16.940,96 Da e un peso molecolare medio di 16.951,53.

Il valore ottenuto mediante Esi è intermedio tra questi due limiti, più vicino al valore di peso molecolare medio, e corrisponde al valore del picco monoisotopico più abbondante del cluster molecolare. Tutti i calcoli vengono svolti, ovviamente, dal computer che gestisce lo strumento,

il quale offre in genere anche un programma di deconvoluzione che, partendo dallo spettro con la serie di ioni multicarica come quello di Figura 3, ricostruisce uno spettro di pesi molecolari, come ad esempio quello di Figura 4, ottenuto dal precedente. Da notare che nello spettro deconvoluto l'ascissa non riporta più il valore m/z , ma il peso molecolare.

Strumentazione

All'inizio la sorgente Esi è sempre stata abbinata con uno spettrometro a quadrupolo, e questo è l'abbinamento più semplice da effettuare. Il problema da superare consiste nel fatto che la sorgente opera a pressione atmosferica, mentre l'analizzatore opera sotto alto vuoto. L'interfaccia deve prevedere il superamento di questo elevato gradiente di vuoto, cosa che è stata ottenuta con diversi disegni strumentali, con un singolo stadio (ossia un unico passaggio dalla pressione atmosferica all'alto vuoto), possibile solo con una pompa capace di una velocità di pompaggio estremamente elevata, quale una pompa criogenica, o a stadi di vuoto intermedi, in cui possono essere utilizzati sistemi di pompaggio più tradizionali come quelli basati su pompe diffusive o turbomolecolari.

La scelta iniziale del quadrupolo era stata dettata anche dal fatto che alcuni analizzatori, come quelli a doppio fuoco elettrostatico e magnetico, prevedono l'impiego di potenziali elevati, che possono produrre scariche a regimi di vuoto intermedi.

Tuttavia gli sviluppi successivi hanno permesso l'interfacciamento dell'elettro-nebulizzazione praticamente con tutti i tipi di analizzatori disponibili sul mercato. Infatti sono stati realizzati strumenti Esi-doppio fuoco [9], Esi-FT-Icr, Esi-trappola ionica ecc. Recentemente è stato realizzato anche l'accoppiamento con analizzatori a tempo di volo, sfruttando l'accelerazione ortogonale. Sono stati inoltre messi a punto e presentati sul mercato strumenti ibridi, fra i quali particolare importanza ha lo strumento Esi-quadrupolo-tempo di volo. La caratteristica principale dell'Esi, ossia la mancanza quasi completa di frammentazione, suggerisce co-

