

La spettrometria di massa

Interdisciplinarietà a 360°

di Gianluca Giorgi

Negli ultimi vent'anni ben poche discipline scientifiche hanno avuto uno sviluppo così diffuso e vertiginoso come ha avuto la spettrometria di massa. Mentre fino agli anni Ottanta era applicabile allo studio di classi limitate di molecole, a seguito di importanti sviluppi tecnologici, strumentali e applicativi, la spettrometria di massa moderna costituisce una metodologia di ricerca interdisciplinare, con possibili applicazioni in ogni area della scienza, dalla fisica, alla chimica, alla biologia, alle scienze biomediche, alle scienze umanistiche.



La spettrometria di massa (MS) è "l'arte di pesare atomi e molecole per misurarne la massa" [1]. Nata oltre un secolo fa, per circa mezzo secolo la spettrometria di massa è rimasta relegata nell'ambito della fisica, dove le sue applicazioni erano rivolte alla determinazione delle masse dei nuclidi stabili e delle abbondanze naturali degli isotopi [2]. Con lo sviluppo della strumentazione, nella seconda metà del secolo scorso, questa metodologia ha trovato applicazioni sempre più numerose in ambito chimico limitatamente alle molecole volatili, di basso peso molecolare, termostabili, da cui si potevano produrre ioni in fase gassosa mediante ionizzazione elettronica e ionizzazione chimica. Dagli anni Ottanta, l'introduzione di nuove tecniche di ionizzazione per desorbimento, primo fra tutti il bombardamento con atomi veloci (Fab), seguito da electrospray (Esi) e dal desorbimento laser assistito da una matrice (Maldi), che hanno reso possibile lo studio di molecole non volatili e ad alto peso molecolare, ha aperto le porte della spettrometria di massa verso campi di applicazione fino ad allora inaccessibili per sfociare nella moderna genomica e proteomica.

Oggi la spettrometria di massa costituisce una metodologia di ricerca interdisciplinare con possibili applicazioni in ogni area della scienza, dalla fisica alla chimica, dalla biologia alle scienze biomediche e alle discipline ad esse connesse. L'estesa applicabilità è resa possibile grazie a importanti proprietà che questa metodologia possiede, prima fra tutte l'estrema sensibilità, alcune femtomoli sono sufficienti per ottenere uno spettro di massa; una notevole selettività e specificità; l'alta risoluzione, che consente di poter ottenere separazioni di ioni isobarici; l'ampio intervallo di masse analizzabili, da poche unità a milioni di dalton; una notevole versatilità per essere accoppiata con metodi separativi per l'analisi di miscele complesse; la possibilità di essere interfacciata con sistemi robotizzati, in grado di gestire e controllare tutte le fasi che vanno dalla preparazione del campione all'interpretazione dello spettro di massa mediante interrogazione di banche dati, che consentono di raggiungere un'elevata efficienza. Il ritmo incessante con cui ven-

gono introdotte innovazioni strumentali, dall'introduzione di nuove tecniche di ionizzazione alla messa a punto di strumenti ibridi, e le continue applicazioni a sempre nuovi campi di ricerca, rendono la spettrometria di massa una metodica interdisciplinare estremamente moderna in grandissimo sviluppo. Risulta perciò impossibile descrivere in modo esaustivo gli innumerevoli campi di applicazione in cui questa metodologia viene utilizzata. In questo articolo ne verranno presentati solo alcuni, noti e meno noti, tratti dalla letteratura recente.

Spettrometria di massa/biologia: un legame indissolubile

Indubbiamente la crescita più spettacolare delle applicazioni della spettrometria di massa riguarda lo studio di biomolecole. In questa ottica, John B. Fenn e Koichi Tanaka sono stati insigniti del premio Nobel per la Chimica 2002 per aver reso possibile, attraverso l'introduzione dei metodi di ionizzazione Esi e Maldi, l'analisi di macromolecole biologiche mediante spettrometria di massa. Oggi lo studio del genoma e del proteoma vede la spettrometria di massa svolgere un ruolo primario e insostituibile. Il suo accoppiamento con tecniche separative e l'interfacciamento con potenti mezzi bioinformatici e robotici consentono di poter raggiungere un'elevatissima efficienza, indispensabile per poter studiare l'intero pool di proteine che caratterizza un organismo o un tessuto cellulare [3].

