

SPETTROMETRIA DI MASSA (MS)

Componenti spettrometro di massa:

- Sorgente di ioni: ci serve per ionizzare il mio campione e porta il mio campione in fase gassosa e quindi volatilizzazione dell'analita. Un analita per essere sottoposto a MS deve essere volatilizzabile e ionizzabile. A seconda della natura chimica del mio analita devo utilizzare sorgenti idonee.
- Analizzatore di massa: parte dello spettrometro che può lavorare secondo diversi principi ma che fondamentalemente separa gli ioni generati in base al loro rapporto massa/carica. Ho due principali classi di analizzatori: quelli a filtro e quelli a tempo di volo. Quelli a filtro filtrano gli ioni molecolari in base al rapporto facendo raggiungere uno ione o meno al rilevatore in base al suo rapporto massa/carica. Quelli a tempo di volo invece discriminano gli ioni in base al tempo che impiegano a raggiungere il rilevatore. Non tutti gli analizzatori sono compatibili con tutte le sorgenti di ioni.
- Rilevatore: misura il valore

Uno spettro di massa è un grafico in due dimensioni: in ascissa avremo il rapporto massa/carica e in ordinata abbiamo un abbondanza relativa. Ogni barra dello spettro rappresenta uno ione con specifico rapporto massa/carica e l'altezza della barra ci dice qual è la sua abbondanza relativa nello spettro. La barra con l'altezza maggiore viene posta a 100. Non significa che sia lo ione più abbondante nel mio campione → dipende da come ho fatto l'analisi e a quale setting strumentale ho utilizzato e da quali parametri ho settato nell'analizzatore. L'intensità di per se non ha un significato specifico: a seconda di come effettuo l'analisi questa potrebbe variare.

COME OTTENGO UNO SPETTRO DI MASSA

1. Il campione viene caricato nello strumento MS e subisce vaporizzazione
2. Le componenti del campione vengono ionizzate attraverso una varietà di metodi (per esempio, da un impatto con un fascio di elettroni), e si determina la formazione di particelle cariche, o ioni (ionizzazione)
3. Gli ioni vengono separati in base al loro rapporto massa/carica (m/z) all'interno dell'analizzatore, attraverso l'applicazione di opportuni campi elettromagnetici
4. Gli ioni vengono rilevati, solitamente con un metodo quantitativo
5. Il segnale viene trasformato in uno spettro di massa degli ioni

INFORMAZIONI RICAVATE

1. Massa del composto, o in modo più specifico ci consente di misurare il rapporto massa/carica da cui poi si ricava la massa dello ione molecolare (ove la carica è uguale ad uno allora tale rapporto coincide con la massa dello ione molecolare)
2. Informazioni sulla struttura molecolare attraverso la caratterizzazione dei meccanismi di frammentazione delle molecole.
3. Formula bruta degli analiti

RISOLUZIONE E SENSIBILITÀ

Risoluzione: essa dipende dalla capacità dello strumento di distinguere dei segnali molto vicini fra loro. Più sono capaci di distinguere due picchi con un ΔM molto piccolo e maggiore è la mia risoluzione. Quando ho una risoluzione tale da distinguere due picchi che differiscono per la 4 cifra decimale allora mi è consentito calcolare la massa esatta.

Sensibilità: quanto mi è facile distinguere un segnale rispetto al rumore di fondo. Tanto più sensibile quanto meno campione mi serve per generare un segnale distinguibile dal rumore di fondo. Devo avere un rapporto segnale/rumore tale da poter identificare il segnale stesso.

Quando lavoro con masse piccole mi è più facile avere una buona risoluzione rispetto a quando lavoro con masse elevate. Il ΔM rispetto alla massa diventa sempre più piccolo. Risolvere masse piccole è più facile che risolvere masse grandi perché la differenza percentuale tra le energie cinetiche possedute da due ioni, che è proporzionale a $(\Delta m/m)$, è tanto minore quanto maggiore è la massa.

Quando parlo di massa dello ione molecolare devo necessariamente considerare anche diverse cifre significative dopo la virgola; questo perché devo poter considerare anche le differenze di massa dovuto anche alla presenza dei diversi isotopi naturalmente presenti nel campione. La composizione dei diversi nuclidi presenti e della loro abbondanza relativa posso andare a stimare la massa dell'intera molecola fino a 4 cifre decimali differenti. Diverse molecole potrebbero avere una stessa massa in unità ma con diverse cifre decimali.

PICCHI ISOTOPICI

Es. vi sono due elementi come cloro e bromo che hanno degli isotopi con abbondanza isotopica rilevante naturalmente. Il cloro lo ritroviamo nel 25% come cloro 37 e non 35 come nel resto dei casi. Una molecola costante di cloro mi darà due picchi di massa relative al cloro che differiscono per due unità e che hanno un rapporto di 3:1. Se nella molecola ho due atomi di cloro mi aspetto di osservare tre picchi che differiscono di due unità (molecola con due 35 o due 37 e caso in cui ho un 37 e un 35). Stesso discorso è possibile farlo con il bromo. Il bromo è presente in natura con due isotopi: ^{79}Br , 51% circa, e ^{81}Br , 49% circa. Gli ioni contenenti un atomo di bromo producono due picchi, uno a peso molecolare M ed uno a peso molecolare $M+2$ in rapporto circa 1:1.

SORGENTE

La sorgente nello spettrometro serve a due funzioni fondamentali: deve ionizzare il mio analita e in secondo luogo deve rendere volatili gli analiti. Vi sono diversi tipi di sorgenti che si differenziano non soltanto per i principi chimico-fisici alla base del loro funzionamento ma possono presentare efficienze diverse anche in termini di ionizzazione e volatilizzazione. Una prima discriminante quando voglio interpretare dati di massa è capire che tipo di sorgente è stata utilizzata. Se so che un certo analita non può essere ionizzato/volatilizzato nelle condizioni in cui lavora la sorgente X allora so di non poter usare quella sorgente. A priori posso anche sapere che non posso vedere un analita nello spettro di massa perché in quell'analisi, seppur presente nel campione, non poteva essere ionizzato/volatilizzato.

LA SORGENTE EI O AD IMPATTO ELETTRONICO

Sorgente fra le prime introdotte e ancora ad oggi utilizzata per alcuni campioni specifici quali alcani o idrocarburi. Non è sicuramente adatta all'analisi di biomolecole.

La generazione dello ione molecolare è permessa dall'impatto elettronico: l'analita viene bombardato da un fascio di elettroni. Tipicamente nelle sorgenti vi è un filamento di tungsteno o segno al quale si applica una differenza di potenziale intensa (ma variabile) permettendo ai filamenti di generare il fascio di elettroni ad alta energia che impattano sull'analita. L'effetto netto prodotto di questa interazione è quello di portare all'estrazione di un elettrone dall'analita e quindi alla formazione di un analita radicalico con carica positiva. L'interazione che massimizza il trasferimento di energia è quella a 90° . La massa dell'analita non cambia (posso trascurare la massa dell'elettrone).