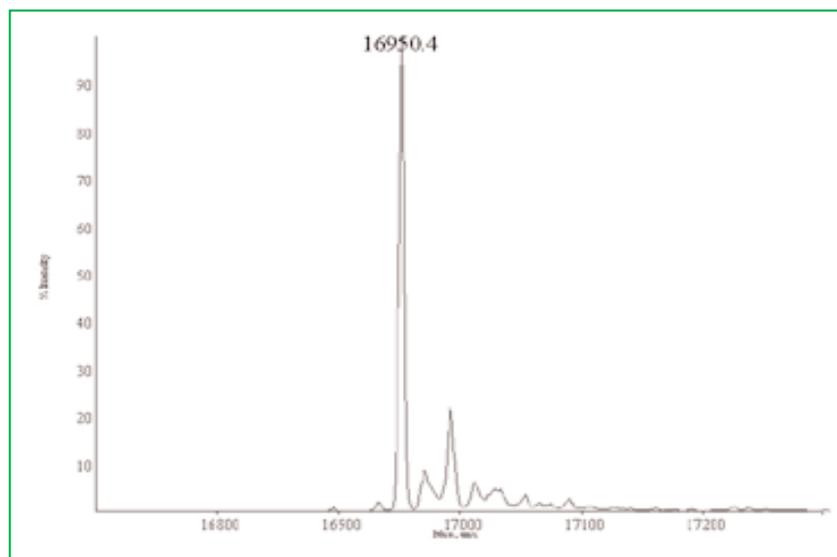


Figura 4 - Spettro deconvoluto della mioglobina equina

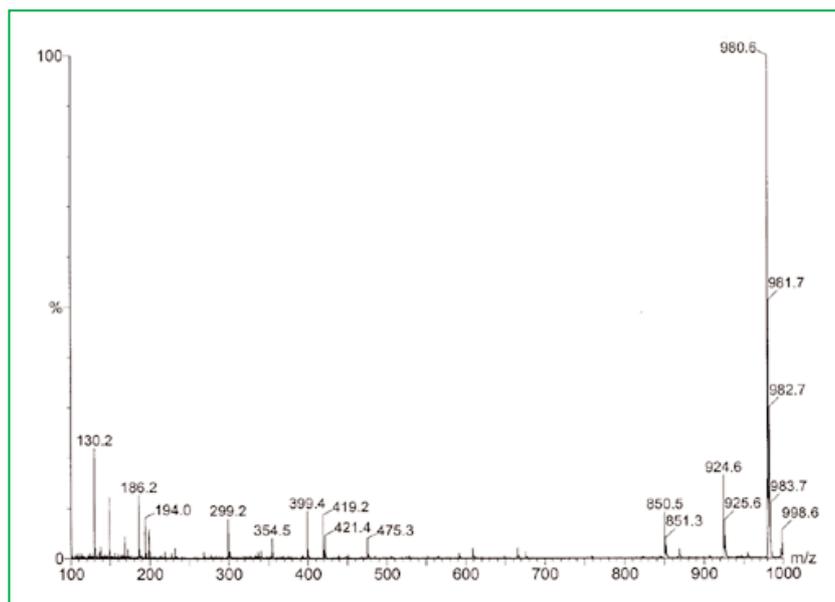


Figura 5 - Spettro di un composto tris-β-lattamico, derivato della ampicillina

unque l'impiego di strumenti multianalizzatore, capaci di operare in modalità tandem (MS-MS, MSⁿ). Per questo motivo a tutt'oggi l'implementazione che offre il massimo della versatilità a un costo relativamente contenuto è quella su un triplo quadrupolo. Infatti mediante questo sistema è possibile operare scansioni di ioni prodotto (selezione di uno ione e analisi degli ioni frammento prodotti dalla sua frammentazione), di ioni precursore (selezione di uno ione frammento e identificazione dei suoi ioni precursore), di perdita di frammento neutro (selezione di un frammento neutro e identificazione degli ioni precursore che perdano tale frammento) e analisi quantitative affidabili, accurate e sensibili mediante monitoraggio di frammentazione selezionata (selezione di uno ione, frammentazione e selezione di uno specifico frammento). A costi inferiori la trappola ionica offre scansioni di ioni frammento, anche a più livelli (MSⁿ) e analisi quantitative, ma non le scansioni di ioni precursore o di perdita di frammento neutro, perlomeno non in maniera semplice e immediata. Gli strumenti Esi-doppio fuoco sono attualmente sempre meno diffusi, ma offrono la possibilità di operare a risoluzione più elevata dei quadrupoli e di studiare processi di frammentazione in celle di collisione ad alta energia (dell'ordine dei keV). L'accoppiamento Esi-Tof invece offre la possibilità di operare ad alta risoluzione e con scansioni estremamente veloci, utili quando si hanno picchi cromatografici molto stretti.

Applicazioni nel campo delle determinazioni strutturali

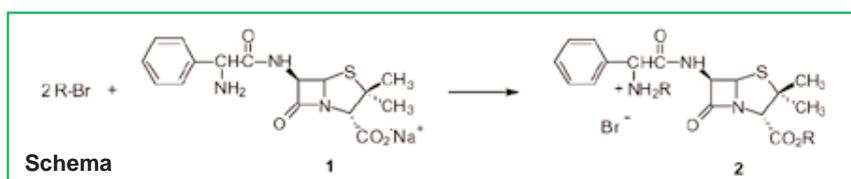
I limiti della spettrometria di massa tradizionale nei settori della determinazione delle strutture delle molecole sono essenzialmente relativi alla dimensione ed alla polarità di molte delle specie chimiche analizzate. Con la ionizzazione per elettro-nebulizzazione (Esi-MS) la polarità stessa dell'analita, ovvero la sua capacità di cationizzarsi o di diventare anione, rappresenta un indubbio vantaggio. Il fatto poi che lo ione "molecolare", sia esso formato per protonazione singola o multipla, o

per cationizzazione con ioni metallici, o per anionizzazione per, ad esempio, perdita di un protone, sia presente sullo spettro con un picco molto intenso, è di estrema utilità: esso fornisce, infatti, al ricercatore l'informazione spesso primaria, che egli cerca, sul peso molecolare della specie chimica di interesse. All'assenza, in generale, di ioni frammento utili per la elucidazione strutturale è possibile, come già accennato, sopperire con le tecniche di MS-MS, MSⁿ o di decomposizione in sorgente ("in source fragmentation"); quest'ultima, essenzialmente, per gli analiti ragionevolmente puri. Gli esempi che sono di seguito illustrati non vogliono certamente illustrare in forma esauriente l'argomento e, per semplicità di trattazione sono relativi a composti studiati tramite la tecnica della introduzione diretta nello spettrometro di massa, e non dopo separazione "on-line" attraverso Hplc. Per quest'ultima tecnica si rimanda al successivo capitolo. È utile comunque puntualizzare che praticamente nulla cambia, in termini di gestione dell'apparecchio di massa e

dei risultati ottenuti, nell'uso della Esi-MS da sola o accoppiata con l'Hplc.

Sintesi organica e farmaceutica [10]

Un mg di ampicillina sale sodico (**1**; peso dell'anione = 348 Da), antibiotico β-lattamico a struttura penicillanica di prima generazione, largamente usato nella pratica medica, è stato trattato in opportuno solvente con quantità stechiometriche di un elettrofilo bromurato (alchilante), anch'esso a struttura β-lattamica (PM=396 Da), allo scopo di sintetizzare una molecola potenzialmente dotata di interessanti caratteristiche farmacologiche. Le quantità usate nella reazione di prova erano necessariamente ridotte, in ragione del fatto che l'elettrofilo proveniva da una procedura di sintesi molto complessa.



Il peso molecolare atteso del prodotto "bis-β-lattamico" era 664 Da (in prima approssimazione trascuriamo i decimali propri di un peso molecolare più accurato). Il prodotto che invece si era formato in maggiore percentuale, isolato in quantità minime tramite cromatografia su strato sottile, ha fornito, una volta analizzato tramite Esi-MS in ioni positivi, un picco rappresentativo della molecola protonata a m/z = 980 (Figura 5). Un rapido calcolo dei pesi molecolari delle specie coinvolte ha portato a concludere che si era formato un prodotto, per così dire, "tris-β-lattamico" **2**, originato dall'attacco dei due siti nucleofili dell'anione dell'ampicillina (la funzione carbossilica anione e quella amminica) su due molecole di elettrofilo, secondo quanto riportato nello Schema.