La ionizzazione Maldi, generalmente accompagnata da un analizzatore a tempo di volo (Tof), trova impiego per caratterizzare proteine intere, per determinare il loro peso molecolare e per studiare il *fingerprint* dei peptidi ottenuti dalla proteolisi delle proteine con vari enzimi. L'electrospray, oggi in grado di poter analizzare flussi di nanolitri/minuto, in unione con la spettrometria di massa tandem, consente di poter ottenere informazioni strutturali e di determinare la sequenza dei vari peptidi preventivamente separati *on line* da un sistema Hplc. La spettrometria di massa risulta insostituibile anche per lo studio delle numerosissime modificazioni post-traduzionali delle proteine, e i recenti sviluppi di nuove metodologie, basate sull'introduzione, biologica o chimica, di isotopi stabili nelle proteine e nei peptidi, hanno consentito di estendere le applicazioni della

G. Giorgi, Centro Interdipartimentale di Analisi e Determinazioni Strutturali - Università di Siena. gianluca.giorgi@unisi.it

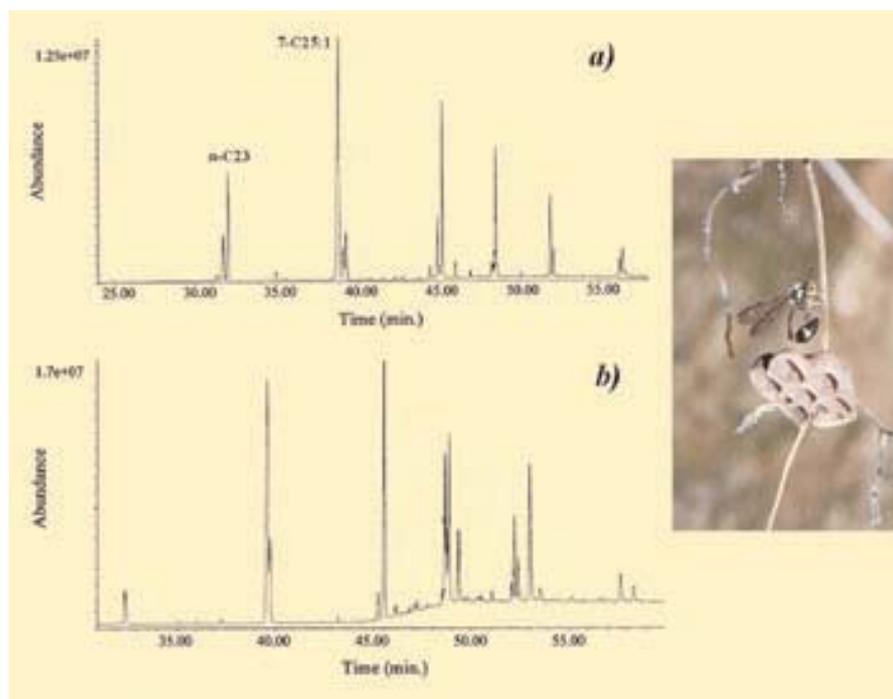


Figura 1 - Cromatogramma ionico totale della secrezione della ghiandola di Dufour prodotta dalle vespe *Stenogastrine Eustenogaster hauxwellii* (a) e *Liostenogaster tutua* (b) ottenuto mediante analisi SPME-GC-MS (adattata da [7])

spettrometria di massa anche alla loro determinazione quantitativa [4]. La spettrometria di massa trova applicazione non solo nella genomica e nella proteomica, ma anche in tutte le cosiddette scienze "omics", caratterizzate da questo suffisso nella lingua inglese. Così questa metodologia viene applicata estesamente anche alla peptidomica, ovvero lo studio del contenuto peptidico di un organismo, fluido biologico, tessuto o cellula [5] e alla metabolomica, disciplina che si occupa della caratterizzazione dei vari prodotti del metabolismo.

