

Spettrometria di Massa



Informazioni ricavabili da uno spettro di massa

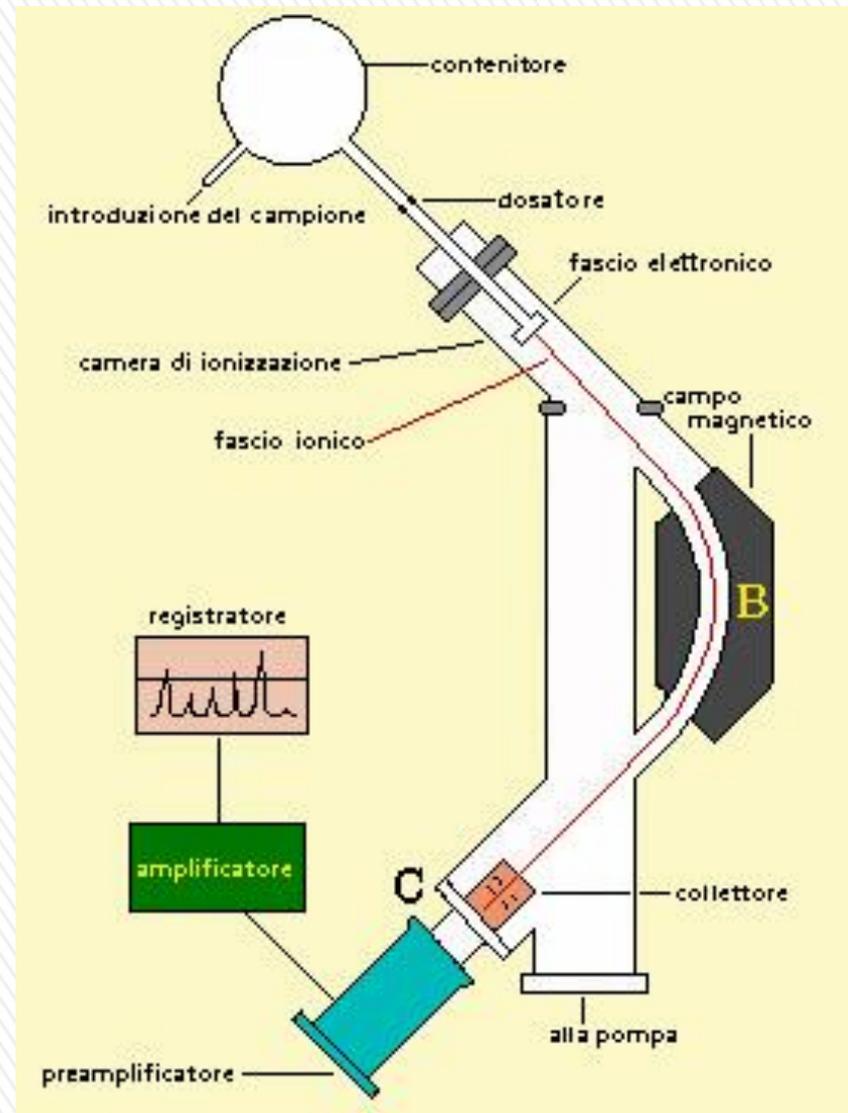
- **Massa del composto** (le molecole dell'analita vengono **ionizzate** e gli ioni "analizzati", cioè separati, in base al rapporto m/z)
- **Informazioni sulla struttura molecolare** (attraverso la caratterizzazione dei meccanismi di frammentazione delle molecole)
- **Formula bruta** degli analiti (misurando lo spettro di massa ad alta risoluzione) – analisi elementare non più necessaria



Strumentazione

Gli strumenti MS sono composti da tre moduli:

- una **sorgente di ioni**, che può convertire molecole di campione in fase gassosa in ioni (o, nel caso di ionizzazione via elettrospray, spostare ioni presenti in soluzione nella fase gassosa)
- un **analizzatore di massa**, che separa e ordina gli ioni in base alle loro masse mediante l'applicazione di campi elettromagnetici
- un **rivelatore**, che misura il valore di un indicatore in modo quantitativo e quindi fornisce i dati per calcolare le abbondanze di ciascuna specie di ioni



Come si ottiene 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

La risoluzione

- In spettrometria di massa si definisce la risoluzione necessaria a separare due picchi A e B come

$$R = M/\Delta M = \text{risoluzione} \quad \Delta M = \text{potere risolvente}$$

dove

- M è il valore del rapporto massa carica m/z del picco A
- ΔM è la differenza tra i valori di m/z di due picchi contigui picco B e picco A
- All'aumentare della risoluzione corrisponde un aumento della separazione tra i picchi.
- Due picchi adiacenti si dicono separati o risolti quando $h/H \times 100 \leq 10$, quindi l'altezza della valle tra i due picchi è inferiore al 10% dell'altezza dei picchi.
- Strumenti a bassa risoluzione separano masse unitarie fino a 2000



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

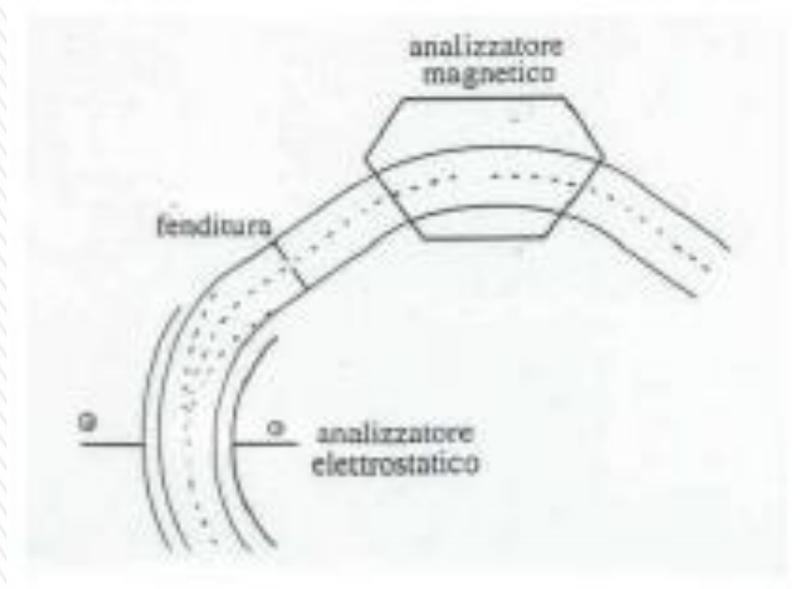
Non tutti gli ioni con lo stesso rapporto m/z possiedono la stessa energia cinetica dopo l'accelerazione

IL POTERE RISOLVENTE DI UNO SPETTROMETRO PUÒ ESSERE AUMENTATO SOLO ESSENDO IN GRADO DI SELEZIONARE IONI CON LA STESSA ENERGIA CINETICA

Strumenti a **doppio analizzatore** (vedi descrizione specifica più avanti) distinguono **4 cifre decimali** con masse di centinaia di Da

Distincono per esempio $C_{16}H_{26}O_2$ da $C_{15}H_{24}NO_2$:

$$R = 250.3836 / (250.3836 - 250.1807) \\ = 1234.024$$



Lo ione molecolare ad alta risoluzione

- **Peso atomico:** media della massa dei nuclidi pesata in base all'abbondanza isotopica.
- **Nuclide:** singola specie nucleare, caratterizzata da un numero atomico Z e da un numero di massa A .
I vari nuclidi di un particolare elemento chimico con uguale numero di protoni (numero atomico), ma diverso numero di neutroni sono chiamati **isotopi** di questo elemento.
- Le masse dei nuclidi non sono numeri interi!

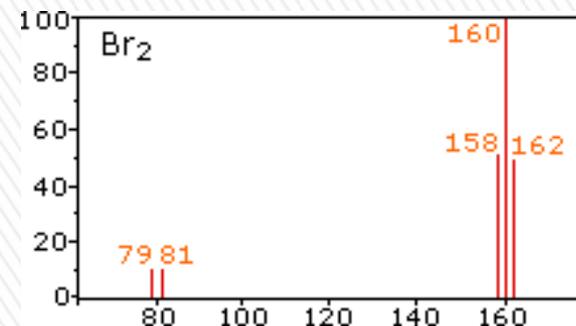
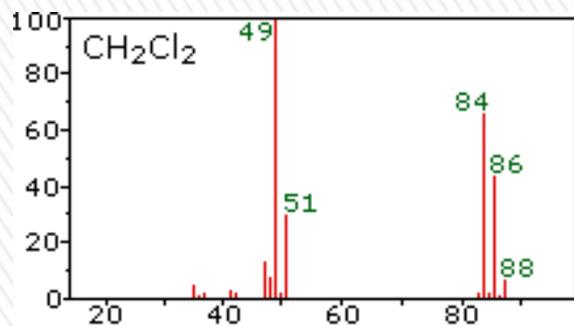
Elemento	Peso Atomico	Massa nuclide
^1H	1.00794	1.00783
^{12}C	12.01115	12.00000 (rif.)
^{14}N	14.0067	14.0031
^{16}O	15.9994	15.9949

Possiamo distinguere tra diverse formule brute possibili

- La massa vede la somma esatta dei pesi dei nuclidi, non vede il peso atomico medio.
- Esistono inoltre i **picchi isotopici** la cui abbondanza è significativa
Nel caso di Cl e Br sono presenti picchi $M + 2$

Il **cloro** è presente in natura con due isotopi: ^{35}Cl , 75% circa, e ^{37}Cl , 25% circa. Gli ioni contenenti un atomo di cloro producono due picchi, uno a peso molecolare M ed uno a peso molecolare $M+2$ in **rappporto 3:1**.

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 **rappporto circa 1:1**.