Inoltre, lo spettro ottenuto per frammentazione in sorgente, ricco di picchi significativi, ha fornito ulteriori conferme strutturali sul prodotto di reazione.

Sostanze naturali

Alcuni funghi del genere *Amanita* contengono tossine molto potenti: molecole dalla struttura polipeptidica ad anello che distruggono le cellule del fegato. Gli studi tossicologici e chimico-strutturali di queste molecole hanno interessato generazioni di ricercatori, da quelli pionieristici di F. Lynen e U. Wieland del 1937 a quelli più recenti di T.H.F. Wieland e collaboratori, al Max Planck Institute di Francoforte [11]. La "falloidina", tossina tra le più note, è in realtà frazionabile in sette componenti, le fallotossine, mentre la "amanitina" consiste di nove molecole, le amatossine [11]. Tutte le fallotossine e le amatossine sono, strutturalmente, dei ciclopeptidi "pontati", costituiti rispettivamente da sette e otto amminoacidi. L' LD_{50} della α -amanitina, la più tossica fra tutte, è nel topo pari a 0,3-0,6 mg kg⁻¹.

Le specie chimiche componenti le due classi di tossine possiedono differenze strutturali molto ridotte. Gli scienziati che nel passato hanno lavorato per determinare le strutture di tali molecole hanno, senza dubbio, condotto un lavoro di grande spessore chimico. Oggi, uno spettro Esi-MS è in grado di fornire, per ciascuna di tali molecole, su micromoli di campione anche a non elevato grado di purezza, il relativo peso molecolare. In Figura 6 è riportato lo spettro in ioni positivi della falloidina: il picco a m/z 790 deriva dalla molecola protonata, mentre lo ione con m/z 812 è relativo alla specie sodiata. Da notare come la capacità chelante di tali molecole nei confronti degli ioni dei metalli alcalini sia rivelabile anche dallo spettro Esi.

Complessi con metalli

La spettrometria di massa ha sempre denunciato un limite non irrilevante nel settore degli studi stereochimici. I diastereoisomeri forniscono, in genere, spettri molto simili; gli spettri degli antipodi ottici sono identici. Graham Cooks ed i suoi colla-

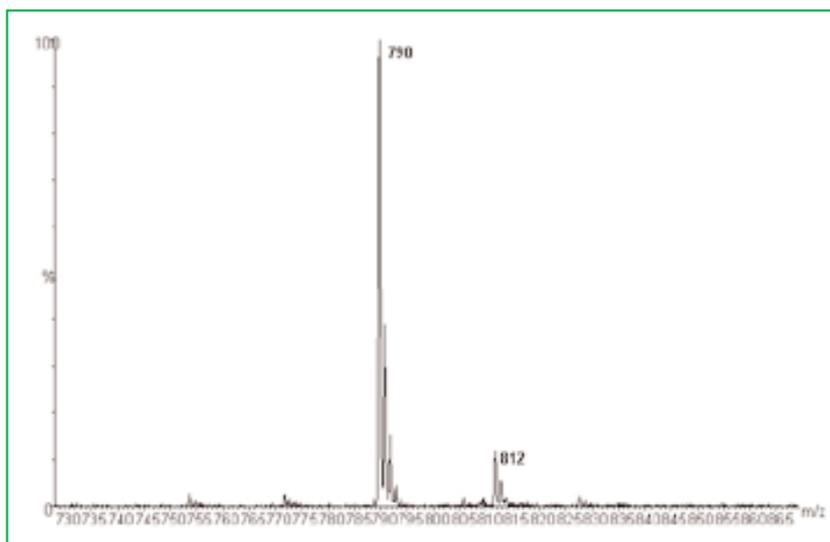


Figura 6 - Spettro della falloidina

boratori, in studi relativamente recenti [12], hanno mostrato che, in Esi-MS, in considerazione della diversa cinetica di frammentazioni competitive di complessi trimerici di D- ed L-amminoacidi con il rame (II), è possibile effettuare studi di riconoscimento chirale (cfr. anche la review di M. Speranza, *Chimica e Industria*, 2002, **84**(9), 37).

I cluster trimerici degli ioni $[A_2BCu^{II} - H]^+$, con A e B amminoacidi diversi, per collisione in esperimenti MS-MS dissociano per dare ioni a struttura $[A_2Cu^{II} - H]^+$ e $[ABCu^{II} - H]^+$, e le abbondanze relative di tali frammenti, in identiche condizioni strumentali, dipendono marcatamente dalla stereochimica dei leganti amminoacidici nello ione precursore. Lo spettro riportato in Figura 7, che riproduce l'esperimento di Cooks, è stato registrato nei nostri laboratori.

Proteine

Una grande varietà di piante contiene tossine RIP (ribosome inactivating proteins), le quali inibiscono la sintesi proteica attraverso l'inattivazione dei ribosomi nelle cellule eucariotiche. Tra le tossine RIP, le saporine sono presenti in diversi distretti della pianta *Saponaria officinalis* L.; la saporina SO-6, tra queste, costituisce circa il 7% del totale del contenuto proteico del seme.

La proteina matura, la saporina SO-6 appunto, è composta da 253 amminoacidi, e mostra un'eterogeneità amminoacidica in alcune posizioni della catena. Lo studio Esi-MS [13] ha dato conto di tale eterogeneità; infatti, lo spettro di massa non rielaborato della proteina purificata (Figura 8) già mostra, a prima vista, una distribuzione su più gaussiane di picchi relativi agli ioni multicarica.