La potenza che applico è regolabile e di conseguenza regolabile la quantità di energia che trasferisco al mio analita e quindi anche il grado di ionizzazione della molecola. Vi è un valore di potenziale 70 elettronvolt che è ottimale per ottenere il massimo grado possibile di ionizzazione dell'analita; questo valore di potenziale ha una condizione peculiare per cui la lunghezza d'onda del fascio di elettroni risulta essere nello stesso intorno della lunghezza media dei legami presenti nelle molecole organiche. Quando vi è questa coincidenza massimizzo l'effetto dell'impatto e quindi di ionizzazione. A lunghezze d'onda inferiori l'interazione sarà meno efficiente ma lo stesso vale per valori superiori rischiando anche un minor controllo del processo in termini di frammentazione dell'analita.

Perché dovrei lavorare ad un potenziale diverso da quello ottimale? In base alla classe di composti organici questi potranno dare frammentazioni in modo più o meno significativi e quindi devo poter utilizzare potenziali differenti in base alle esigenze di analisi.

Il vuoto spinto deve sempre essere presente all'interno della sorgente EI: gli ioni molecolari si muoveranno solamente per l'effetto di campi magnetici che io applico.

Quando io osservo uno spettro di massa ottenuto in seguito ad EI mi aspetto di osservare non soltanto il picco degli ione molecolare ma anche i picchi di frammenti generati. La presenza dei picchi degli ioni frammento possono darci delle informazioni strutturali; il problema è che gli analiti, in base alla loro natura, una maggior o minor propensione alla frammentazione.

Altro svantaggio è legato al fatto che l'analita deve essere introdotto già in fase gassosa: questa sorgente di fatto è in grado di ionizzare il campione ma non lo volatilizza (o lo fa con bassa efficienza). Questa sorgente può essere e viene spesso interfacciato con tecniche separative di gascromatografia che precedono la spettrometria.

Cos'è un radicale? Esso è una specie chimica ad alta energia ed chimicamente instabile. Essa è una specie molto reattiva. Altra cosa fondamentale è che la carica positiva associata ad un radicale è delocalizzata su tutta la molecola. Quando parto da molecole insature (doppi o tripli legami, o aromaticità) o da molecole con etero-atomi di solito è proprio da questi elementi che proviene l'elemento mancante.

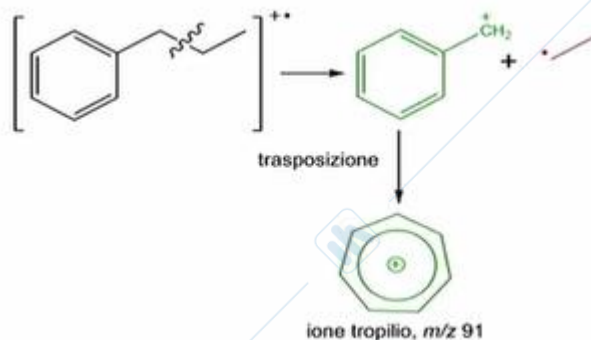
Le reazioni di frammentazione sono tutte reazioni unimolecolari. Questo perchè siamo in alto vuoto e la probabilità di incontro-scontro è praticamente nullo. I processi di frammentazioni possono avvenire attraverso due meccanismi principali:

- Scissioni semplici: ove ho la rottura omolitica di un legame e quindi gli elettroni vengono tenuto uno per ogni elemento. Quello che produco è una specie neutra e un altro catione. Ottengo un radicale neutro (nella spettrometria sarà un frammento perso) e un catione non radicalico.
- Riarrangiamenti: in questi casi non si ha solo la rottura del legame ma la formazione di altri nuovi. In questo caso ho la formazione di un nuovo radical cationico e di un frammento che viene perso.

Nota bene: i frammenti generati potrebbero in alcuni casi andare incontro ad ulteriore frammentazione. In tutti e due i casi bisogna comunque ricordare che la frammentazione avviene se porta a prodotti più stabili di quello di partenza e la carica rimarrà sul frammento che meglio sta con la carica; ad esempio si generano i carbo-cationi più stabili (la stabilizzazione per risonanza è maggioritario rispetto a quello induttivo). Anche la presenza di un eteroatomo con doppietti liberi può favorire specifiche scissioni.

SCISSIONE IONI TROPILIO

Una *scissione* peculiare è quello che genera uno ione tropilio. Nel caso in cui si abbia un benzene con una catena laterale di lunghezza variabile (acil-benzene) allora osservo con alta frequenza la rottura tra il carbonio alfa e beta della ramificazione; si genera un intermedio con CH₂ con carica



positivo che da origine ad una trasposizione originando un sistema ciclico a 7 atomi di carbonio carico. Questo perché lo ione tropylio è un composto aromatico più stabile del precedente. È l'aromaticità che conferisce maggior stabilità a questo composto perché delocalizza la carica su tutta la molecola. Lo ione tropylio potrà poi essere identificato nello spettro di massa con un picco caratteristico corrispondente al rapporto m/z pari a 91.

Quando ho un alchilbenzene quindi all'interno di massa osserverò il picco caratteristico con m/z 91.

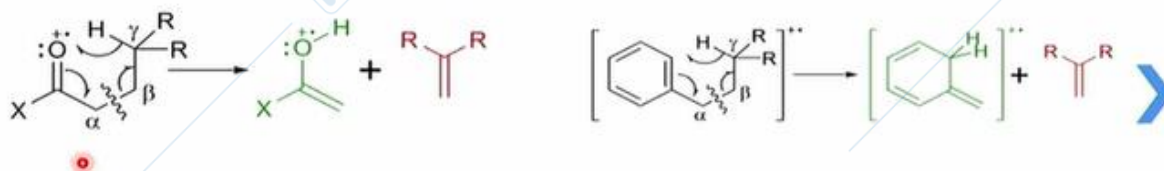
RIARRANGIAMENTI CARATTERISTICI



I *riarrangiamenti* prevedono rottura e formazione di legami. Quando ho la combinazione di questi che mi porta alla perdita di piccole molecole neutre allora la molecola

mostra una certa propensione a tale riarrangiamento (riarrangiamento Retro diels alder).

Altro riarrangiamento peculiare riguarda il riarrangiamento di McLafferty: il meccanismo ci ricorda la decarbossilazione degli acidi beta-dicarbossilici. Il risultato prevede la formazione di un alchene e di un enolo (tautomeria cheto-enolica). Ho rottura e formazione di nuovi legami.



Analogamente può avvenire su un alchil-benzeni. In questo caso avrò picchi sia riguardanti lo ione tropylio a anche i picchi dati dai prodotti di riarrangiamento.