Le sorgenti di ionizzazione

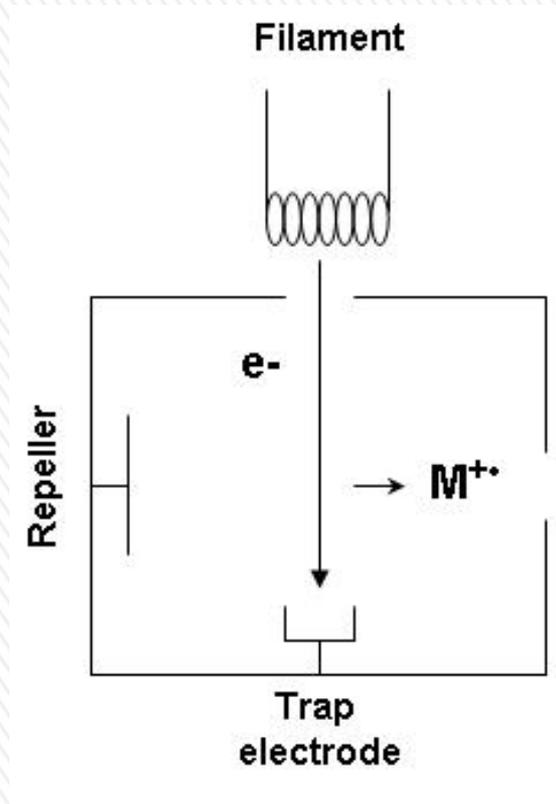


Electronic Impact/Ionization (EI)

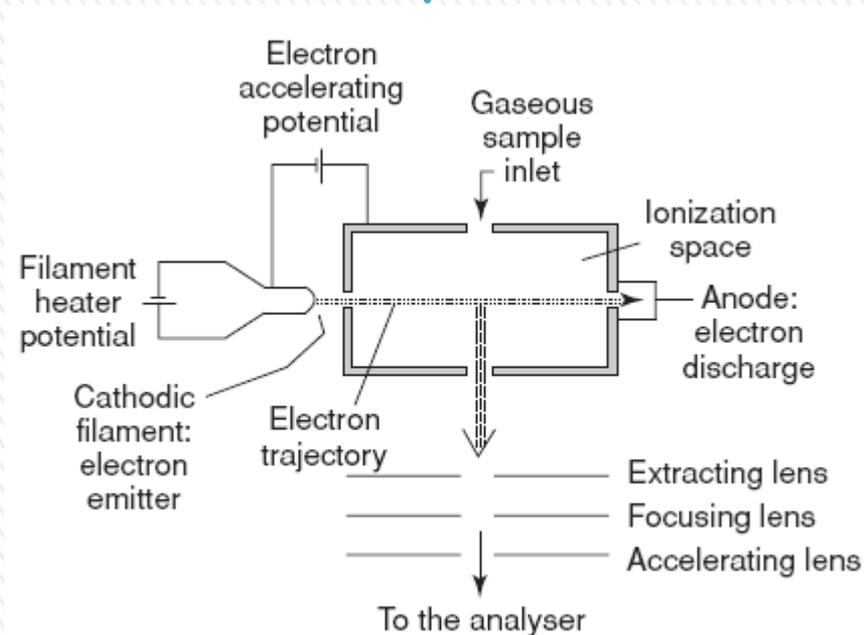
- Nella camera di ionizzazione c'è un filamento, di solito in tungsteno o renio sottoposto a una differenza di potenziale regolabile a seconda del grado di ionizzazione desiderato.
- Le molecole vengono bombardate dagli elettroni emessi dal filamento e si ionizzano generando un radical catione detto "ione molecolare":



dove M è la molecola dell'analita che deve essere ionizzata, e^- è l'elettrone e $M^{+\cdot}$ è lo ione risultante. (Si formano anche ioni negativi, ma in quantità molto minore rispetto a quelli positivi).



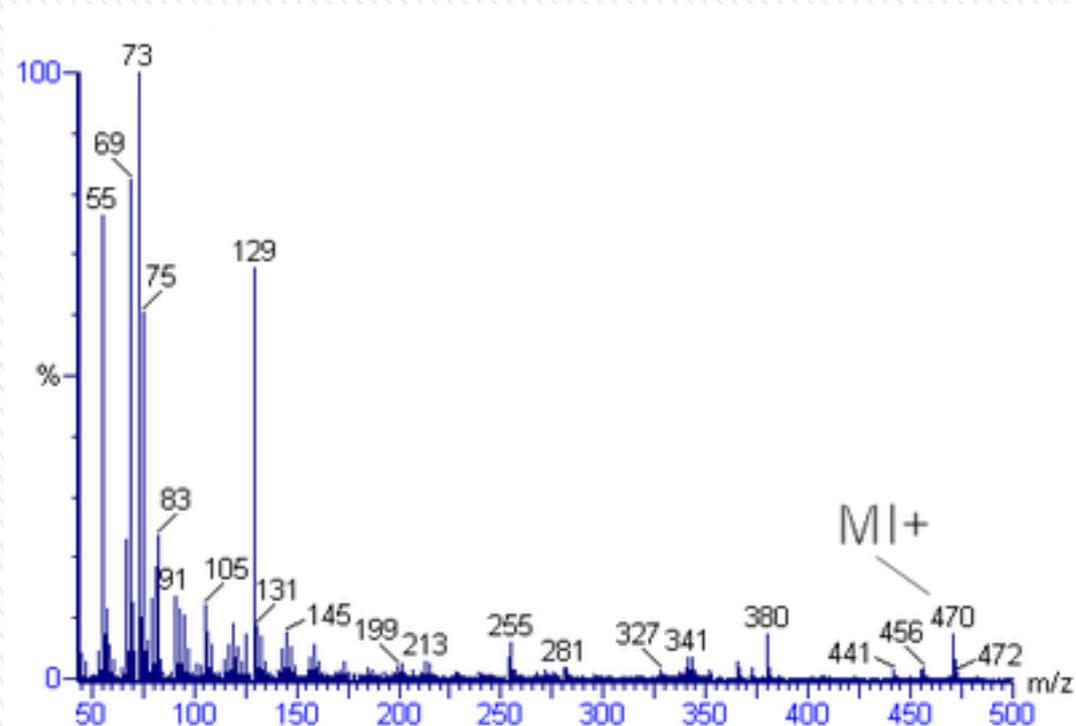
- Gli elettroni vengono accelerati a 70 eV nella regione tra il filamento e l'ingresso alla sorgente di ioni. Gli elettroni accelerati vengono poi concentrati in un fascio e attratti verso l'**elettrodo trappola**.
- Il campione viene introdotto nella sorgente di ioni in una **direzione perpendicolare al fascio di elettroni**. Lo stretto passaggio di elettroni altamente energetici provoca ampie fluttuazioni del campo elettrico intorno alle molecole neutre e ne induce ionizzazione e frammentazione.
- I cationi radicali prodotti sono poi diretti verso l'analizzatore di massa tramite un **elettrodo repulsore**.



- L'efficienza di ionizzazione e la produzione di ioni frammento dipende fortemente dalla chimica dell'analita e dall'energia degli elettroni.
- A basse energie (intorno a 20 eV), l'interazione tra gli elettroni e le molecole di analita non trasferisce energia sufficiente a provocare la ionizzazione (o quasi).
- A circa 70 eV, la **lunghezza d'onda di de Broglie** degli elettroni corrisponde alla lunghezza di legami tipici delle molecole organiche (circa 0,14 nm) e il trasferimento dell'energia alle molecole organiche è massimizzato, portando alla ionizzazione più forte possibile e alla frammentazione. In queste condizioni, circa 1/1000 delle molecole di analita nella sorgente sono ionizzate.
- A energie più alte, la lunghezza d'onda di de Broglie degli elettroni diventa inferiore alle lunghezze di legame degli analiti; le molecole diventano "trasparenti" per gli elettroni e l'efficienza di ionizzazione diminuisce

Spettri di massa ottenuti con EI

- Picco dello **ione molecolare** basso, a volte non visibile
- Tecnica altamente energetica: **frammentazione**
- Informazioni sulla **struttura molecolare** dalla frammentazione



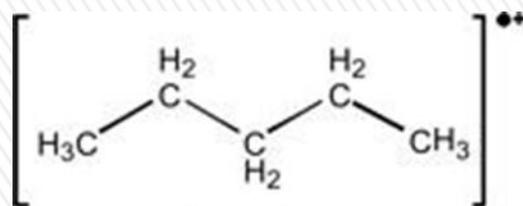
Ioni molecolari: frammentazione

- Gli ioni generati nella sorgente EI hanno alta energia, e possono spezzarsi in frammenti prima di arrivare all'analizzatore.
- Lo spettro di massa non contiene solo lo ione molecolare M^+ ed i suoi picchi isotopici, ma anche ioni a massa minore: i frammenti della molecola analizzata.
- La frammentazione fornisce importanti informazioni sulla struttura della molecola, poiché il modo in cui la molecola frammenta dipende dalla sua struttura.
- Se però la frammentazione è eccessiva, può essere impossibile identificare lo ione molecolare e determinare la massa della molecola.

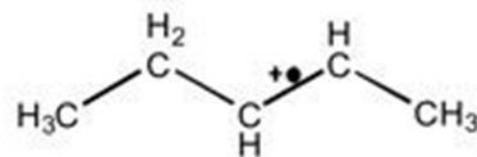


- Lo ione radicale è una specie ad energia molto alta.
- L'elettrone mancante è delocalizzato su tutta la molecola.
- In molecole insature o con eteroatomi l'elettrone mancante presumibilmente è uno degli elettroni π o di non legame.

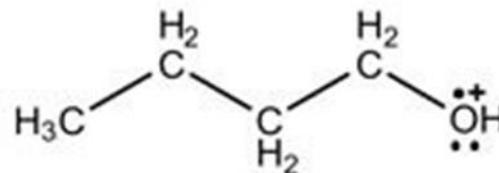
Modi di rappresentare lo ione molecolare di un alcano (a sinistra), di un alchene (a destra) e di un alcol (in basso).