La deconvoluzione dello spettro attraverso un sofisticato algoritmo di tipo iterativo fornisce i pesi molecolari delle varie isoforme di saporina (almeno tre, tutte con massa intorno a 28.600 Da), con una accuratezza di massa di ca. $\pm 0,8-1,4$ Da per ciascun composto (insetto di Figura 8).

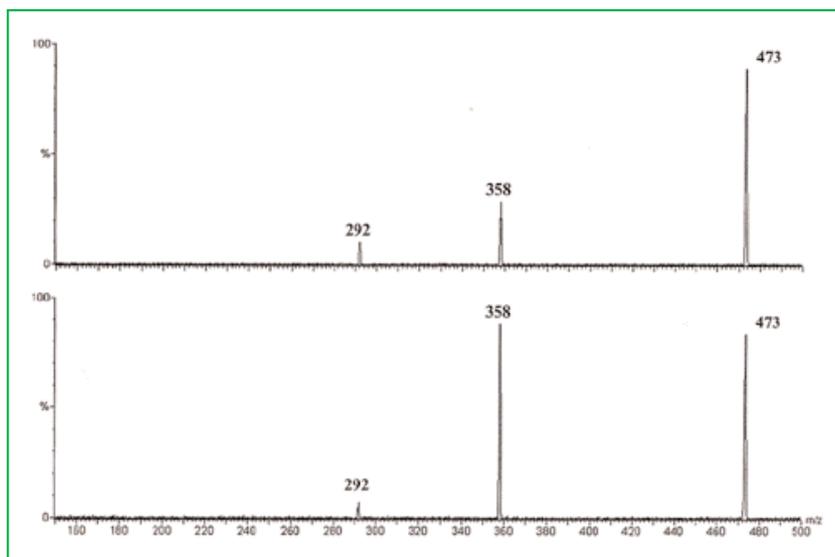


Figura 7 - Spettri MS-MS degli ioni a m/z 473 $[(L-Pro)_2(L-Tyr)_{63}Cu^{II} - H]^+$ (in alto) e $[(L-Pro)_2(D-Tyr)_{63}Cu^{II} - H]^+$ (in basso)

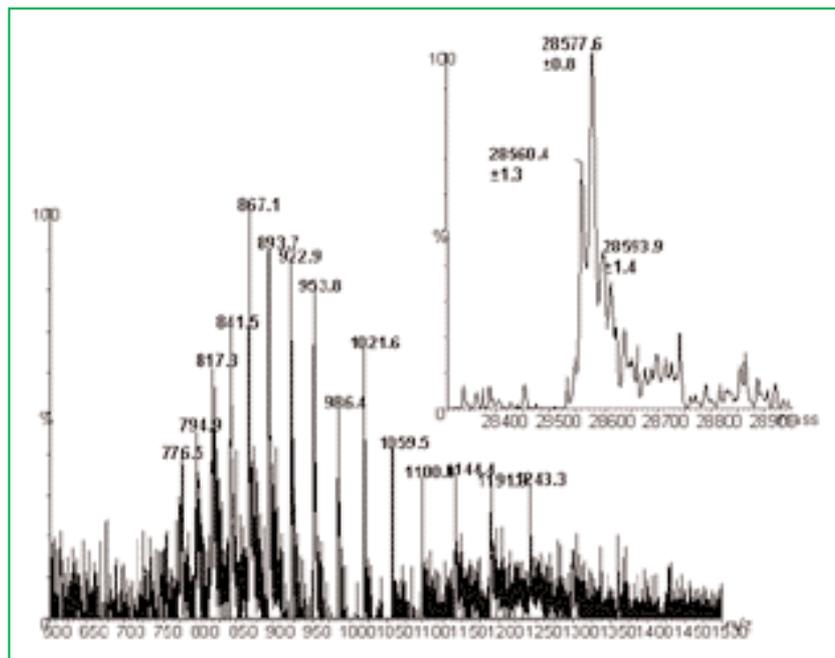


Figura 8 - Spettro rielaborato (in inserto) e grezzo della saporina SO-6

Biopolimeri complessi

La lignina, dopo la cellulosa, è il più abbondante biopolimero presente nelle piante. A dispetto del suo ruolo fondamentale nella struttura del legno e nell'economia generale dei processi industriali che utilizzano tale materiale, esistono grandi imprecisioni e sovrasemplificazioni nella comprensione della sua biogenesi e della sua struttura. Studi fondamentali in tal senso, ed ancora attuali, sono stati condotti da K. Freudenberg e risalgono agli anni Sessanta [14].

La spettrometria di massa tradizionale ha sempre fallito nel fornire contributi di un certo valore in tale settore. Di recente, però, le tecniche Esi-MS associate ad un nuovo studio biosintetico *in vitro* di tale polimero, condotto utilizzando l'alcol coniferilico (PM=180 Da) quale monomero modello, hanno aperto una diversa prospettiva sulla sua biosintesi: viene ipotizzato un processo "ordinato" piuttosto che una polimerizzazione di tipo stocastico [15]. Gli oligomeri, infatti, dal monomero all'ottamero, forniscono spettri Esi-MS in cui gli ioni che portano l'informazione sul peso molecolare, prodotti per cationizzazione con lo ione ammonio, differiscono tra loro, alternatamente da un oligomero a quello immediatamente superiore, di 178 e 180 unità di massa. Studi Esi MS-MS hanno inoltre consentito di determinare le strutture di tali oligomeri, avvalorando l'ipotesi di una biosintesi regolare [16]. In tutti essi, infatti è evidenziabile un'identica sottostruttura dimerica. In Figura 9 è riportato, a titolo esemplificativo, lo spettro MS con frammentazione in sorgente del tetramero ($M+NH_4^+ = 735$ Da), nel quale si nota un frammento importante a m/z 359. Tale frammento è presente in tutti gli oligomeri superiori al dimero: la sua costante identità, infatti, è dimostrata dal "product ion spectrum" (spettro MS-MS) di tale frammento,

che è sempre il medesimo per tutti gli oligomeri (Figura 9, inserto). Il frammento in questione, senza voler necessariamente entrare in dettaglio, possiede una struttura dimerica ossidata dell'alcol coniferilico, riconducibile all'intermedio biosintetico β -O-4-metilenchinone.