Lezione 5

MECCANISMI E SCHEMI DI FRAMMENTAZIONE

I tipi di frammentazione che andremo ad analizzare sono solo quelle più frequenti ma sappiamo che alcuni casi non danno frammentazione mentre in altri casi ancora le sorgenti potrebbero originare danno frammentazioni differenti.

Gli schemi che vedremo partono dal presupposto che abbiamo uno ione catione di partenza.

ALCANI

Analizzati in modo quasi esclusiva attraverso sorgenti EI (impatto elettronico). Esse sono fondamentalmente molecole apolari e che non classifichiamo come biomolecole le quali non hanno problematiche legate alle volatilità anche con utilizzo di EI. Quando si analizzano alcani si utilizzano spesso tecniche di EI o analoghe.

Negli alcani lineari si producono spettri di massa ove osserviamo il picco dello ione molecolare non è mai il picco base. Ma il picco dello ione molecolare è molto poco intenso ma sempre visibile: questo ci consente di determinare la massa.

Tuttavia queste molecole non hanno gruppi funzionali quindi la probabilità che ciascuno dei legami si frammenti è la stessa. Una volta che si genera uno ione frammento per rottura dei legami fra CH₂ questo sarà ancora soggetto a frammentarsi: si accumulano frammenti che generalmente hanno 3-4 unità di carbonio. Quello che mi aspetto di vedere è un insieme di picchi che differiscono per 14 unità di massa e l'intensità relativa maggiore compete ai C₃ o ai C₄.

Quando ho un alcano lineare quindi mi aspetto di osservare tanti picchi di massa che differiscono per 14 unità. Mi aspetto di vedere il picco di massa per lo ione molecolare. Gli altri picchi distribuiti con un abbondanza relativa abbastanza caratteristica.

Quando ho delle ramificazioni invece la frammentazione dello ione molecolare sarà influenzata dai punti di ramificazioni. In questi punti si generano dei carbo-cationi più stabili. In questo caso quindi avrò una distribuzione delle abbondanze relative differenti. Se sposto la ramificazione avrò comunque una variazione della distribuzione dei picchi sulla base dei quali posso localizzare la ramificazione.

ALCHENI

Il picco di massa dello ione molecolare ha un'intensità particolarmente visibile. Anche se in linea di principio il doppio legame dovrebbe favorire alcune frammentazioni, la facile migrazione del doppio legame nello ione molecolare rende impossibile localizzare la posizione originale del doppio legame; per esempio, lo spettro del 2-ottene e quello del 4-ottene sono praticamente identici. In questo caso quindi potrebbe essere meno informativa rispetto agli alcani.

IDROCARBURI AROMATICI

Gli alchil benzeni danno con alta frequenza origine allo ione tropilio. In altri casi danno origine a riarrangiamento di McLafferty (devo avere almeno 3 carboni con un idrogeno in gamma) con picco caratteristico m/z 92.

Se osservo un picco a 91 e uno a 92 è altamente probabile che si tratti di un alchil-benzene. Il picco a 91 si ritiene essere più diagnostico nella maggior parte dei casi.

ALCOLI

In soluzione gli alcoli possono deprotonarsi perdendo un protone. Per cui nel loro caso osserviamo è un picco non dello ione molecolare quanto più il picco corrispondente a M-1. Altro caso è quello in cui viene persa acqua: in questo caso osservo un altro picco caratteristico di M-18 (peso molecolare dell'acqua).

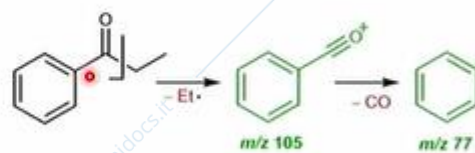
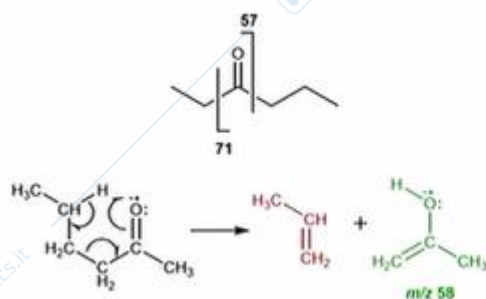
Quello che accade molto spesso è che si rompa tra il carbonio alfa e beta: questo forma un catione stabilizzato per risonanza. Nel caso degli alcoli primari si forma un frammento con m/z 31 ma se il carbonio è sostituito e quindi è secondario avrà un frammento dato da 31 + massa gruppo R. L'altro ione frammento generato potrebbe assumere la carica soprattutto se la catena è molto lunga e si tratta di un alcano che seguirà le regole degli alcani.

CHETONI

Rotture dei legami fra carbonio carbonilico e carboni alfa. Da i frammenti che si generano posso determinare la struttura delle catene laterali.

Inoltre posso sempre avere riarrangiamento di McLafferty che mi porta ad avere dei picchi caratteristici con rapporto = 58. Tuttavia se R diverso dal metile allora tale valore potrebbe cambiare.

Per quanto riguarda i chetoni aromatici è favorita la rottura del legame fra il carbonio carbonilico e il carbonio in alfa con perdita del radicale alchilico e successiva perdita di CO. Si genera un frammento caratteristico con rapporto 77.



Frammentazione favorita dei

ALDEIDI

Si comportano in modo simili ai chetoni ma sul gruppo carbonilico vi è n solo gruppo R e un idrogeno. Quindi picco caratteristico è quello dato dall'M-1 dopo distacco dell'idrogeno. Si potrebbe frammentare anche il legame CC con picco caratteristico =29 (tipico delle aldeidi). Di solito lo ione molecolare è visibile seppur a meno intensità.

Sempre se si rispettano le condizioni posso avere riarrangiamento di McLafferty con generazione di picco caratteristico con m/z 44 anch'esso diagnostico di un aldeide.

ACIDI CARBOSSILICI

Riarrangiamento di McLafferty è uno dei meccanismi di frammentazione prioritari. Si genera un picco con m/z 60. Inoltre potrei avere rotture e frammentazioni della catena alifatica come potrei avere la rottura del legame con liberazione di $-OH$.

ESTERI

Possiamo identificare due condizioni o classi:

- Esteri con porzione acilica dominante
- Esteri con porzione dominante alcolica

Meccanismi di frammentazioni diversi nei due casi: si comporteranno un po' più la presenza del gruppo carbossilici mentre nell'altro caso richiamano la frammentazione degli alcoli.

Riarrangiamento di McLafferty con frammenti che mi riflettono la natura del gruppo R presente nell'estere. Posso avere rottura tra il legame del carbonio e l'ossigeno del gruppo OR e inoltre possibile rottura tipica degli alchil-benzeni.

Se parte acilica dominante posso sempre vedere lo ione molecolare. Nell'altro caso invece lo ione molecolare è debole o assente.

AMMINE

Gruppo funzionale $-NH$

In genere nel caso di composti con atomi di azoto è utile ricordarsi la regola dell'azoto. Ogni qual volta una molecola presenta una massa che risulta essere pari o non contiene atomi di azoto o ne contiene in un numero pari.