Ione radicale del pentano

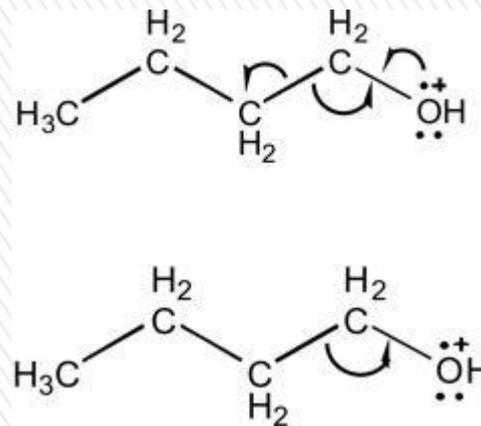


Ione radicale del 2-pentene



Ione radicale dell' 1-butanolo

- La frammentazione è un fenomeno velocissimo (tra 10^{-10} e 10^{-3} s) e quindi difficile da studiare.
- Le reazioni di frammentazione sono **reazioni chimiche unimolecolari**, dato che a pressioni molto basse (ricordiamoci che all'interno degli strumenti di massa viene fatto alto vuoto) è improbabile che due molecole si incontrino.
- Poiché si parte da radicali, si ha **spostamento di elettroni spaiati**, che è descritto da frecce a mezza punta.



Tipi di frammentazione

- Esistono due grandi classi di frammentazioni:
 1. **Semplici scissioni omolitiche di un legame** della molecola.
 2. **Riarrangiamenti** (si rompono dei legami, ma se ne formano anche di nuovi).
- Solo **uno dei due frammenti conserva la carica positiva**. Questo è chiamato **ione frammento**, e dà luogo ad un picco nello spettro di massa
- **L'altro frammento è neutro**, per cui **non** dà luogo ad un picco nello spettro di massa. Questo è chiamato **frammento perso**, e la sua massa può essere dedotta dalla differenza tra la massa dello ione molecolare e quella dello ione frammento.



- I prodotti di scissioni semplici e riarrangiamenti sono diversi.
 1. Le scissioni semplici portano alla formazione di uno ione a elettroni pari F^+ , ed ad un radicale neutro F^\cdot .
 2. I riarrangiamenti portano alla formazione di un nuovo ione radicale più leggero $F^{+\cdot}$, e ad una molecola neutra F .
- Gli ioni frammento possono ulteriormente frammentare perdendo molecole neutre.

Scissione semplice



Riarrangiamento



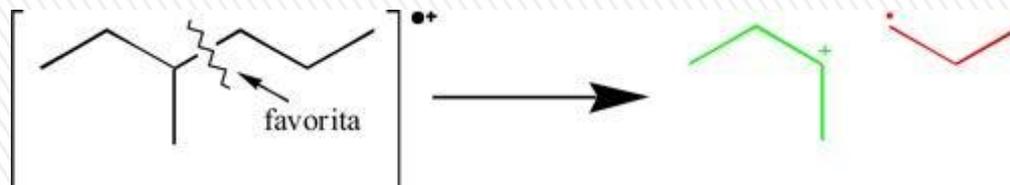
Frammentazioni di frammenti



Frammenti prodotti dai vari tipi di frammentazione. I frammenti carichi (in verde) sono visibili nello spettro, i frammenti neutri (in rosso) non lo sono. >

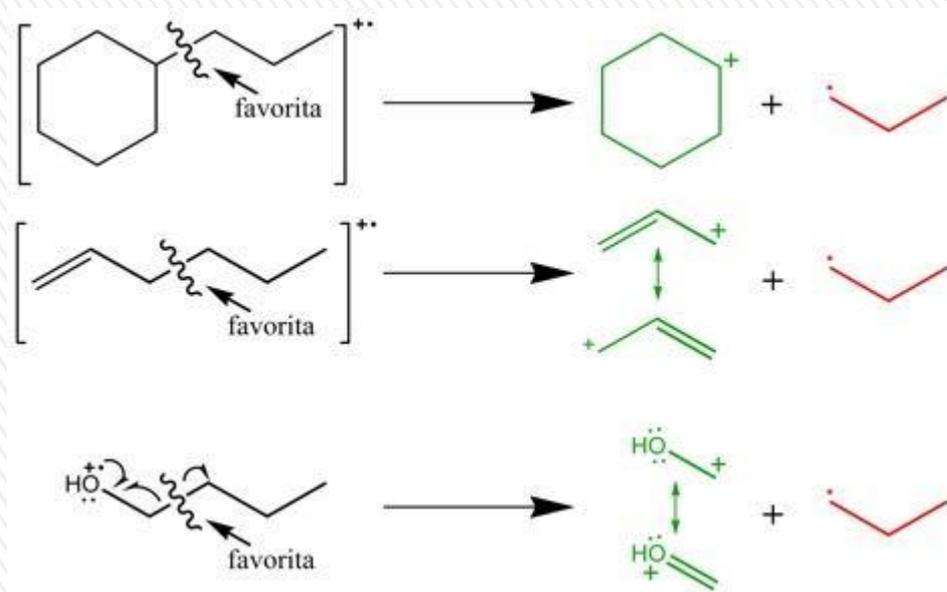
Scissioni semplici

- Ogni legame della molecola può rompersi per dare uno ione e un radicale.
- Alcune frammentazioni sono però più facili e danno quindi luogo a picchi più intensi.
- Sono favorite le frammentazioni che portano a frammenti stabili.
- È importante soprattutto la stabilità del frammento carico.



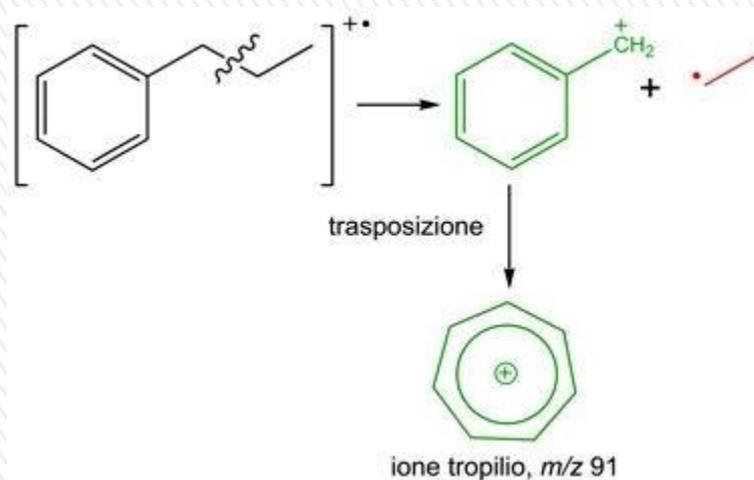
Scissioni semplici favorite

- In una catena alchilica la frammentazione in α ad una ramificazione è favorita.
- Il distacco di una catena laterale da un anello è favorito.
- La frammentazione del legame α - β rispetto ad un eteroatomo o ad un doppio legame è favorita, perché si formano carbocationi stabilizzati per risonanza.
- A parità di altre condizioni, tende a staccarsi come radicale il gruppo alchilico più grande.



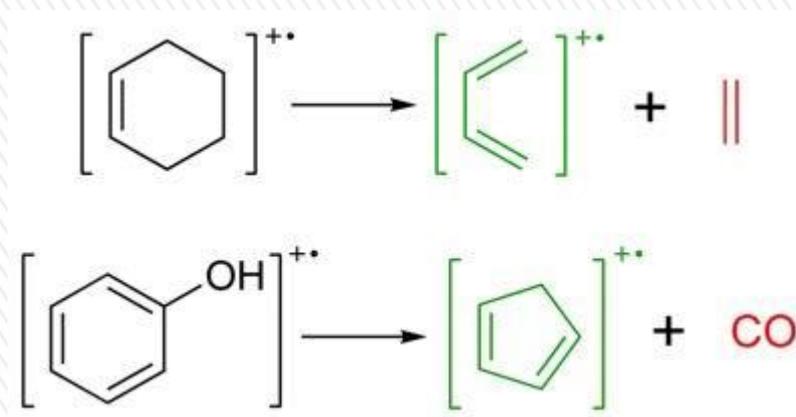
Lo ione tropilio

- Anche negli alchilbenzeni è favorita la **scissione del legame α,β rispetto all'anello aromatico**.
In questo caso però il catione benzilico traspone a **catione tropilio (m/z 91)**, un catione aromatico a 7 termini molto stabile.
- Questa è spesso la **frammentazione più importante per gli alchilbenzeni**.



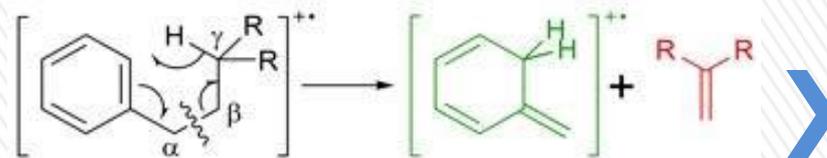
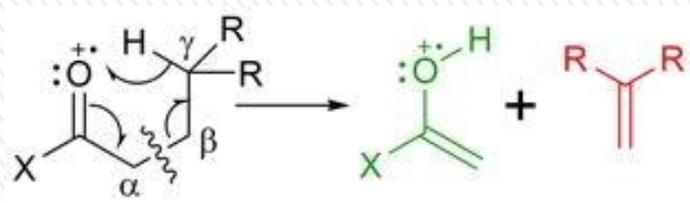
I riarrangiamenti

- I riarrangiamenti sono frammentazioni più complesse in cui si formano anche nuovi legami. Tra questi:
 - la *retro-Diels-Alder* osservata in composti cicloesenici;
 - la perdita di piccole molecole (H_2O , CO , etilene) osservata in molti composti.
- In composti senza N, i frammenti originati da scissioni semplici hanno massa intera dispari, e quelli originati da riarrangiamenti hanno massa intera pari.