Elettrospray e analisi quantitative

La spettrometria di massa viene largamente utilizzata nelle analisi quantitative. Tecniche come la frammentografia di massa (ossia il monitoraggio di ioni selezionati, noto come "Selected Ion Monitoring", SIM) e la diluizione isotopica sono alla base dello sviluppo di metodi quantitativi di riferimento in vari settori, come lo studio dell'inquinamento ambientale, le analisi in campo biomedico, i controlli di qualità degli alimenti, e così via.

La ionizzazione Esi consente di effettuare analisi quantitative in Hplc, con tutti i vantaggi caratteristici dei metodi basati sulla spettrometria di massa: elevata sensibilità, elevata specificità e buona universalità (la rivelazione Uv richiede la presenza di gruppi cromofori sulla molecola dell'analita, mentre la spettrometria di massa si accontenta di una "massa molecolare", caratteristica che tutte le molecole possiedono).

La specificità viene anche in questo caso assicurata da tecniche di monitoraggio di ioni selezionati. Data la mancanza, in genere, di frammentazione, lo ione selezionato sarà quello "molecolare" $[M+H]^+$ o $[M+H]^-$, o a seconda dei casi uno ione addotto.

Monitoraggio di frammentazioni selezionate

Le analisi Hplc sono caratterizzate in genere da un rumore di fondo (chimico) molto più elevato rispetto alle analisi effettuate mediante gascromatografia. Praticamente si può affermare che c'è un segnale, anche se molto debole, per ogni

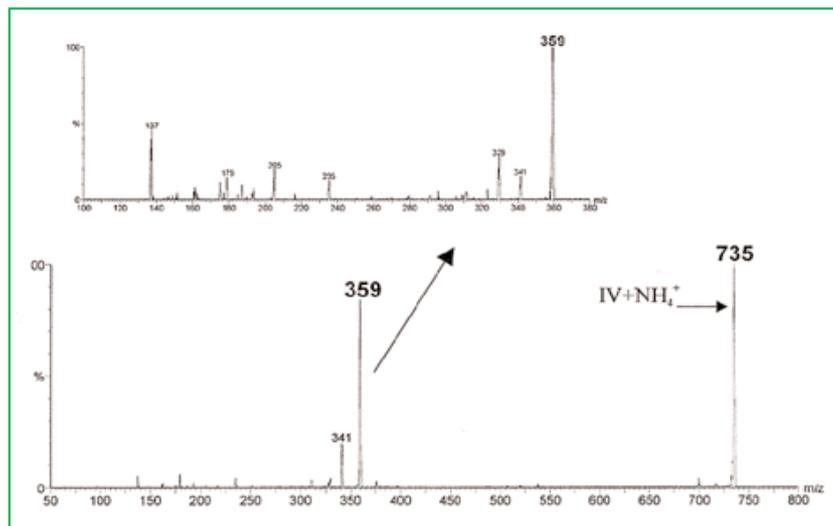


Figura 9 - "Product ion spectrum" con frammentazione in sorgente del tetramero dell'alcol coniferilico; in inserto, spettro MS-MS del frammento a m/z 359

valore di m/z. Inoltre c'è sempre la possibile interferenza di ioni isobari rispetto a quelli scelti per il monitoraggio Sim. Questo fatto abbassa notevolmente due delle principali caratteristiche tipiche della spettrometria di massa, ossia la sensibilità e la specificità. Per recuperare questo svantaggio, le analisi quantitative in Hplc-MS vengono spesso condotte sfruttando tecniche in spettrometria di massa tandem (MS-MS), in questo caso ancora più importanti che in GC-MS. In particolare viene impiegata la tecnica di monitoraggio di frammentazione selezionata (Selected Reaction Monitoring, Srm). Questa tecnica consiste nel selezionare lo ione precursore, in genere uno degli ioni sopra menzionati, farlo frammentare in cella di collisione e monitorare uno specifico frammento (o più di uno per aumentare la specificità), in genere quello più intenso.

In questo modo lo spettrometro di massa diventa un rivelatore completamente specifico per l'analita da determinare. Infatti, in queste condizioni, solo una sostanza che produca in sorgente lo ione precursore scelto, il quale produca per frammentazione lo ione prodotto scelto, produrrà un segnale al rivelatore. In questo caso il rumore di fondo viene praticamente annullato ottenendo una maggiore sensibilità anche se il segnale in assoluto sarà molto meno intenso che in massa singola. Un esempio del possibile guadagno in termini di rapporto segnale/rumore è riportato nella Figura 10. La figura riporta i cromatogrammi relativi a una soluzione di naprossene butanolammide (PM 301) in metanolo con una concentrazione di 1,5 µg/ml. Notare come la misura effettuata mediante normale scansione (200-400 Th, a) porti a un segnale molto elevato, 7.750.000 cps, ma comporti anche un rumore altrettanto elevato, 210.000 cps, che porta a un rapporto S/N di 37. La misura effettuata mediante Sim (monitoraggio dello ione protonato, 302 Th, b) consente di ottenere un segnale più basso di un ordine di grandezza, di 625.000 cps, ma un rumore molto più basso, di 388 cps, con un rapporto S/N di 1.611. Passando alla misura Srm il segnale si riduce ulteriormente a 195.000 cps, ma la riduzione molto consistente del rumore, che arriva a soli 16 cps, si ottiene un rapporto S/N di 12.188.