Gli schemi di frammentazione ricordano gli alcoli; l'evento più frequente è quello della rottura del legame CC tra l'alfa e il beta perché anche in questo caso si forma carbocatione stabilizzato per risonanza. Se l'ammina è primaria allora picco 30, se l'ammina non è primaria allora questo varia in funzione dei gruppi sostituenti. Questo meccanismo risulta estremamente frequente nelle ammine primarie.

LIMITAZIONI DELL'IMPATTO ELETTRONICO

La sorgente EI ha due tipi di problemi:

1. Non si può usare se il composto non è sufficientemente volatile. Quasi tutte le molecole organiche di natura organica e di interesse biologiche non sono quasi mai volatili. Possibili rimedi: derivatizzazione dei gruppi funzionali diminuendo la polarità del composto e quindi aumentare la sua volatilità (zuccheri e composti poliossidrilati; acidi carbossilici). Esempio funzionalizzazione degli OH per acetilazione o per silizzazione. Posso permettere così l'analisi di questi composti con impatto elettronico. Il problema che genero è che di fatto modifico il composto: faccio l'analisi

di massa del composto derivatizzato e non del mio analita. problema due è che devo avere un grado di funzionalizzazione che è pari al 100% o quasi. Quindi difficile scelta dei metodi di funzionalizzazione che mi diano delle rese quantitative. Spesso il metodo scelto vada bene per una classe di composti e non per un'altra: dal campione potrei vedere solo alcune componenti e non altre della miscela. Questo può generare grossi problemi se oltre ad un'analisi qualitativa ma quantitativa → avrò una quantificazione che è funzione del grado di derivatizzazione.

Di fatto la spettroscopia non è quantitativa. A seconda del metodo di ionizzazione sto utilizzando potrei avere dei segnali più o meno intensi in base al grado di ionizzazione. Devo fare delle rette di calibrazione se voglio risolvere il problema; non sempre possibile per miscele complesse. In alcuni casi inoltre in base alla sorgente utilizzata potrei non vedere completamente la presenza di un analita. Se in condizioni adeguate la massa invece è una tecnica estremamente sensibile e posso rilevare analiti in concentrazioni di pico-molari.

2. Lo ione molecolare non è visibile se la frammentazione è eccessiva fino a non poter visualizzare lo ione molecolare. Possibili rimedi: energia di ionizzazione più bassa di 70 eV al fine di ridurre l'evento frammentazione. La probabilità che uno ione molecolare frammenti dipende dalla natura chimica dell'analita ma anche da quanta energia fornisco al sistema attraverso la differenza di potenziale applicata. Modificando il voltaggio applicato però possiamo avere anche delle differenze riguardo la sensibilità.

Lezione 6

CHEMICAL IONIZATION (CI)

Di fatto sorgente variante dell'impatto elettronico e che può essere utilizzata in modo complementari alla precedente se dotati di strumenti adeguati. È difficile trovare nuovi strumenti con questa tipologia di sorgente ma è molto facile trovare dati in letteratura ottenuti con questa tipologia di sorgente.

In questo caso la ionizzazione dell'analita avviene attraverso il trasferimento di un protone; nella maggior parte dei casi l'analita viene protonato assumendo una carica. Esso viene protonato in virtù della presenza nella sorgente del plasma di ionizzazione; di fatto la sorgente risulterà essere saturo dalla presenza di *gas reagente*. Questo è rappresentato da molecole quali metano, ammoniaca e isobutano (questi sono i più utilizzati) i quali vengono ionizzati da un flusso di elettroni ad alta energia. A questo punto il gas reagente stesso trasferisce protoni al mio analita. gli elettroni vanno ad ionizzare sostanzialmente il gas reagente e non gli analiti solo perché questo è più abbondante – ve ne è una maggior probabilità.

A livello degli spettri di massa questo metodo comporta che le masse osservate non sono quelle del composto ma saranno uguali alla massa +1 (massa del protone) → il risultato anche in questo caso dipende dal metodo di ionizzazione.

Anche in questo caso si producono ioni mono-carichi. Quindi m/z ove zeta è uguale ad uno rimane uguale ad m .

Se pensiamo alla struttura chimica delle molecole che abbiamo descritto come gas reagenti non sono delle specie protiche: non sono così favorevoli alla donazione di protoni. Serve una componente ad alta energia per poterli ionizzare. Tale energia non viene trasferita direttamente all'analita ma al gas reagente. Questi tuttavia avendo un'affinità per i protoni minori rispetto all'analita e quindi avrà trasferito il protone all'analita. Tuttavia la produzione del plasma di ionizzazione prevede comunque l'utilizzo di alte quantità di energia.

La conseguenza di questo è che, a differenza dell'EI, la quantità di energia trasferita all'analita sono esigui e viene limitato il fenomeno di frammentazione. Essa è un primo esempio di *sorgente soft* (EI viene definita una sorgente hard). Non ho risolto il problema della volatilizzazione ma ho attenuato il problema della frammentazione.

FAST ATOM BOMBARDMENT (FAB)

Questa è la prima sorgente introdotta che ci permetta di risolvere il problema di volatilizzazione e consente quindi l'analisi di massa di molecole polari. Questa sorgente prevede l'uso di un bombardamento dell'analita con degli atomi di Xenon: questi vengono portati ad un alto livello di energia cinetica e introdotti nella sorgente lungo una piastrina su cui è depositato il campione. In questa sorgente si prevede la dissoluzione del campione in una matrice. Questa in generale è una sostanza protica (molecole in grado di cedere protoni) e poco volatile ad esempio glicerolo, 1-tioglicerolo o alcol 3-nitrobenzoico.

In questa sorgente la matrice protica deve cedere protoni al mio analita. Vi è uno scambio di protoni fra la matrice e l'analita.

- FAB⁺ :viene protonata la specie chimica dell'analita. Misuro la $M+1$.
- FAB⁻ :si cerca di strappare un protone all'analita. Misuro $M-1$

La volatilizzazione è garantita dal fatto che l'impatto ad alta energia produce una sorta di desorbimento; avviene perché la molecola solida è sciola nel solvente e successivamente faccio in modo che tali particelle si stacchino dalla superficie su cui erano poggiate. Al detector arriveranno sia particelle di analita che di matrice.

Uno dei problemi principali è che all'interno dello spettro avrò i segnali anche della matrice: esse daranno un picco molto intenso dato da $S \pm 1$ (ove S è la massa della matrice) ma possono dare anche picchi multipli. Al di sotto dei 400 Da posso avere un sacco di segnali molto dei quali derivano dalla matrice. Se l'analita di interesse ha massa molto più alta non mi creano problemi ma se la massa è bassa allora potrei avere dei problemi di sovrapposizione dei segnali. Questa sorgente non è adeguata all'analisi di analiti con massa inferiore ai 400 Da. Questo non è da sottovalutare: molte small molecules di interesse biologico hanno una massa inferiore ai 400Da.