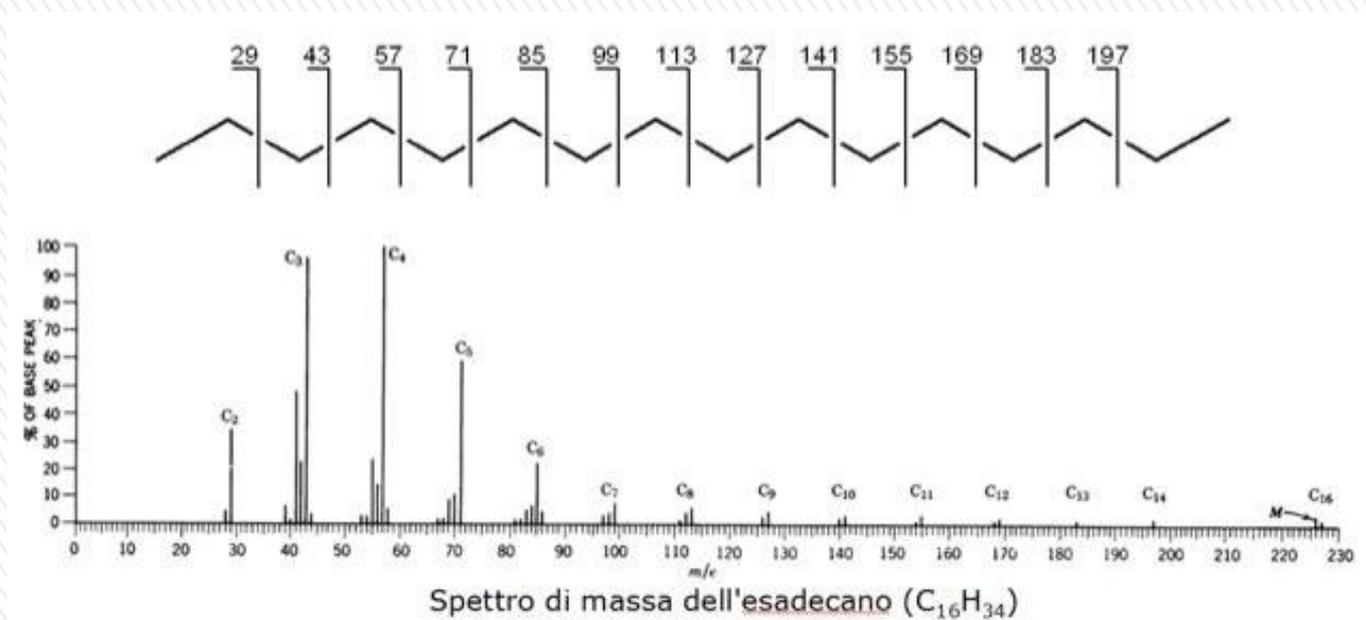
Il riarrangiamento di McLafferty

- Il riarrangiamento di McLafferty si osserva in composti carbonilici.
- Il legame α,β rispetto al CO si rompe, e contemporaneamente un H si trasferisce all'O carbonilico dal C in γ al CO, attraverso uno stato di transizione a 6 termini.
- Il riarrangiamento può avvenire solo se è presente un H in γ al CO.
- Riarrangiamenti simili avvengono anche per alcheni ed alchilbenzeni con un H in γ al C=C o benzene.

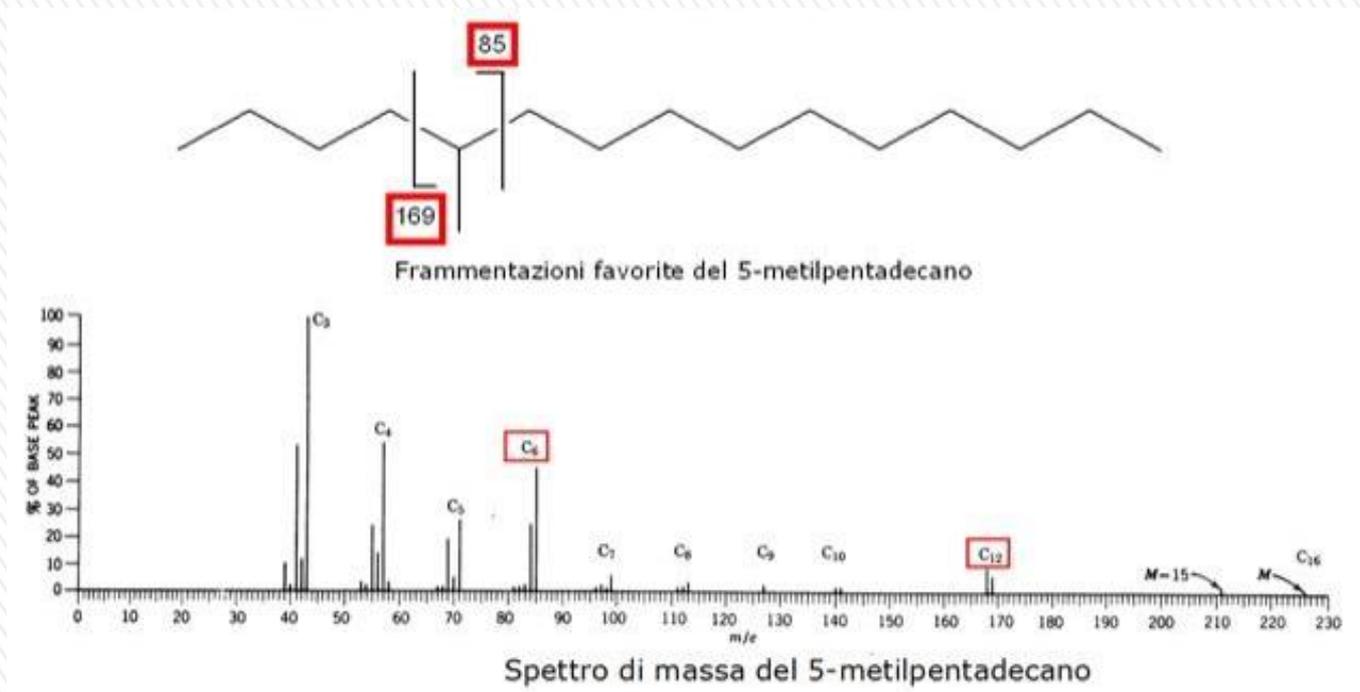


Alcani

- Ione molecolare poco intenso ma visibile
- Frammentazione di tutti i C-C: serie di picchi separati da 14 unità di massa con intensità massima per i cationi con 3-4 carboni.
- Presenti anche i picchi a C_nH_{2n} e C_nH_{2n-1}

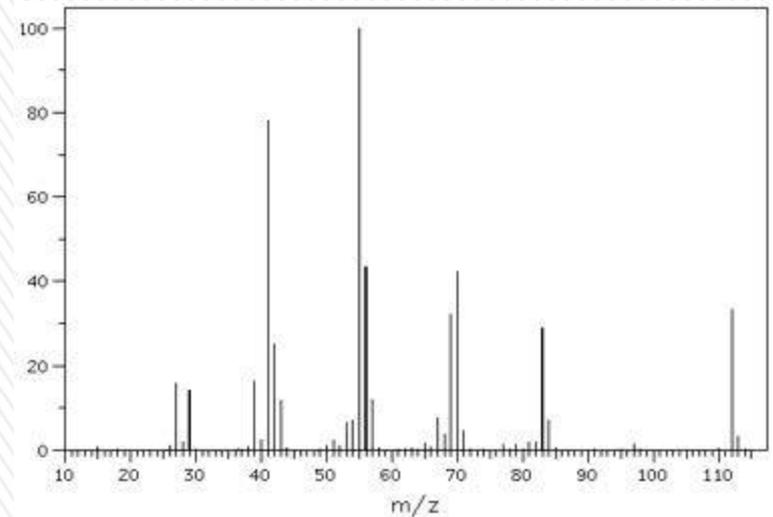
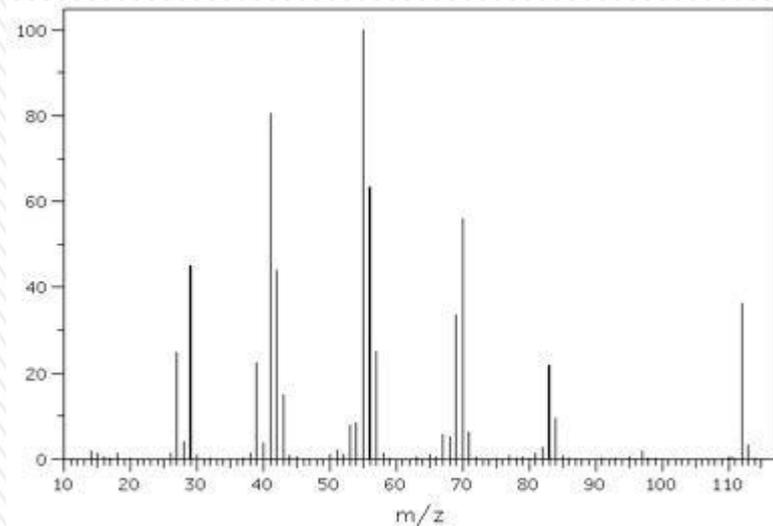


- Negli alcani ramificati le intensità presentano una discontinuità (la scissione in α ad una ramificazione è favorita e la carica rimane sul C secondario)
- La spettrometria di massa consente di localizzare le posizioni delle ramificazioni all'interno delle catene alchiliche



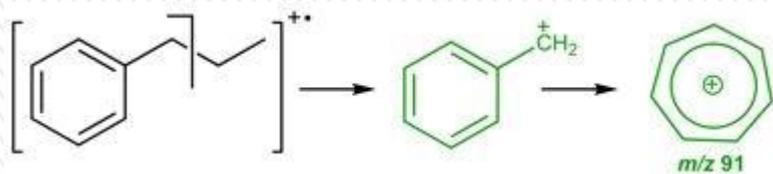
Alcheni

- Lo ione molecolare è generalmente ben 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.

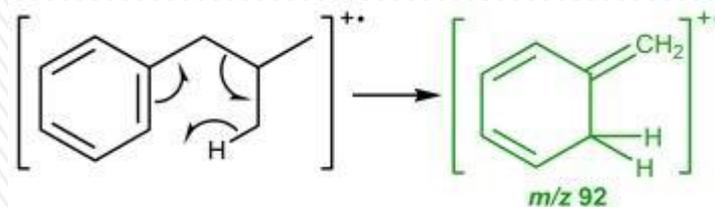


Idrocarburi aromatici

- Ione molecolare intenso.
- Alchilbenzeni: **ione tropilio a m/z 91** (anche m/z 105, 119, ecc, se ci sono α -ramificazioni).
- Picco a m/z 92 se la catena alchilica è almeno C3 (riarrangiamento tipo McLafferty).
- Cluster di picchi a m/z 77 ($C_6H_5^+$), 78 ($C_6H_6^+$), e 79 ($C_6H_7^+$).