L'utilizzo di metodi di ionizzazione *soft*, che permettono di trasportare intatte dalla soluzione allo stato gassoso anche specie interagenti fra loro con legami deboli, ha consentito di estendere le applicazioni della spettrometria di massa anche allo studio e alla caratterizzazione di complessi non covalenti di peptidi, proteine e acidi nucleici [6].

La spettrometria di massa trova interessanti applicazioni anche in altri campi del mondo biologico, come ad esempio la zoologia. Un'applicazione recente riguarda la caratterizzazione della secrezione addominale di vespe (Figura 1). Questa secrezione è usata in due distinti contesti biologici: nella nutrizione delle larve, come substrato su cui viene posto il cibo e per proteggere le uova dalla predazione da parte delle formiche. L'utilizzo della micro estrazione in fase solida (Spme) e l'accoppiamento gas cromatografia-spettrometria di massa, con ionizzazione elettronica e chimica, hanno consentito la caratterizzazione delle secrezioni prodotte da tre specie di vespe della sottofamiglia delle *Stenogastrine* mostrando la presenza di idrocarburi saturi e insaturi a lunga catena e alcoli come prodotti principali [7]. Anche in molti ambiti della biologia vegetale la spettrometria di massa svolge un ruolo importante. La caratterizzazione dei principi attivi di estratti vegetali è un requisito importante per poterne definire gli effetti farmacologici e l'efficacia terapeutica. Sia l'ac-

coppiamento GC-MS sia quello Hplc-MS possono essere utilizzati per identificare e quantificare ogni singolo componente all'interno di una miscela complessa di un estratto vegetale. L'analisi Hplc-MS di un estratto di *Aloe*, utilizzando la tecnica electrospray in modalità di ioni negativi, è riportata in Figura 2. La spettrometria di massa trova molteplici applicazioni anche in campo microbiologico per la caratterizzazione di batteri e virus [8]. Sia la ionizzazione Maldi sia quella electrospray permettono la rapida caratterizzazione di microrganismi riducendo al minimo la preparazione del campione. Ciò consente sia di definire ioni marker di una determinata specie, sia di individuare specie ioniche derivanti dalla variabilità plasmidica che permettono la differenziazione dei vari ceppi. Un esempio è riportato in Figura 3. La possibilità di studiare interi microrganismi mediante spettrometria di massa consente di poter affrontare una serie di studi epidemiologici, come la rapida distinzione tra specie patogene e non, che riveste notevole importanza nei luoghi occupazionali, nei presidi sanitari e nel monitoraggio ambientale.

La spettrometria di massa nelle scienze biomediche

Come ha sottolineato Silvio Garattini, direttore dell' "Istituto Mario Negri", in occasione del premio per l'attività 2003 conferitogli dalla Divisione di Spettrometria di Massa al XXI Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana, la spettrometria di massa svolge un ruolo primario e sta assumendo una diffusione sempre più ampia nelle scienze biomediche. Questa metodologia offre un contributo importante per la risoluzione di problemi in settori fondamentali per la salute dell'uomo e consente di migliorare e potenziare i servizi offerti dalla sanità.

La spettrometria di massa riveste un ruolo primario a livello clinico nella diagnosi e nel monitoraggio di disfunzioni metaboliche nei neonati e negli adulti [9]. L'ampia varietà di disfunzioni che possono essere studiate, la ridotta preparazione del campione e l'alta efficienza fornita dalla spettrometria di massa e dalla MS/MS ha portato allo sviluppo e all'attuazione di programmi di monitoraggio nei neonati di un gran numero di di-

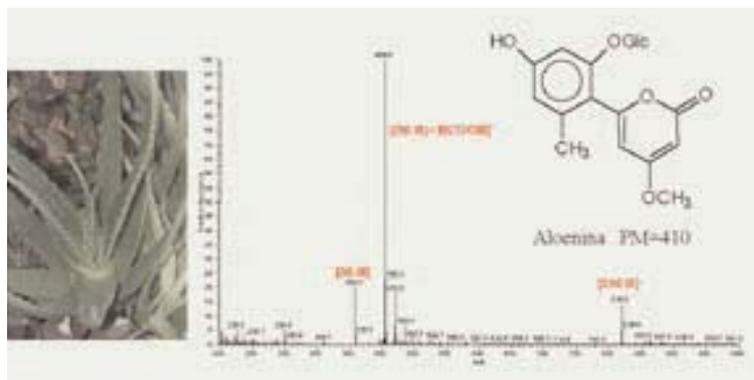


Figura 2 - Spettro di massa ottenuto mediante ionizzazione electrospray di ioni negativi dell'aloenina, un componente dell'estratto di aloe [12]