Oltre allo ione pseudomolecolare $[M+H]^+$, nel FAB⁺ sono spesso visibili ioni del tipo $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$, dovute all'aggiunta alla molecola di uno ione Na⁺ o K⁺ invece che di un protone

L'energia trasferita allo ione molecolare è abbastanza bassa, la maggior parte è assorbita dalla matrice ma non esclusivamente, quindi non vanno esclusi fenomeni di frammentazione. Riuscirò sempre a vedere il picco dello ione molecolare ma non escludo di vedere picchi di ioni frammento.

ELECTRON SPRAY IONIZATION (ESI)

Sorgenti fra le più utilizzate ad oggi.

L'ionizzazione passa attraverso la generazione di una spray. All'interno di questo ritroveremo delle droplet cariche. Il principale vantaggio di questa sorgente risiede nella possibilità di interfacciare la MS con un sistema fluidico liquido (cromatografia liquida). Questo perché tale sorgente accetta come campione un liquido derivante direttamente da una fluidica. Questo presuppone un metodo di volatilizzazione che sia capace di eliminare la componente liquida per consentire la volatilizzazione. Gli eluenti di una cromatografia saranno delle miscele di solventi polari (cromatografia su fase inversa). Quello che possiamo fare è far passare la soluzione attraverso un ago capillare ove viene applicato un potenziale tipicamente positivo: 3/4 KV. Succede che il fatto stesso che il liquido passi attraverso il capillare fa in modo di generare lo spray e il potenziale applicato permette l'ottenimento di particelle cariche. Queste tenderanno a frammentarsi e scomporsi in goccioline sempre più piccole in seguito a fenomeni di repulsione di carica. Questo viene reiterato fino alla liberazione dell'analita dal solvente. Tutto questo avviene a pressione atmosferica e non a vuoto spinto rendendo compatibile l'accettazione dell'analita disciolto in una miscela di solvente. Interfacciare la massa con una cromatografia mi consente di separare almeno parzialmente gli analiti presenti nella mia miscela in base ai tempi di eluizione della cromatografia prima di entrare nella massa.

Questo particolare metodo di generazione dello ione molecolare fa sì che questo spesso assuma più cariche: ho alta probabilità di generare ioni multi-cariche. Questo comporta una più difficile definizione del rapporto m/z (z non è sempre uno). I picchi rappresentano sempre tale rapporto ma la massa può variare. All'aumentare della carica la massa diminuisce. Questo da un lato genera una complicazione dello spettro con difficoltà a determinare la massa dell'analita. Tuttavia questo risulta essere comunque possibile perché nello spettro avrò tanti picchi corrispondenti allo stesso analita ma so sempre che due picchi continui rappresentano la stessa massa che differiscono per un'unità di carica. Posso determinare la massa attraverso sistemi in due equazioni con due incognite.

Per fare l'analisi di molecole ad alto peso molecolare devo avere strumenti con una buona risoluzione: al crescere del valore di M il ΔM di fatto in proporzione è sempre minore e quindi mi servono strumenti con alta risoluzione. Il vantaggio di avere ioni multi-carica è quella che il valore che misuro sono valori molto piccoli come rapporto. Posso permettermi di utilizzare un

potere risolutorio dell'analizzatore meno elevato. Questa caratteristica fa dell'ESI una delle sorgenti più utilizzate.

A livello della natura degli analiti che posso analizzare non ho grossi limiti se non per alcuni analiti che sono strettamente apolari.

Frammentazione possibile ma poco frequente; se necessaria posso avere degli accorgimenti strumentali nell'analizzatore. È chiaro che l'aspetto che gli spettri possono assumere è molto diversa in base alla sorgente. La distribuzione dei picchi, in spettri ESI, riflette la presenza di ioni multi carichi e non rappresentativi di ioni frammenti. Il fatto che una molecola possa generare più o meno ioni multicarica è legata anche alle condizioni di reazione; a seconda delle condizioni sperimentale potrebbe cambiare la presenza di ioni multi-carichi.

APCI (ATMOSPHERIC PRESSURE CHEMICAL IONIZATION)

Esiste un'altra sorgente che mix tra la CI e l'ESI. In questo caso abbiamo una ionizzazione chimica che avviene a pressioni atmosferiche. Anche in questo, così come l'ESI, tale sorgente è interfacciabile con sistema di fluidica che prevede l'eluizione di solventi apolari (cromatografica in fase diretta). Anche qua devo eliminare il solvente che è una miscela apolare e il metodo che utilizzo nella maggior parte dei casi è il riscaldamento a temperatura abbastanza elevate.

L'ionizzazione degli analiti è ottenuta con l'utilizzo di una scarica elettrica con effetto a corona. Scaldare il campione può danneggiare delle sostanza termolabili. L'ionizzazione avviene su un gas (nell'ESI avviene su particelle liquide).

Lezione 7

SORGENTE MALDI

Il MALDI somiglia per alcuni aspetti al FAB ma con alcune differenze sostanziali. In questo caso il campione è solubilizzato in una matrice solida solubilizzata in un solvente e il campione è introdotto nello spettrometro in forma cristallina. La matrice è solitamente un composto solido solubilizzato a cui noi aggiungiamo piccole quantità dell'analita solubilizzato. Il campione liquido viene così depositato su una lastrina metallica la quale è introdotta nella sorgente. La lastrina è introdotta soltanto dopo evaporazione e co-cristallizzazione di analita e matrice.

Sulla lastrina è possibile avere diversi spot: posso depositare n-campioni e inserisco questa in un forno ad aria che utilizza un flusso d'aria controllato per far evaporare velocemente i solventi. Il campione è quindi introdotto in forma di co-cristallo con la matrice. La matrice mi serve per assorbire l'energia di un raggio laser che rappresenta il metodo attraverso al quale trasferisco energia sufficiente al campione per promuoverne volatilizzazione attraverso processo di desorbimento. Anche in questo caso la stragrande maggioranza dell'energia fornita sarà assorbita dalla matrice e quindi gli eventi di frammentazione dell'analita in genere trascurabili. Anche questa è classificata come sorgente soft.

Analogamente al FAB la ionizzazione avviene contestualmente al processo di desorbimento attraverso la formazione di ioni pseudo-molecolari. Posso avere eventi di protonazione e aggiunte di sodio/potassio. Avrò anche in questo caso dei segnali di $M+23$ e $M+39$.

Il raggio laser trasporta luce ultravioletta e quindi le molecole utilizzate come matrici devono essere molecole in grado di assorbire questo tipo di energia esempio DHB e HCCA (spesso molecole aromatiche, doppi legami coniugati e numerosi gruppi carbossilici). Questi in presenza di altri composti organici cedono il protone favorendo la ionizzazione.