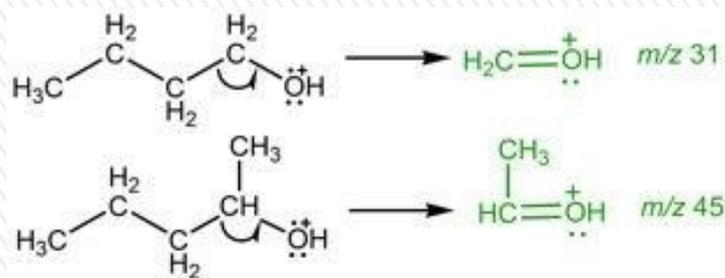
Ione tropilio



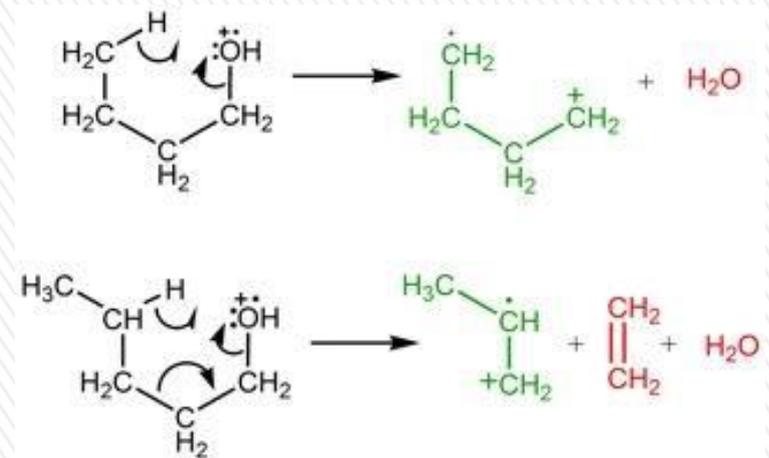
Riarrangiamento tipo McLafferty

Alcoli alifatici

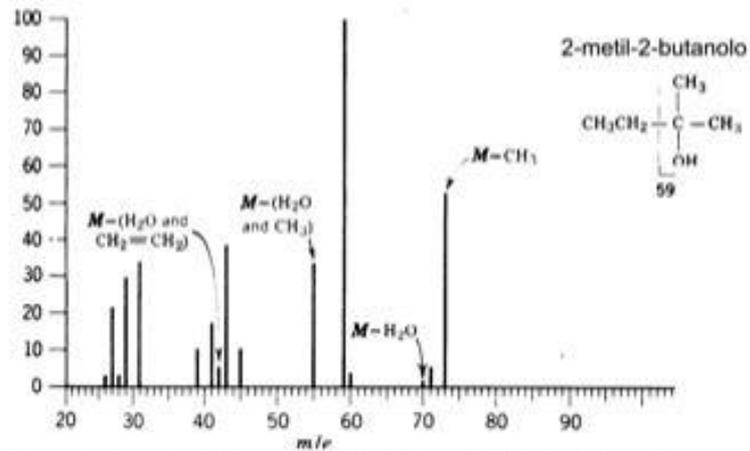
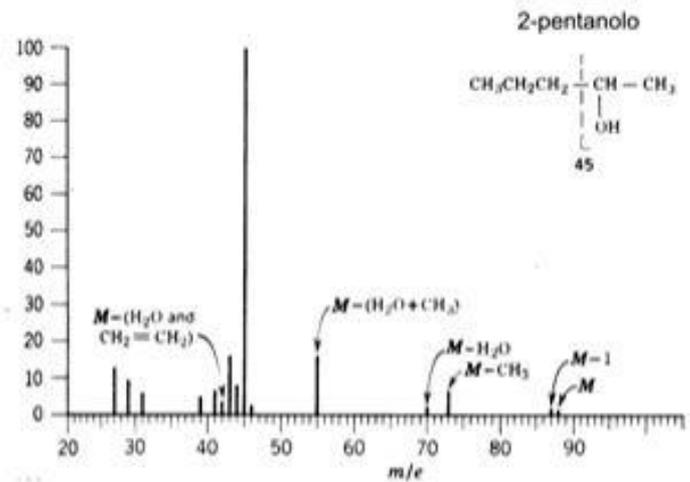
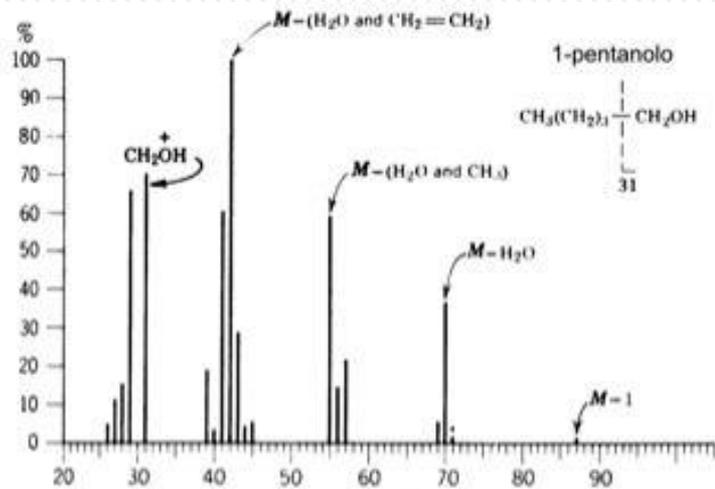
- Lo ione molecolare è sempre molto debole o assente.
- Primari: m/z 31, alcoli secondari: m/z 45, 59, 73, ecc., alcoli terziari: m/z 59, 73, 81, ecc. (rottura del legame α,β rispetto all'OH).
- Ione $M-1$, e anche ioni $M-2$ e $M-3$.
- Picco $M-18$ (cioè $M-H_2O$, perdita di acqua).
- Anche $M-H_2O$ -alchene e $M-H_2O$ -alchene-alchene



Rottura del legame α,β rispetto all'OH
in alcoli primari e secondari



Perdita di H_2O e di H_2O e alchene

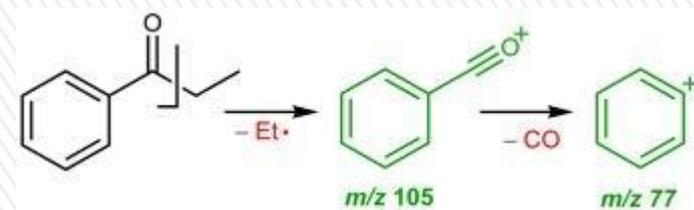
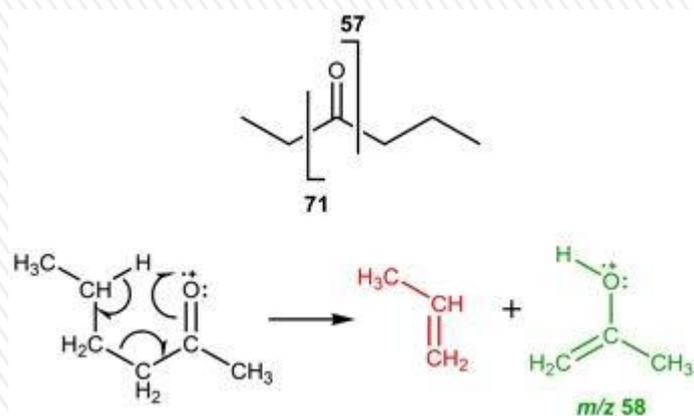


Spettri di massa di un alcol primario, secondario e terziario



Chetoni

- **Frammentazione C-CO** (rottura del legame α,β rispetto ad un ossigeno) m/z 57, 71, 85, ecc: uguali a quelli degli alcani!).
- **Riarrangiamento di McLafferty**: m/z 58 (metilchetoni), o 72 (etilchetoni), o 86, o 100, ecc..
- Chetoni aromatici: frammentazione molto favorita C-CO con perdita del radicale alchilico, e successiva perdita di CO.

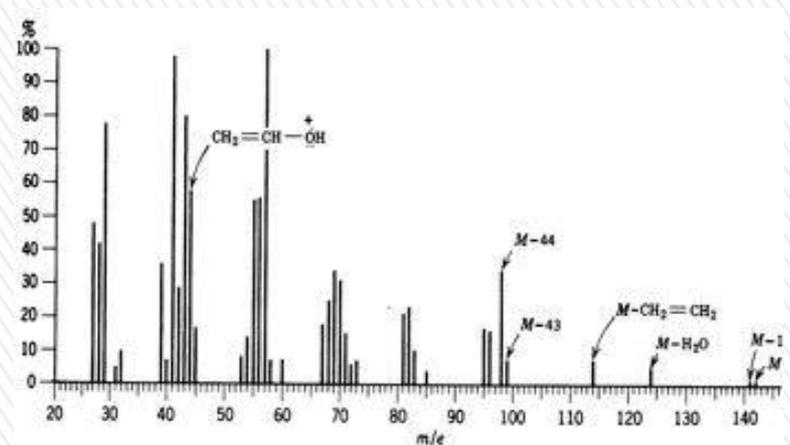
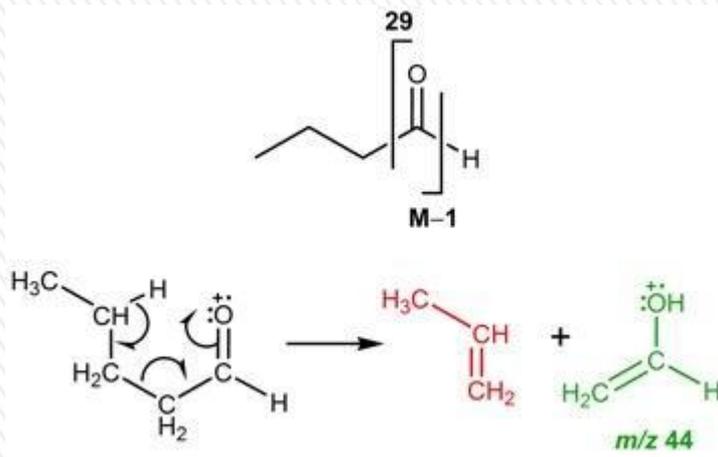


Frammentazione favorita dei
chetoni aromatici

Scissioni semplici favorite (sopra) e
riarrangiamento di McLafferty (sotto)

Aldeidi

- Picco ad $M-1$ (piuttosto caratteristico), **picco a m/z 29 (CHO^+)**.
- Altri picchi caratteristici sono **$M-18$ (perdita di acqua)**, $M-28$, $M-43$ e $M-44$.
- **Riarrangiamento di McLafferty (m/z 44, se non c'è ramificazione in α)**.