sfunzioni legate agli amminoacidi, alle acidurie organiche e a difetti dell'ossidazione degli acidi grassi. Da una singola goccia di sangue è possibile fare lo screening di oltre trenta malattie metaboliche. Nuove applicazioni sono anche nel campo delle diagnosi prenatali, post mortem, in medicina forense e del lavoro. La spettrometria di massa svolge un ruolo insostituibile anche in campo farmacologico e farmacocinetico, nello studio del metabolismo e nella cinetica di reazioni biochimiche. Legato all'ambito biomedico vi è lo sviluppo di vaccini. Nella progettazione di nuovi vaccini e molecole immunoterapiche, è importante l'identificazione degli amminoacidi e la determinazione della sequenza primaria di peptidi antigenici derivati da agenti pato-

geni. Per questo è necessario utilizzare nuove metodologie dotate di selettività e sensibilità a livello femtomolare. Tra queste, la spettrometria di massa occupa un posto di rilievo [10].

Un futuro molto prossimo in ambito biomedico è rappresentato dall'analisi topografica a livello molecolare di un tessuto, di una cellula o di un organo. Questa può essere ottenuta dalla spettrometria di massa *imaging*. L'immagine prodotta dall'acquisizione di numerosi spettri Maldi permette di identificare cellule che producono livelli abnormi di una determinata molecola, per esempio una proteina, e di poterle differenziare dalle cellule sane. Ciò potrebbe potenziare la diagnosi e il trattamento di numerosi tumori. Tuttavia questa metodologia necessita ancora di ulteriori sviluppi prima che possa trovare applicazioni routinarie e di screening in ambito biomedico e sanitario [11].

La spettrometria di massa nelle scienze umanistiche

Uno dei problemi che si presentano alla moderna archeologia è la caratterizzazione chimica dei vari reperti per poter acquisire informazioni sugli usi, costumi e sulla civiltà dei popoli che li hanno usati nei tempi passati. In questo settore la spettrometria di massa trova ampie applicazioni, soprattutto nell'analisi dei residui organici depositati sui reperti archeolo-

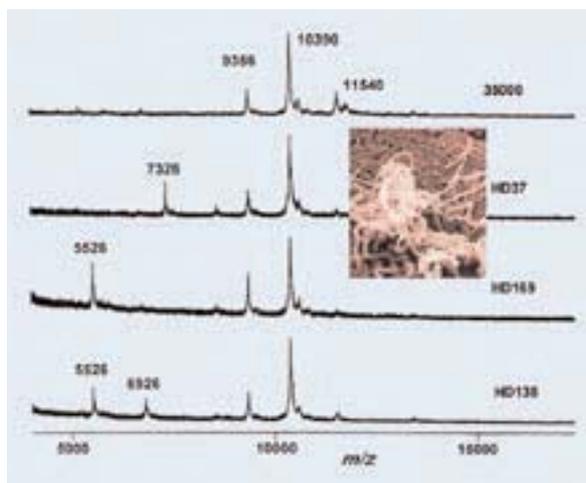


Figura 3 - Spettri Maldi del batterio *Haemophilus ducreyi*, ceppi 35000, HD37, HD169 e HD138. Gli ioni marker sono a m/z 9356, 10390 e 11540, mentre gli altri presenti negli spettri sono specifici dei vari ceppi (adattata da [13])

gici. Questa analisi è indirizzata all'individuazione di marker biologici per poter correlare componenti molecolari, principalmente lipidi, che si sono preservati nel corso dei secoli, con le biomolecole che oggi si trovano nei tessuti animali e vegetali. Ovviamente, nel corso del tempo, si è avuta una degradazione chimica, biologica e/o fisica del materiale organico con la conseguente formazione di prodotti di decomposizione, che possono essere non presenti nei materiali odierni, e possono essersi verificati cambiamenti nella distribuzione dei vari componenti. Inoltre, un uso promiscuo di un certo manufatto complica ulteriormente l'analisi.