L'impiego delle tecniche Srm in analisi quantitative Hplc-MS-MS con ionizzazione Esi consente di raggiungere in genere limiti di rivelabilità dell'ordine di almeno 1 ng/ml. Se occorrono limiti di rivelabilità più bassi si deve cercare di aumentare da una parte l'efficienza della ionizzazione, e dall'altra di utilizzare soluzioni più concentrate. La Hplc-Esi convenzionale utilizza in genere colonne da 4,6 mm di diametro interno che operano a un flusso di 1 ml/min. Tale flusso viene normalmente splittato (con rapporti di splittaggio da 1:10 a 1:50)

Tabella 2 - Classificazione delle colonne Hplc per diametro interno

Tipo di colonna	Diametro interno	Flusso operativo
Convenzionali:		
Wide-Bore (preparative)	> 4,6 mm	> 3 ml/min.
Normal-Bore (analitiche)	3-4,6 mm	0,5-3 ml/min.
Narrow-Bore	1-2 mm	20-300 ml/min.
Capillari:		
Micro-Bore	0,15-0,8 mm	2-20 ml/min.
Nano-Bore	20-100 µm	100-1.000 nl/min.

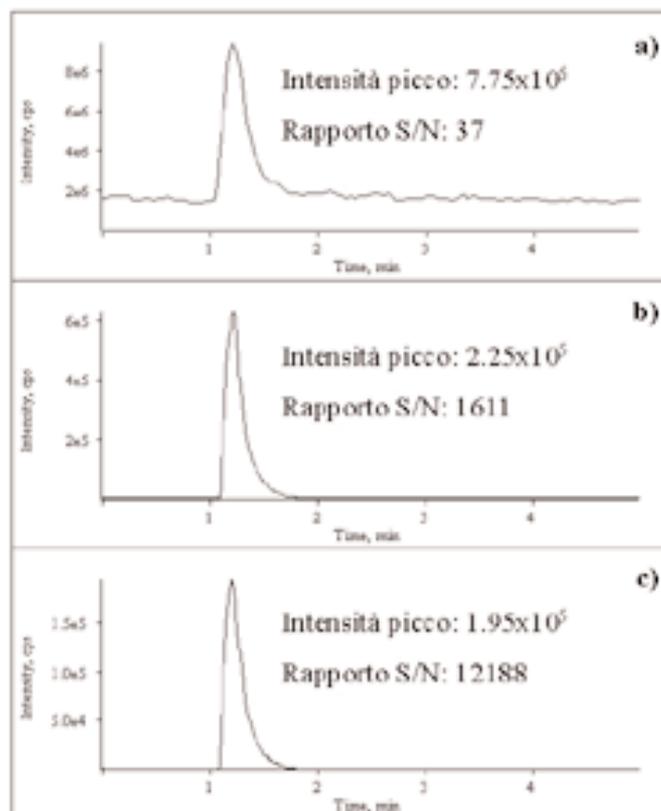


Figura 10 - Cromatogrammi di corrente ionica totale relativi all'analisi di una soluzione di naprossene butanolammide mediante FIA in modalità Scan (a), SIM (b) e Srm (c)

per avere una ionizzazione più efficace. Tale accorgimento non influenza la sensibilità in quanto, per regimi di flusso superiori a 1-2 µl/min., la spettrometria di massa Esi risponde alla concentrazione dell'analita piuttosto che alla sua quantità assoluta. È però chiaro che in queste condizioni il campione viene diluito notevolmente.

L'impiego di colonne analitiche di diametro interno inferiore, operanti a flussi più bassi (Tabella 2), consente di diluire molto meno il campione, ottenendo un effettivo aumento della sensibilità [17]. La minore diluizione ottenuta consente quindi di raggiungere migliori limiti di rivelabilità. Il guadagno teorico in termini di minore diluizione può anche essere facilmente calcolato:

Flusso Hplc:
 1.000 µl/min. nella Hplc standard
 5 µl/min. nella micro-Hplc
 0,2 µl/min. nella nano-Hplc
 da standard a micro: $1.000/5 = 200$
 da micro a nano: $5/0,2 = 25$
 da standard a nano: $1.000/0,2 = 5.000$

Si può quindi arrivare a guadagnare fino a tre ordini di grandezza. L'impiego delle tecniche micro- e nano-Hplc comporta chiaramente qualche complicazione strumentale. Infatti l'impiego di flussi così bassi richiede un controllo molto spinto dei volumi morti, che devono essere quanto più possibile ridotti. Esistono comunque in commercio cromatografi Hplc in grado di gestire tutti i regimi di flusso, costruiti quindi con un bassissimo volume morto interno.

Conclusioni

L'avvento delle tecniche di ionizzazione in fase liquida, e in particolare della ionizzazione per elettro-nebulizzazione ha costituito una vera e propria rivoluzione nel settore della spettrometria di massa in generale, e dell'accoppiamento Hplc-MS in particolare. Prima degli anni Novanta (lo sviluppo della tecnica Esi si è avuto, come già menzionato, nella seconda metà degli anni Ottanta) la Hplc-MS era considerata un po' come la parente povera della GC-MS, alla quale si ricorreva se proprio non se ne poteva fare a meno e pagando un notevole prezzo in termini di sensibilità e di complicazioni operative.