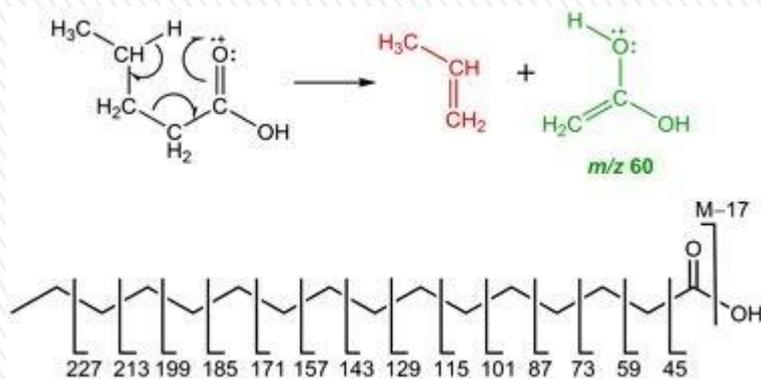


Scissioni semplici favorite (sopra) e riarrangiamento di McLafferty (sotto)

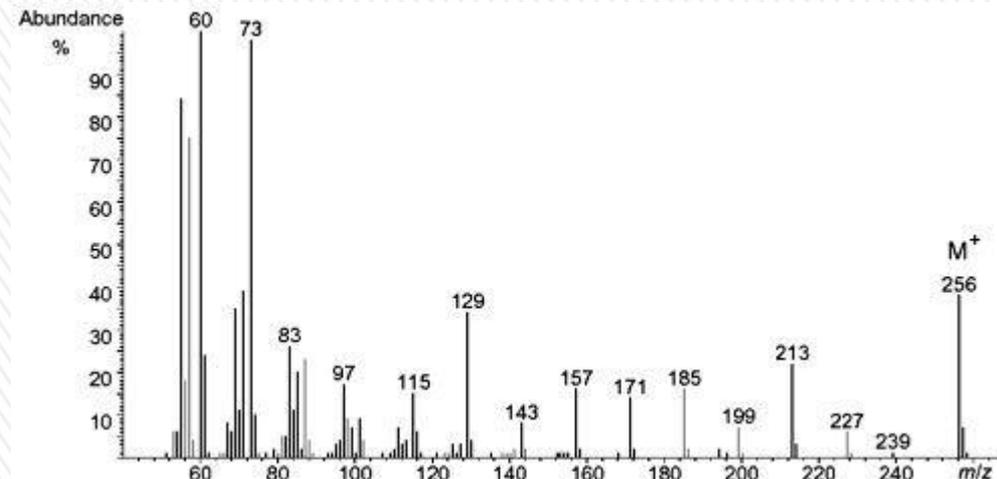
Spettro di massa del nonale

Acidi carbossilici

- Riarrangiamento di McLafferty (m/z 60 per acidi non ramificati in α , spesso il picco base).
- Rotture delle catene alchiliche con ritenzione della carica dal lato del carbossile (ioni del tipo $C_nH_{2n-1}O_2^+$, cioè a m/z 45, 59, 73, ecc.).



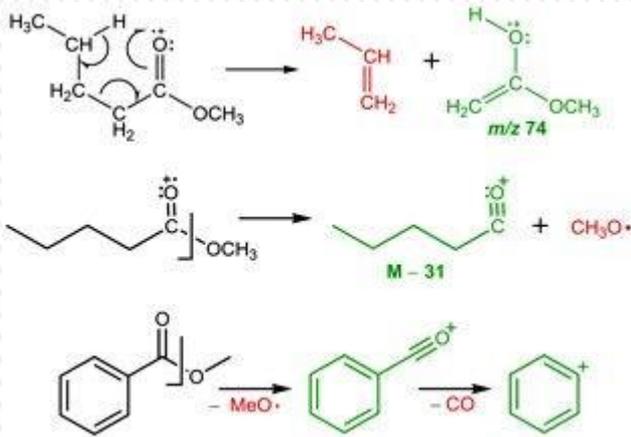
Riarrangiamento di McLafferty (sopra) e scissioni semplici degli acidi carbossilici



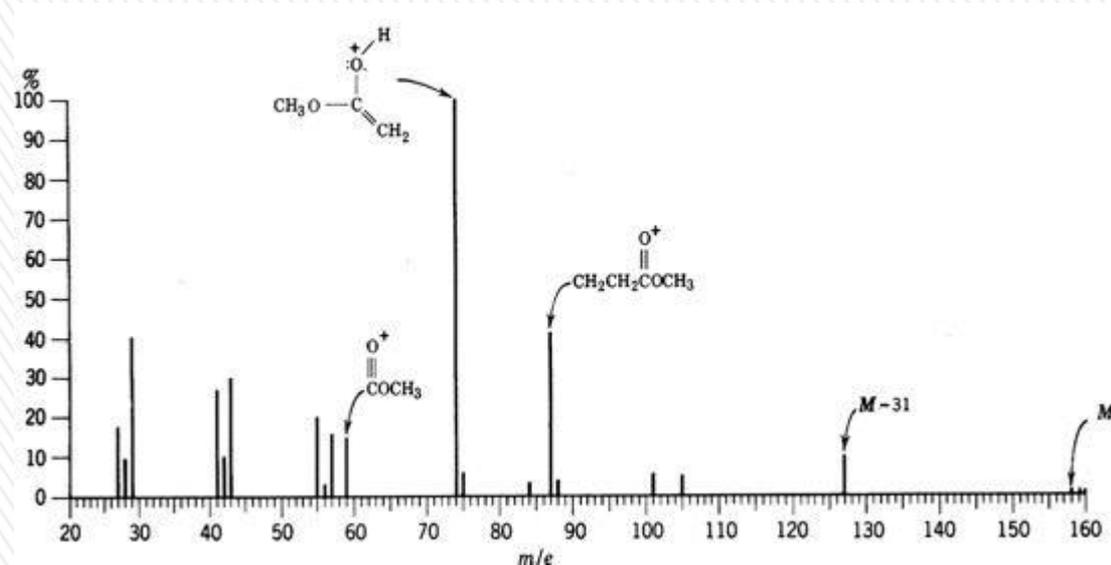
Spettro di massa dell'acido esanoico

Esteri (parte acilica dominante, p.e. esteri metilici)

- Lo ione molecolare è sempre visibile.
- **Riarrangiamento di McLafferty** (m/z 74 per esteri metilici non ramificati in α , spesso il picco base).
- Ioni del tipo $C_nH_{2n-1}O_2^+$ (come negli acidi).
- **Perdita del radicale $RO\cdot$** e formazione dello **ione acilio** ($M-31$ per esteri metilici).
- **Esteri aromatici: frammentazione $C-CO$ molto favorita**, con perdita del radicale $RO\cdot$, e successiva perdita di CO .



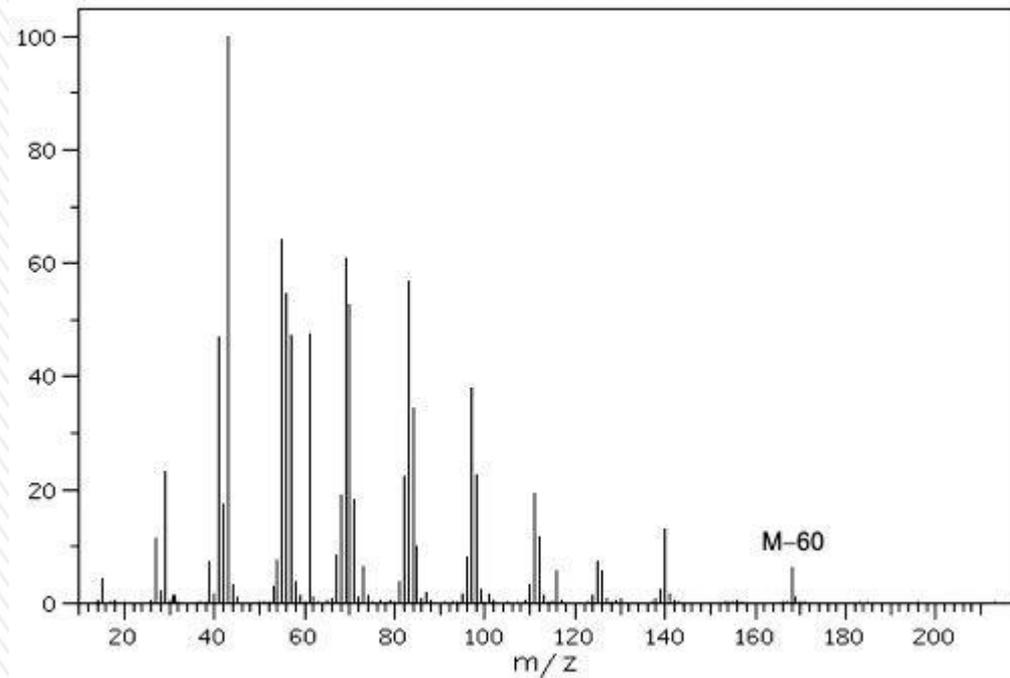
Riarr. di McLafferty (sopra),
perdita del radicale alcossido
per esteri alifatici (al centro)
e aromatici (sotto)



Spettro di massa dell'ottanoato di metile

Esteri (parte alcolica dominante, p.e. acetati)

- Ione molecolare debole o assente.
- **Frammentazione simile ai relativi alcoli:** negli acetati, perdita di acido acetico (M-60) invece che di acqua.