Il fatto di introdurre il campione così comporta alcune peculiarità:

1. Posso ripetere l'analisi n-volte: posso farlo fino a quando ho un rapporto segnale/rumore soddisfacente.
2. Quando accoppio tale processo ad un microscopio posso selezionare spazialmente un punto specifico del campione su cui voglio fare la mia analisi: questo può essermi utile quando il campione è rappresentato da un campione biologico o da un campione per il quale credo che vi sia una distribuzione spaziale delle molecole. Questo è alla base del MALDI imaging: questo non produce delle immagini analoghe a quelle che vediamo con NMR o raggi X ma posso acquisire immagini attraverso le quali rilevo la presenza di un analita e ne capisco dove si ritrova nel mio campione. Posso acquisire informazioni spaziali riguardo la presenza o meno di uno specifico analita nel campione.

Questo ci dice che il MALDI non può essere interfacciato con sistemi cromatografici.

3. Altra peculiarità è che tale sorgente lavora in un modo diverso da tutte le altre. Fino ad ora le sorgenti funzionano in modo tale che una volta inserito il campione e viene ionizzato e volatilizzato fino ad esaurimento → funzionamento continuo. Nel caso del MALDI invece genera pacchetti di ioni concentrati temporalmente ad ogni impulso dato dal laser → funzionamento discontinuo. Questo si riflette sulla natura degli analizzatori che posso utilizzare a valle. L'unico analizzatore che può essere utilizzato è il TOF che ha un funzionamento compatibile con la generazione degli ioni molecolari attraverso

GLI ANALIZZATORI

Due gruppi:

- Con filtro; questi sono definiti così perché il loro funzionamento consiste nel filtrare e far arrivare sul detector soltanto gli ioni con un determinato rapporto m/z . Di fatto sotto i parametri strumentali come desiderato. Se ho una sorgente MALDI ad ogni impulso corrisponde ad un determinato setting strumentale e potrò analizzare solo uno specifico rapporto. Durante una sorgente in continuo posso invece modificare i parametri strumentali via via.
- Funzionano sulla base del tempo di volo (TOF)

ANALIZZATORE A CAMPO MAGNETICO

Questo analizzatore tipicamente è un tubo curvilineo alle cui estremità trovo la sorgente e il detector di ioni. Questo tubo è immerso all'interno di un campo magnetico. Le traiettorie degli ioni saranno curvilinee → lo ottengo grazie all'applicazione di un campo magnetico.

Gli ioni prodotti una volta usciti dalla sorgente, e si trovano nell'alto vuoto, e per essere attratti ed entrare all'interno del tubo viene applicato un potenziale che li accelera e subiscono l'effetto del campo magnetico applicato che li attrae. Per effetto del campo (B) gli ioni sono sottoposti ad una certa forza centripeta bilanciata da quella centrifuga. L'energia cinetica che assumo in uscita dalla sorgente è uguale a zV dove V è il potenziale applicato in uscita dalla sorgente e quindi il voltaggio. Questi possono essere convertiti a darci la massa $E_c = 1/2 mv^2$.

Con due calcoli possiamo correlare il rapporto m/z con l'intensità del campo magnetico, al raggio di curvatura (di fatto una costante) e al voltaggio applicato. Questa relazione ci dice che al variare dei valori di

$$m/z = B^2 r^2 / 2V$$

B e V soltanto gli ioni aventi uno specifico m/z saranno in grado di percorrere una certa traiettoria con raggio r . Variando questi due parametri (in genere viene modificato B) posso quindi permettere l'analisi di ioni con un rapporto m/z differente. In questo modo posso selezionare gli ioni.

La maggior parte di questi analizzatori a campo magnetico non ci consentono di raggiungere risoluzioni elevate. Per fare questo devo accoppiarlo ad un settore elettrostatico: esso ci permette di focalizzare gli ioni in base alla loro energia cinetica. Di fatto i nostri ioni potrebbero avere un'energia traslazionale e quindi cinetica diversa da zero anche prima dell'applicazione del voltaggio e quindi prima che vengano accelerate; con l'applicazione di questo quindi vi è una somma fra l'energia acquisita con l'accelerazione e quella già presente. Questo fa sì che l'energia cinetica complessiva non è più funzione della sola massa e velocità. Di fatto potrei avere traiettorie differenti seppur il rapporto m/z identica e viceversa → arrivano sul detector in modo analogo: bassa risoluzione.

L'applicazione del settore elettrostatico (si ottiene un analizzatore a doppia focalizzazione) prima dell'applicazione del campo che ha la funzione di minimizzare le differenze di energia cinetica fra ioni aventi lo stesso rapporto m/z . Con questa focalizzazione faccio in modo che ioni aventi m/z analoga avranno anche un'analoga E_c iniziale; questo accorgimento rende questo analizzatore in grado di lavorare ad alte risoluzioni che consente quindi di misurare masse esatte.

QUADRUPOLO

Questo è di fatto un analizzatore magnetico ma con una tecnologia e geometria differente. Gli ioni molecolari si muovono all'interno di un campo magnetico ma si muovono con l'obiettivo di passare da un'estremità del quadrupolo all'altra estremità. Esso è costituito da 4 barre le quali sono connesse due a due. Fra una coppia di barre si applica un certo voltaggio in corrente continua. Nell'altra coppia si applica un secondo voltaggio con componente oscillante e non più continua. Il

risultato è che sotto l'effetto di questi campi elettrici gli ioni molecolari carichi percorrono delle traiettorie che di fatto sono delle spirali. Variando i due voltaggi posso far variare il raggio della spirale e quindi soltanto quelli che descrivono un certo tipo di spirale riusciranno ad uscire.

Il quadrupolo è un analizzatore molto utilizzato: la percentuale di spettrometri di massa con questi analizzatori è molto elevata e questo è dato dal fatto che costa poco sia l'acquisto sia il mantenimento. Ha dimensioni ridotte. È molto adatto alla costruzione di strumenti di massa piccoli da banco.

Il problema di questo analizzatore è la bassa risoluzione e viene utilizzato quando non è necessario calcolare misure di massa esatte. Inoltre vi è un limite superiore di massa considerevole: posso misurare al massimo rapporti intorno ai 2000 Da.

Esso però oltre che come analizzatore singolo spesso lo ritroviamo in combinazione con altri analizzatori ma anche in serie di diversi quadrupolo (es. triplo quadrupolo). Le prestazioni dello strumento aumentano. Inoltre possiamo ottenere altre funzioni oltre che quelle di semplice analizzatore.

TRAPPOLA IONICA

È una variante del quadrupolo. La sua funzione principale è quella di intrappolare gli ioni molecolari. Questa può essere impiegata con la duplice funzione: analizzatore e come trappola per concentrare gli ioni con un determinato rapporto m/z .