La disponibilità della Esi sul mercato ha completamente ribaltato questa situazione, in quanto oggi la parte più consistente delle applicazioni in spettrometria di massa viene effettuato mediante Hplc-MS con elettro-nebulizzazione, ottenendo fra le altre cose in genere una migliore sensibilità, grazie alla maggiore efficienza di ionizzazione rispetto alla tradizionale EI. Sono state sviluppate applicazioni in campo biomedico, alimentare, ambientale, e così via, che erano impensabili fino a solo dieci anni fa. Un importante corollario di questa rivoluzione è che oggi è possibile una preparazione del campione più semplice e rapida, evitando ad esempio gli stadi di derivatizzazione necessari per rendere volatili, e quindi adatti sia all'analisi gas-cromatografica, sia alla ionizzazione elettronica, analiti "recalcitranti" in quanto, a causa della loro polarità, dotati di scarsissima volatilità oppure di termolabilità che ne provocava la decomposizione in seguito a riscaldamento. In conclusione possiamo affermare che la

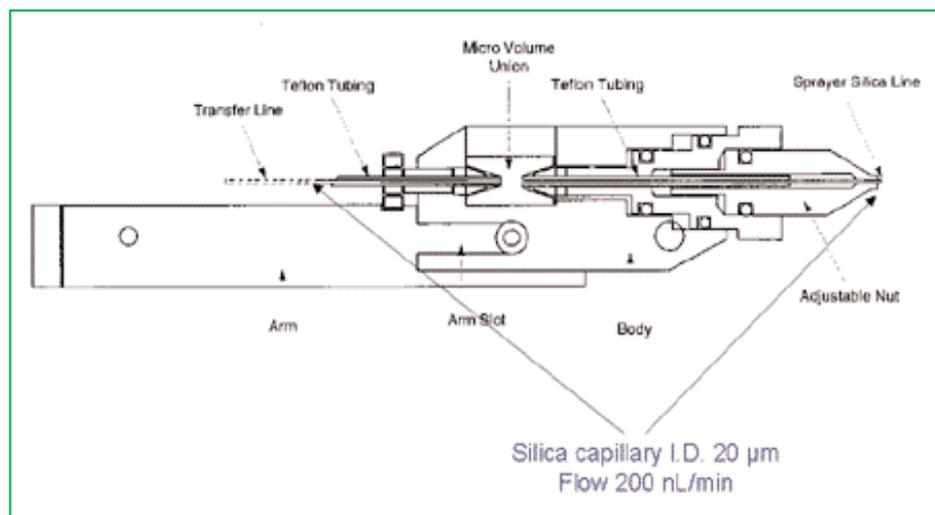


Figura 11 - Schema di una interfaccia/sorgente microspray

Micro- e nano-electrospray

L'altro parametro su cui giocare per ottenere un aumento della sensibilità è quello di aumentare l'efficienza di ionizzazione. Le tecniche Esi (e Isi) tradizionali consentono di lavorare molto bene con flussi superiori a 1 µl/min., mentre al di sotto si incontrano alcuni problemi.

Le normali interfacce Esi, infatti, utilizzano capillari aventi un diametro interno di 50-100 µm e questo provoca una rapida degradazione del segnale al di sotto di 1 ml/min., a causa dei volumi che diventano relativamente troppo elevati e non consentono la formazione di uno spray efficace. Sono state sviluppate recentemente interfacce chiamate micro- e nano-Esi specificatamente disegnate per operare a flussi molto bassi. Queste interfacce si basano sulla generazione dello spray attraverso un capillare di diametro interno molto ridotto (20-25 µm) e sono capaci di raggiungere efficienze di ionizzazione particolarmente elevate. La Figura 11 rappresenta una di queste interfacce nano-Esi.

Tali interfacce sono praticamente ideali per l'accoppiamento con la nano-Hplc, mentre per la micro-Hplc possono essere utilizzati sia sistemi tradizionali sia queste sorgenti a basso flusso. Il guadagno di sensibilità ottenibile dalla combinazione micro/nano-Hplc con la micro/nano-Electrospray risulta veramente elevato.

La Figura 12 mostra un confronto tra Hplc convenzionale e micro- e nano-Hplc sulla determinazione del sumatriptan su campioni di liquido cerebro-spinale. Si noti che mentre in Hplc convenzionale 300 pg iniettati producono un segnale avente rapporto S/N 3, in micro-Hplc 635 fg producono un segnale avente rapporto S/N 7 (con un guadagno di oltre 450 volte) e in nano-Hplc 127 fg producono un segnale avente rapporto S/N 20 (con un ulteriore guadagno di 5 volte, per un guadagno totale da Hplc convenzionale a nano-Hplc di oltre 2.350 volte!).