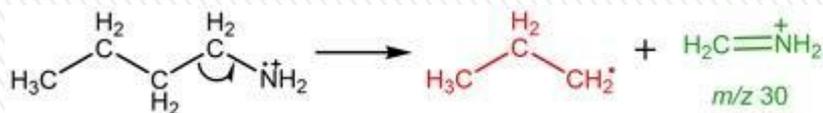


Spettro di massa dell'acetato di dodecile

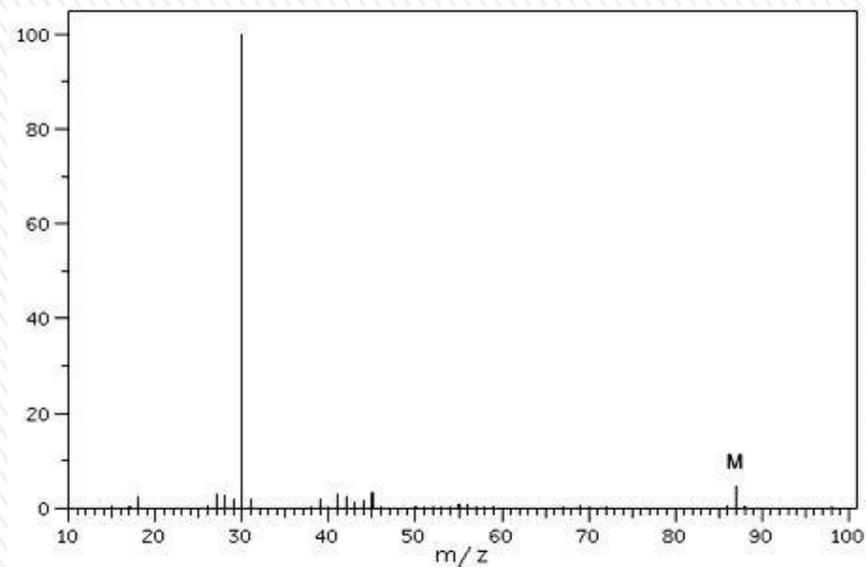


Ammine

- **Ione molecolare è a massa dispari (regola dell'azoto: molecole con massa pari contengono o nessun atomo di azoto oppure un numero pari di atomi di azoto).**
- Ione molecolare è debole, e a volte assente.
- La frammentazione ricorda quella degli alcoli.
- **Rottura del legame α, β all'N** (m/z 30, $\text{CH}_2=\text{NH}_2^+$, per ammine primarie non ramificate in α).
- In ammine secondarie o ramificate m/z 44, 58, 72, ecc.
- Oltre ai frammenti alchilici, ioni contenenti il gruppo amminico $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}\text{N}^+$ (m/z 44, 58, 72, ecc).



**Rottura del legame α, β all'N
nelle ammine primarie**

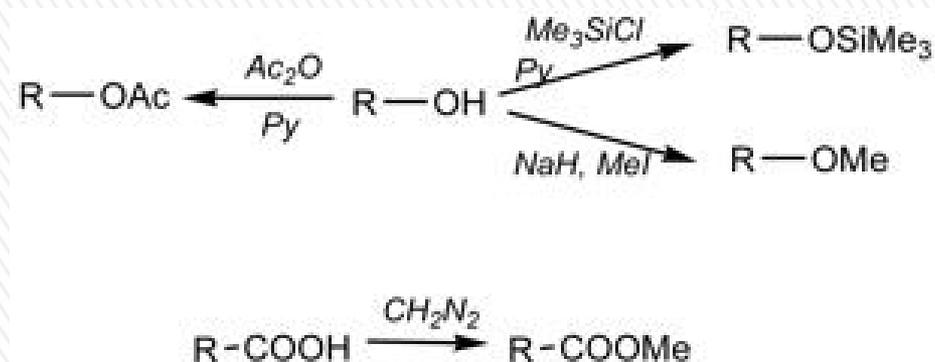


Spettro di massa dell'esilammina

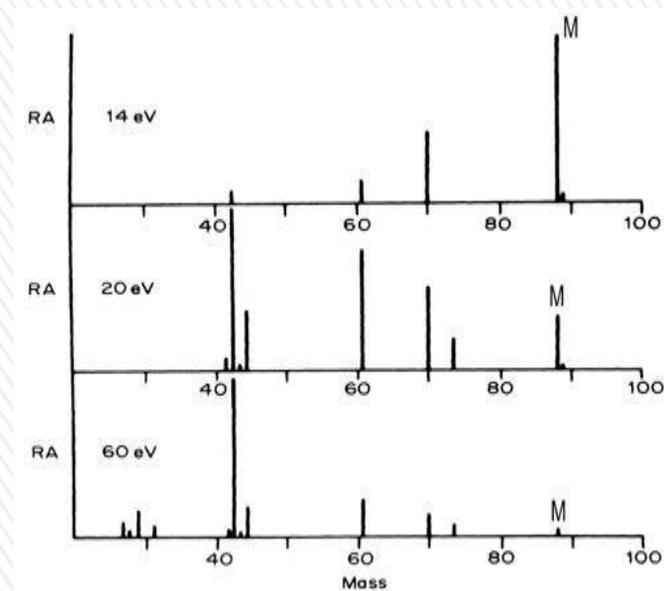
Limiti dell'EI

La sorgente EI ha due tipi di problemi:

1. Non si può usare se il **composto non** è **sufficientemente volatile**.
Possibili rimedi: derivatizzazione (zuccheri e composti poliossidrilati; acidi carbossilici).
2. Lo ione molecolare non è visibile se la **frammentazione è eccessiva**.
Possibili rimedi: energia di ionizzazione più bassa di 70 eV



La derivatizzazione di alcoli e acidi carbossilici rende i composti più volatili



Chemical Ionization (CI)

- La CI consiste generalmente nel trasferimento di un **protone** da un **gas reagente (GH)**, precedentemente ionizzato, alla molecola neutra M da analizzare per formare uno **ione molecolare protonato** $[M+H]^+$.



- La particolarità è che nello spettro vedremo lo ione molecolare con un'unità di massa in più ($M+1$)
- In un esperimento CI, gli ioni vengono prodotti attraverso la collisione dell'analita con **ioni di un gas reagente** che sono presenti nella sorgente di ioni. Alcuni gas reagenti comuni includono: **metano**, **ammoniaca**, e **isobutano**.
- All'interno della sorgente di ioni, il gas reagente è presente in grande eccesso rispetto all'analita. Gli elettroni che entrano nella sorgente ionizzeranno preferenzialmente il gas reagente. Le collisioni con altre molecole di gas reagente genereranno un **plasma di ionizzazione**. Ioni positivi e negativi dell'analita sono generati per reazione con questo plasma.

- Il gas G deve avere affinità protonica **MINORE** di quella di M altrimenti non è in grado di cedere il protone alla molecola M
- L'energia trasferita dai vari ioni secondari (metano, isobutano e ammoniaca) diminuisce nell'ordine:

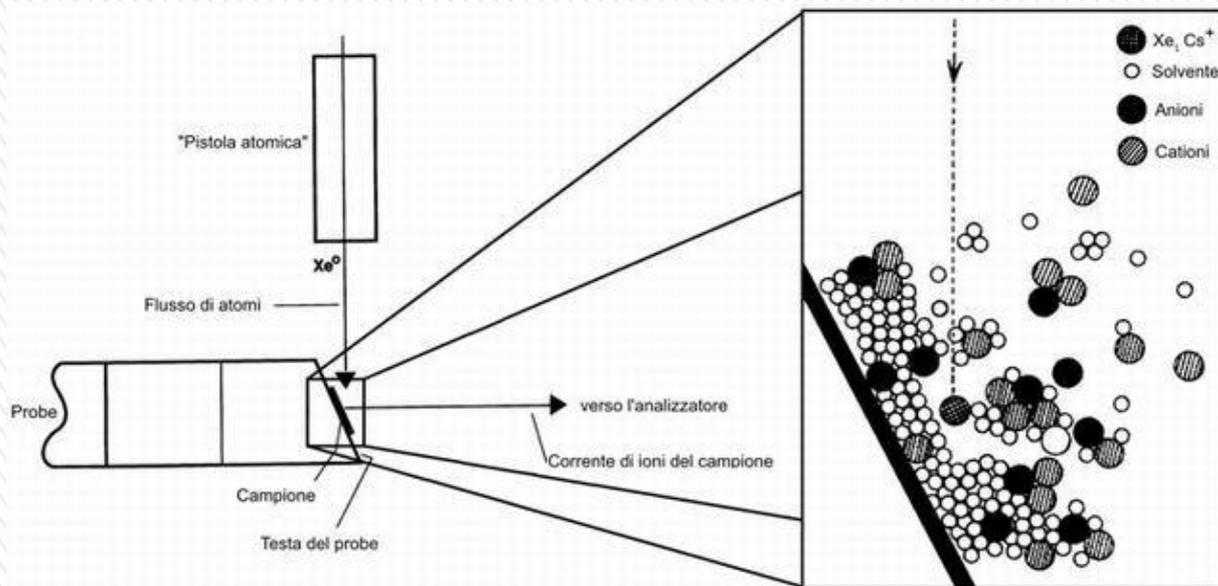


- Lo ione NH_4^+ trasferisce meno energia allo ione MH^+ che di conseguenza si frammenterà meno. Si può modulare il grado di frammentazione attraverso la scelta del gas
- CI una **ionizzazione "soft"**. Questa tecnica di ionizzazione genera uno ione molecolare MH^+ con un bassissimo eccesso di energia (< a 5 eV), e le reazioni di frammentazione sono quindi poco importanti.
- CI spesso usata in modo complementare alla EI



FAB (Fast Atom Bombardment)