Anche in questo caso vi sono due elettrodi collegati fra di loro e uno unico ripiegato su se stesso. Anche qua uno ha voltaggio continuo e uno armonico. In questo caso avrò un'estremità di ingresso e uno di uscita ma avrò una sorta di "ciambella" all'interno della quale cerco di intrappolare gli ioni molecolari. A seconda dei valori di voltaggio che applico posso far assumere traiettorie diverse a ioni con rapporto massa/carica diversi. La traiettoria percorsa è una traiettoria a forma di otto. In base al rapporto tali ioni verranno mantenuti all'interno della traiettoria oppure espulsi. Dopo averli concentrati nella trappola posso modificare il voltaggio e mandare tali ioni al detector aumentando la sensibilità della tecnica.

Spesso associata ad altri analizzatori.

TOF

Il TOF è l'analizzatore d'elezione associato alla sorgente MALDI (sorgente ad impulsi). Questo perché sono necessari un all'altra. Quello che avviene nel TOF è una separazione degli ioni in base al rapporto massa/carica. Vengono separati e non filtrati. Vengono discriminati sulla base del tempo che impiegano ad arrivare sul detector. Dopo un tempo sufficientemente lungo tutti gli ioni molecolari sono arrivati sul detector.

Aspetto fondamentale della sensibilità: se tutti gli ioni molecolari possono arrivare sul detector devo generare di meno rispetto a quando gli filtro. Il TOF:

- non ha limiti superiori di massa
- è il più sensibile in assoluto

Terzo punto cruciale è quello che mi permette di lavorare con una sorgente ad impulsi. Essa è richiesta perché se la separazione avviene in base al tempo è indispensabile che tutti gli ioni vengano rilasciati nello stesso momento. Il TOF può essere utilizzato anche con altri sorgenti come l'ESI se con configurazioni peculiari e accorgimenti tecnologici specifici.

Ioni con rapporto m/z differenti percorrono il TOF in tempi differenti perché saranno dotati di una velocità differente se dotati di un iniziale energia cinetica analoga. Gli ioni più veloci saranno quelli con massa piccola. Il problema della risoluzione: questa ultima condizione è vera a patto che gli ioni molecolari abbiano energia cinetica iniziale pari a zero. Se così non fosse allora ioni molecolari con rapporto m/z analogo potrebbero viaggiare all'interno del TOF con velocità differenti arrivando in tempi differenti sul detector.

Vi sono due accorgimenti tecnologici che ci permettono di bypassare il problema:

- Il primo è il reflectron, uno specchio elettrostatico che inverte la direzione degli ioni. Il reflectron ritarda gli ioni a energia cinetica maggiore (che percorrono una traiettoria più lunga al suo interno) e li fa arrivare al detector insieme a quelli ad energia cinetica minore. Negli strumenti TOF che hanno questo accorgimento lo strumento è costruito in modo tale che sorgente e detector sono alla stessa estremità del TOF. All'altra estremità ho uno specchio elettrostatico che viene penetrato più o meno profondamente dagli ioni molecolari in base alla loro energia cinetica totale. Di fatto durante l'inversione di traiettoria lo specchio potrà essere penetrato più o meno in base alla velocità con cui viaggiano. Gli ioni che viaggiano più velocemente penetreranno un po' di più: verranno maggiormente ritardati e quindi arriveranno al detector insieme. Questo metodo compensa le differenze di energia cinetica iniziale con piccole differenze sulla lunghezza di traiettoria.
- L'altro accorgimento è la delayed extraction (estrazione ritardata). Il campo elettrico che accelera gli ioni non è acceso esattamente al momento dell'impulso laser, ma alcuni microsecondi più tardi. Gli ioni che hanno già una elevata velocità si trovano più avanti quando il potenziale elettrostatico è acceso, e vengono accelerati per un minore intervallo di spazio e quindi in misura minore.

Questo accorgimento prevede che gli ioni con uguale rapporto m/z ma con diversa energia cinetica: quello con energia maggiore viene sottoposto ad un'accelerazione minore compensando la differenza. Si applica il voltaggio con un ritardo di fatto quello che viaggia di più verrà accelerato di meno. La geometria del TOF sarà quella classica.

Questi due accorgimenti sono alternativi uno all'altro. Con questi accorgimenti di fatto aumento il potere risolutivo della tecnica. Con tali accorgimenti il TOF è un analizzatore con un'alta risoluzione ed elevata sensibilità. In più non ha limiti di massa superiori.

Analizzatore più versatile e più pronto fra tutti all'analisi di macromolecole biologiche.

Lezione 8

APPLICAZIONI ALLO STUDIO DELLE PROTEINE

Principali informazioni a livello strutturale che possiamo ottenere dalla massa riguardano la struttura primaria. Avere accesso a tali informazioni è essenziale e propedeutico a qualunque altro studio eseguibile sulla proteina stessa. Determinare struttura primaria della proteina equivale ad identificarla: la sequenza di amminoacidi che compone la proteina ci permette di identificarla in modo univoco.

In seguito vi sono degli strumenti computazionali che mi consentono di prevedere quella che potrebbe essere la struttura terziaria della proteina e quindi la sua funzione. Tali metodi possono commettere errori e sono da accoppiare a test funzionali.

Se ho accesso ad un campione proteico la prima cosa da fare è determinare l'identità della proteina e posso farlo in modo diretto o indiretto attraverso la determinazione della sua struttura primaria. Vi sono due principali approcci di MS che mi permettono di identificare la proteina:

1. Metodo più semplice consistente nella determinazione dell'identità proteica sulla base del *peptide mass finger printing*.
2. Il più complesso ma più esaustivo prevede la determinazione della sequenza aa attraverso il suo sequenziamento. Voglio sapere quali aa sono presenti e in quale ordine.

PEPTIDE MASS FINGER PRINTING

Non significa sequenziarla ma significa identificarla sulla base della univocità dei frammenti peptidici che io posso ottenere a partire dalla catena polipeptidica mediante digestione enzimatica. Gli enzimi proteolitici tagliano le sequenze in oggetto in prossimità di siti consenso. Data una proteina e un enzima specifico (es. tripsina) dovrei ottenere una digestione univoca. La spettrometria massa diventa necessaria per determinare la natura dei frammenti peptidici attraverso la loro massa.

L'identificazione proteica avviene solo se ne conosco già la sequenza primaria all'interno di un data base che posso interrogare dopo l'analisi in spettrometria di massa. Al di sopra di un certo score posso asserire che il campione corrisponda ad un determinato match nel database. È quindi una metodologia che ci consente di identificare con alta confidenza una proteina ignota a patto che questa sia già stata identificata in passato (e che sia quindi già registrata in un data-base).

Procedura estremamente rapida. Poche ore.

Problema: se la proteina ancora non è stata identificata non posso utilizzare tale approccio.

Sorgenti e Analizzatori: devo avere una sorgente che non induca frammentazione, deve essere in grado di volatilizzare e ionizzare dei peptidi (molecole polari e poco volatili). Le sorgenti utilizzate sono MALDI ed ESI. Il MALDI è di fatto il più comodo e quindi sorgente d'elezione (gli ioni multi carica generate dall'ESI non mi sono utili). L'analizzatore sarà di conseguenza un TOF. Non necessito una risoluzione eccessivamente elevata ma posso lavorare con un TOF con risoluzione non eccelsa.