Poiché i residui organici presenti

nei reperti archeologici sono costituiti da miscele complesse di più analiti, molti dei quali presenti in tracce e con proprietà chimico fisiche diverse, sono richieste metodiche sofisticate dotate di alta selettività, specificità e sensibilità. Molteplici tecniche di spettrometria di massa accoppiate a tecniche separative trovano largo impiego in questo settore. L'analisi GC-MS consente di identificare le componenti volatili e a basso peso molecolare (Figura 4); l'accoppiamento con la pirolisi (Pyr-GC-MS) permette di caratterizzare gli analiti non volatili; l'utilizzo della spettrometria di massa per lo studio dei rapporti isotopici accoppiata alla gas cromatografia e alla combustione (GC-C-Irms) permette di poter risalire alla biogenesi e origine del materiale in esame, mentre l'accoppiamento Hplc-MS permette di caratterizzare i componenti più polari.

Da questa breve panoramica appare evidente come la spettrometria di massa rappresenti una metodica universale di analisi quali-, quantitativa applicabile allo studio di tutte le molecole dotate di massa. Poiché tutte le molecole esistenti in natura hanno una massa, i prossimi sviluppi tecnologici e strumentali ampliaranno ancora di più gli orizzonti applicativi di questa metodologia verso nuovi ambiti della scienza.

Bibliografia

- [1] John B. Fenn, premio Nobel per la Chimica 2002.
- [2] J.R. De Laeter, *Mass Spectrom. Rev.*, 1994, **13**, 3.
- [3] R. Aebersold, D.R. Goodlett, *Chem. Rev.*, 2001, **101**, 269.
- [4] S.E. Ong, L.J. Foster, M. Mann, *Methods*, 2003, **29**, 124.
- [5] G. Baggerman *et al.*, *J. Chromatogr. B*, in corso di stampa, 2003.
- [6] S.A. Hofstadler, R.H. Griffey, *Chem. Rev.*, 2001, **101**, 377.
- [7] M.F. Sledge *et al.*, *J. Insect Physiol.*, 2000, **46**, 753.
- [8] B.L.M. van Baar, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2000, **24**, 193.
- [9] M.S. Rashed, *J. Chromatogr. B*, 2001, **758**, 27.
- [10] G.A. Poland *et al.*, *Vaccine*, 2001, **19**, 2692.
- [11] P.J. Todd *et al.*, *J. Mass Spectrom.*, 2001, **36**, 355.
- [12] G. Giorgi, L. Salvini, A. Tiezzi, risultati non pubblicati.
- [13] A.M. Haag *et al.*, *J. Mass Spectrom.*, 1998, **33**, 750.
- [14] G. Giorgi *et al.*, Massa 2002, Congresso Int. di spettrometria di massa, Cetraro (CS), 27 giugno-1 luglio 2002.

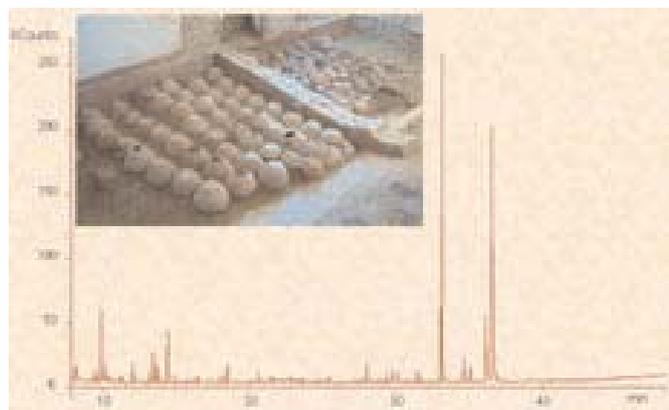


Figura 4 - Analisi GC-MS di una ceramica del XIV secolo trovata nel convento del Carmine a Siena [14]