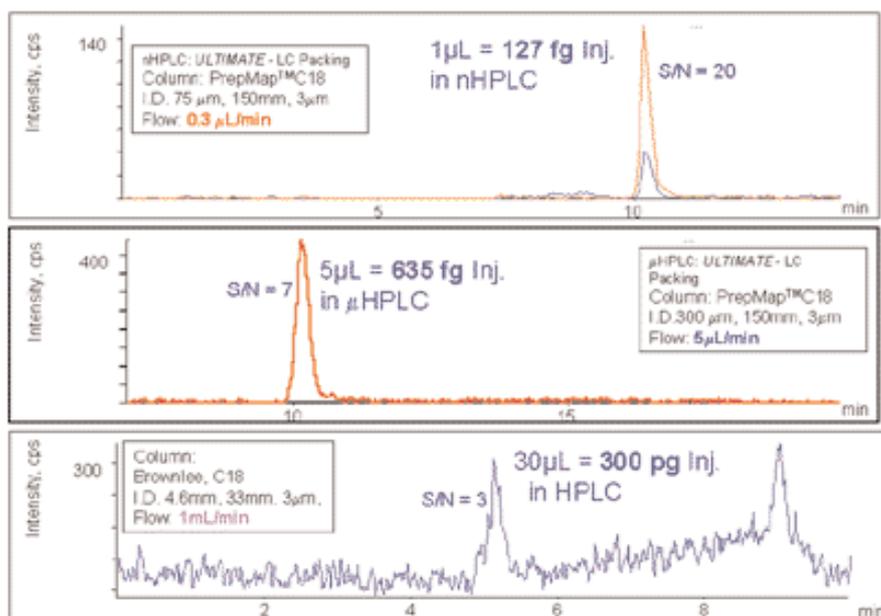


Figura 12 - Cromatogrammi relativi all'analisi di sumatriptan su campioni di liquido cerebro-spinale mediante Hplc standard (c, colonna da 4,6 mm a 1 ml/min.), micro-Hplc (b, colonna da 300 µm a 5 µl/min.) e nano-Hplc (a, colonna da 75 µm a 300 nl/min.)

ionizzazione per elettronebulizzazione, assieme alla complementare ionizzazione chimica a pressione atmosferica consentono oggi di ionizzare la gran parte delle molecole organiche conosciute con risultati a volte anche superiori rispetto a quanto possibile in GC-MS.

Il futuro si presenta inoltre ancora più roseo grazie alla disponibilità di un'ulteriore tecnica di ionizzazione a pressione atmosferica, recentemente presentata, che sfrutta l'azione di fotoni generati da opportune lampade per la ionizzazione delle molecole. Tale tecnica, nota come Fotoionizzazione a Pressione Atmosferica (*Atmospheric Pressure Photoionization*, ApPI), dovrebbe consentire di ionizzare molecole non così polari come quelle ionizzabili mediante ESI o APCI, portando a coprire quell'intervallo di molecole poco polari ma di massa relativamente elevata attualmente inaccessibili alla HPLC-MS.

Bibliografia

- [1] M.A. Baldwin, F.W. McLafferty, *Org. Mass. Spectrom.*, 1973, **7**, 1111.
- [2] W.H. McFadden *et al.*, *J. Chromatogr.*, 1976, **122**, 389.
- [3] R.C. Willoughby, R.F. Browner, *Anal. Chem.*, 1984, **56**, 2625.
- [4] C.R. Blakey *et al.*, *Anal. Chem.*, 1980, **52**, 1636.
- [5] E.C. Horning *et al.*, *Anal. Chem.*, 1973, **45**, 936.
- [6] C.M. Whitehouse *et al.*, *Anal. Chem.*, 1985, **57**, 575.
- [7] A.P. Bruins *et al.*, *Anal. Chem.*, 1987, **59**, 2642.
- [8] S.F. Wong *et al.*, *J. Phys. Chem.*, 1988, **92**, 546.
- [9] M.H. Allen, I.A.S. Lewis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1989, **3**, 255.
- [10] F. De Angelis, A. Di Tullio, risultati non pubblicati.
- [11] T. Wieland, *Peptides of Poisonous Amanita Mushrooms*, Springer-Verlag, New York, 1986.
- [12] W. Andy Tao *et al.*, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 4427.
- [13] F. De Angelis *et al.*, *J. Mass Spectrom.*, 2001, **36**, 1237.
- [14] K. Freudenberg, A.C. Neish in *Constitution and Biosynthesis of Lignin*; Springer-Verlag, Berlin, 1968.
- [15] F. De Angelis *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1999, **38**, 1283.
- [16] a) F. De Angelis *et al.* in *Advances in Mass Spectrometry*, E. Gelpi (Ed.), Wiley, Chichester (UK), 903, 2001; b) S. Reale, tesi Dottorato di Ricerca, 2002.
- [17] J. Abian *et al.*, *J. Mass Spectrom.*, 1999, **34**, 244.

Note e ringraziamenti: Lo spettro di Figura 3 è stato registrato mediante infusione su uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo PE Sciex mod. API III *plus*, mentre la sua deconvoluzione (Figura 4) è stata effettuata mediante il software Biomultiview 1.3.1 utilizzando l'algoritmo "BioSpec Reconstruct". Gli spettri delle Figure 5-9 sono stati ottenuti mediante FIA con uno strumento a triplo quadrupolo Micromass Mod. Quattro LC-Z. I cromatogrammi mostrati in Figura 10 e 12 sono stati ottenuti mediante FIA su uno strumento a triplo quadrupolo PE Sciex Mod. API III *plus*, mentre quelli di Figura 12 sono stati ottenuti su uno spettrometro PE Sciex mod. API 365. Gli autori desiderano inoltre ringraziare la Dott.ssa Angela Cuzzola, la Dott.ssa Alessandra Di Tullio, la Dott.ssa Samantha Reale, il Dott. Giuseppe Pieraccini e il Dott. Alessandro Saba per la loro partecipazione alle ricerche descritte nel testo. Parte del lavoro è stato condotto all'interno della "Rete di Spettrometria di Massa" del Consiglio Nazionale delle Ricerche.