SEQUENZIAMENTO

Prima veniva eseguita per via chimica in modo molto laborioso e complesso.

Ad oggi eseguito con strumenti di massa in tempi relativamente brevi. La metodica più utilizzata per il sequenziamento è la così detta massa-massa (MS-MS) o massa-tandem; questa presuppone che le varie catene polipeptidiche presenti nel campione vengano frammentate e si vada a ricostruire l'intera sequenza della proteina andando a determinare la sequenza dei frammenti per poi ricomporla. In questo caso i frammenti generati sono piuttosto casuali. Per fare questo mi serve uno spettrometro di massa che sia in grado di generare frammentazione delle sequenze polipeptidiche dopo che sia avvenuta una prima analisi di massa.



Passaggi:

1. Analisi di massa
2. Frammentazione
3. Seconda analisi di massa

Raccolgo un primo dato di massa, frammento le catene, raccolgo una seconda informazione di massa. La frammentazione non può avvenire in sorgente altrimenti avrei già tutto frammentato prima della prima analisi di massa. Questa deve avvenire dopo la prima analisi di massa e avviene in una parte dello strumento che prende il nome di camera di collisione (qua in seguito ad eventi di collisione i nostri peptidi vengono frammentati). Per fare questo devo utilizzare una sorgente che non induca frammentazione. Il primo analizzatore deve essere un analizzatore che mi seleziona dei peptidi con un rapporto m/z e che funziona come un filtro. Esso non solo acquisisce il dato di massa ma seleziona solo gli analiti di interesse. Fa in modo che nella camera di collisione arrivino soltanto determinati analiti: in questo modo l'output che ottengo nel secondo analizzatore si riferisce soltanto a peptidi con un determinato rapporto m/z prima della frammentazione.

Nella camera di collisioni avvengono degli eventi in grado di trasferire energia all'analita inducendo frammentazione dell'analita rompendo i legami backbone delle proteine. Posso rompere i legami peptidico ma anche i legami che interessano i legami alfa. Per una questione sperimentale e statistica sappiamo che i legami che si rompono con maggior frequenza sono i legami peptidici (ma non solo questi!). Devo analizzare l'output dell'analisi di massa.

In questo caso io voglio frammentare il mio oligopeptide a livello di potenzialmente tutti i legami peptidici. Voglio ottenere dei frammenti che differiscano fra loro di un residuo amminoacidico. I frammenti generati dalla rottura del legame peptidico possono essere distinti da tutti gli altri grazie alla ricerca che differiscano dai peptidi genitori per un valore corrispondente alla combinazione di uno o più amminoacidi (conosco le masse esatte di tutti gli amminoacidi). Se io riesco a frammentare tutti i legami peptidici riesco a ricostruire i pattern degli aa presenti.

Da un punto di vista strumentale abbiamo bisogno di:

Spettrometro di massa con sorgente analoga a prima: non voglio la frammentazione in sorgente. Un primo analizzatore con funzione di filtro. Una camera di collisione in cui avviene la frammentazione degli oligo-peptidi. Un secondo analizzatore. La parte più complessa è poi l'analisi dell'output. Nella maggior parte dei casi gli spettrometri di massa utilizzati per questa funzione hanno solo questo impiego e funzione. Può non essere così ma spesso lo è.

L'analizzatore che virtualmente è in grado di analizzare masse di qualsiasi dimensioni è il TOF. Se do un tempo sufficiente al mio ione molecolare questo arriverà sempre e comunque al detector. Gli altri, per come sono costruiti, non sono in grado di andare oltre ad un certo valore.

Analizzatore tripli quadrupolo: sono strumenti che hanno 3 quadrupolo in serie. Questi se posti in serie successiva una all'altra possono aumentare la risoluzione finale dello strumento; in alcuni strumenti uno dei tre a seconda dell'applicazione può essere utilizzato come analizzatore o può svolgere funzione di camera di collisione. Spesso questi sono montati in serie anche con un TOF: in questo caso lo strumento all'occorrenza sarebbe più performante, mi permette di fare analisi con risoluzioni maggiori, rispetto ad un triplo quadrupolo. Il primo filtro potrebbe essere utilizzato per scartare tutti gli ioni molecolari in un range che non sono di mio interesse come quelli generati dagli inquinanti o comunque non di mio interesse. Questo mi permette di avere degli spettri in uscita da analizzatori ad alta risoluzione più puliti e quindi di più facile interpretazione.

STUDIO DELLE PROPRIETÀ STRUTTURALI DELLE PROTEINE

Vi sono delle applicazioni per lo studio di proprietà strutturali che sono un po' più sofisticate di quelle appena viste. Quando parliamo di proprietà strutturali non definiamo la struttura 3D (struttura terziaria) di una proteina quanto più riuscire ad utilizzare la spettrometria di massa per ottenere due tipi di informazioni:

1. Relative al folding
2. Relative al suo coinvolgimento in complessi super-molecolari e strutture quaternarie.

Il motivo per cui posso usare MS per ottenere informazioni strutturali di una proteina risiede nella **correlazione fra lo stato di carica di una proteina più o meno foldata e l'estensione della sua porzione direttamente accessibile al solvente**. L'accessibilità al solvente è permessa alle superfici esterne o i siti di binding (in assenza di interazione). Il core in genere è poco accessibile al solvente. L'accessibilità al solvente è meno elevata più è strutturata la proteina.

→ L'accessibilità al solvente influenza il numero di cariche che la proteina può assumere. Tutte le porzioni esposte al solvente saranno propense ad eventi di protonazione.

Questa cosa può essere valutata tramite spettroscopia di massa: l'unica sorgente che può darmi informazioni su questi aspetti è l'ESI. Questa genera ioni multicarica e dalla distribuzione di questi posso ottenere informazioni riguardo lo stato di folding della proteina. Questo lo faccio attraverso l'uso del parametro charge-state distribution che è direttamente ricavabile dalla distribuzione dei picchi. Ove la proteina è foldata i picchi con intensità maggiore sono quelli con rapporti m/z maggiori ossia cariche minori. Al contrario dopo trattamento con agende denaturante la distribuzione dei picchi cambia drasticamente: in questo caso aumenta la porzione di proteina carica. Sono analisi complesse.

Posso inoltre avere informazioni riguardante la formazione di un complesso. Il complesso può essere altamente stressato dalle fasi di ionizzazione e volatilizzazione che spesso può rompere il complesso. Per questo motivo in massa possiamo indagare interazioni proteina-ligando con alte affinità. Complessi a bassa affinità tendono a dissociarsi prima dell'analizzatore. Studi di questo tipo possono essere propedeutici prima della determinazione strutturale accurata della proteina e interazioni.