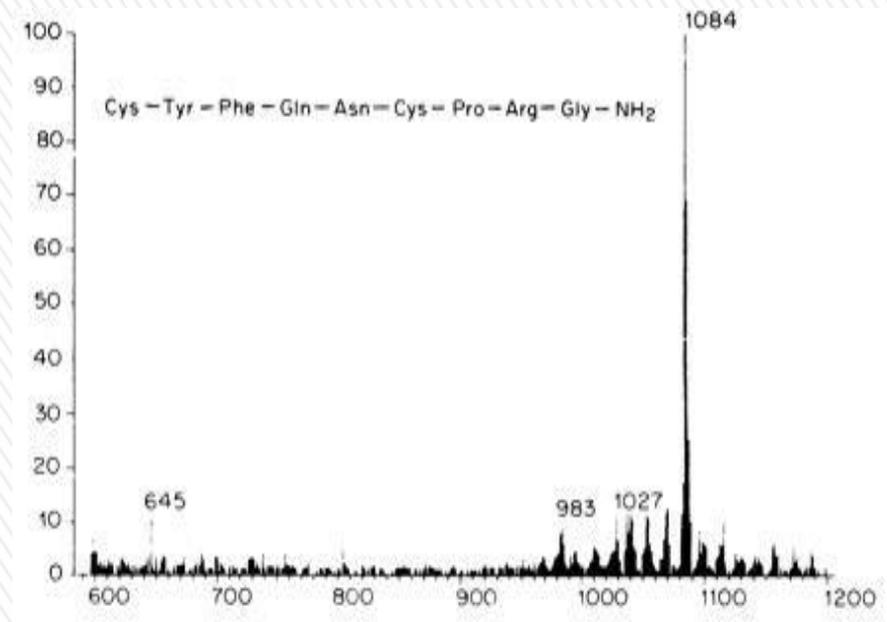
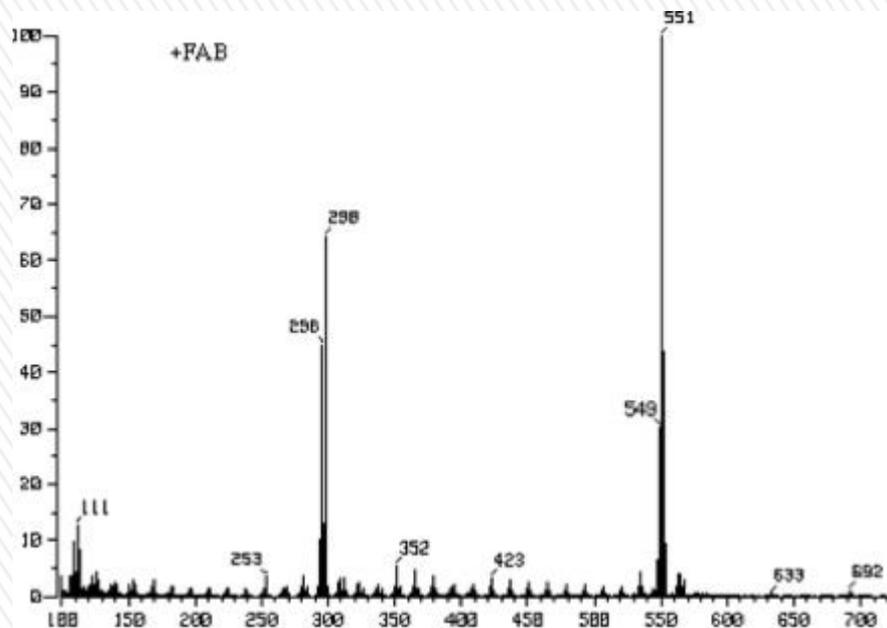
- Il **campione** è **sciolto in una matrice** (solvente protico e poco volatile: glicerolo, 1-tioglicerolo, alcol 3-nitrobenzilico, trietanolamina).
- La soluzione è investita da un **flusso di atomi di Xe** (o ioni Cs^+) ad alta energia cinetica, che provocano la volatilizzazione.
- La **ionizzazione** è dovuta a **reazioni acido-base** prima e durante questo processo.
- Si formano **ioni pseudomolecolari** $[\text{M}+\text{H}]^+$ (FAB+) e $[\text{M}-\text{H}]^-$ (FAB-).



- Il FAB è adatto a **molecole polari**, che possono subire reazioni acido-base: glicosidi, peptidi, oligonucleotidi, alcaloidi. Oggi è spesso sostituito dalla sorgente electrospray.
- Lo spettro FAB forma ioni stabili: **lo ione molecolare è sempre visibile** ed intenso, ma sono spesso visibili **anche picchi di frammentazione** (soprattutto per molecola grandi) che possono dare utili informazioni strutturali.
- Oltre allo ione pseudomolecolare $[M+H]^+$, nel FAB+ sono spesso visibili ioni del tipo $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$, dovute all'addizione alla molecola di uno ione Na^+ o K^+ invece che di un protone.
- Un problema del FAB è l'elevato rumore di fondo: **anche la matrice (S) ionizza** e dà luogo ad un **intenso picco $[S+H]^+$** , e anche picchi del tipo $[2S+H]^+$, $[3S+H]^+$, $[4S+H]^+$, $[5S+H]^+$ (m/z 93, 185, 277, 369, 461, ecc per la glicerina).
- Si possono incontrare **problemi con sostanze con peso molecolare al di sotto di 400**, poiché al di sotto di questo valore il rumore di fondo è molto elevato.
- Il limite superiore dipende essenzialmente dalla capacità dell'analizzatore, ma anche con analizzatori adatti si nota comunque una perdita di sensibilità nella ionizzazione di molecole con massa elevata.

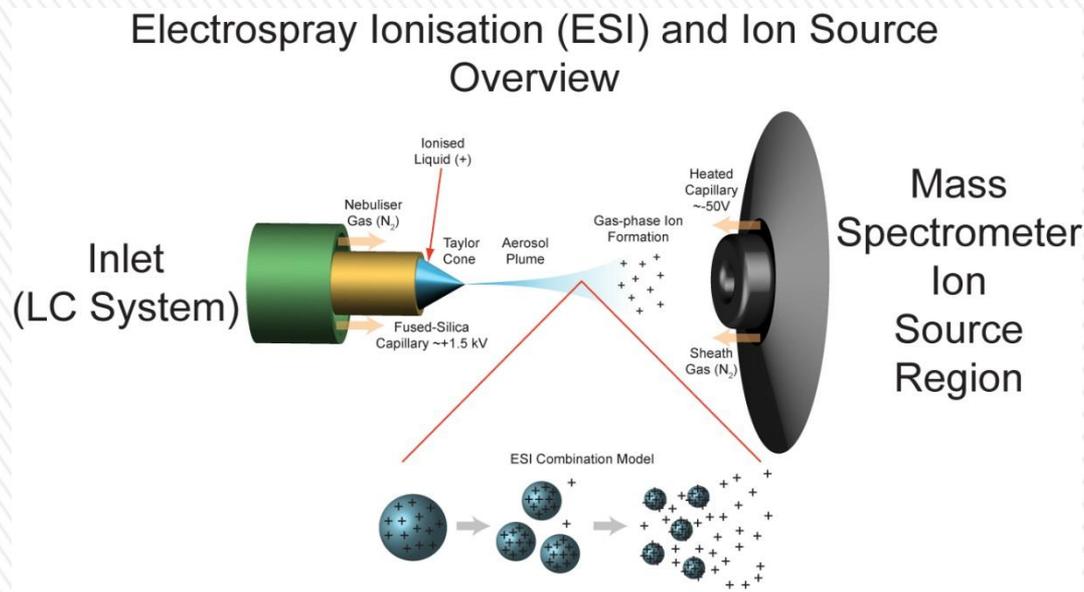
Esempi di spettri FAB

- E' possibile ottenere lo spettro di massa di un peptide, che è assolutamente non volatile e quindi non analizzabile con la sorgente EI.
- Lo ione molecolare è sempre ben evidente, ma ci sono anche dei picchi di frammentazione.

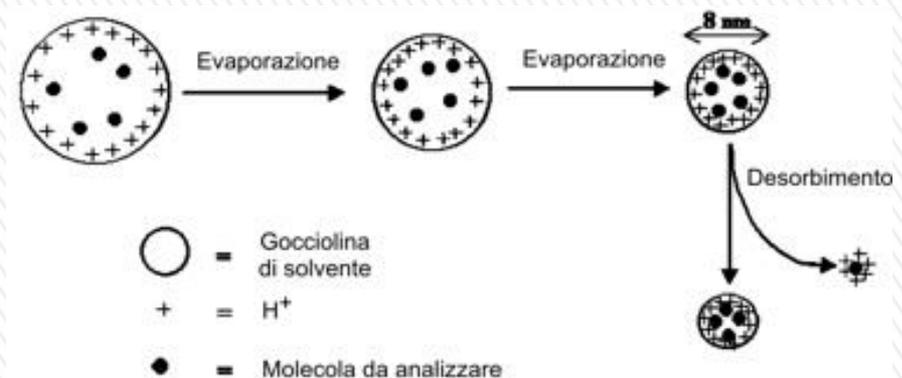
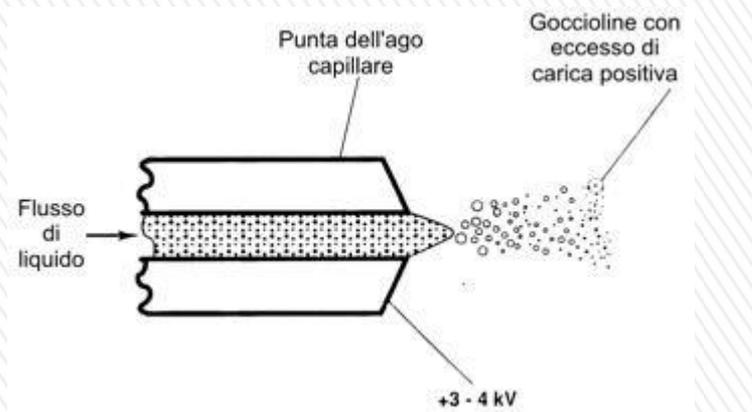


Electron Spray Ionization (ESI)

- Tecnica di **ionizzazione soft**, poco energetica, particolarmente adatta a **proteine** ed in generale **biomolecole**
- **No frammentazione**
- Interfacciabile con HPLC
- Il campione è sciolto in un **solvente volatile protico** (miscele di acqua e MeOH, di acqua e acetonitrile, MeOH), con eventuale aggiunta di acidi organici (formico, trifluoroacetico) e/o tamponi.



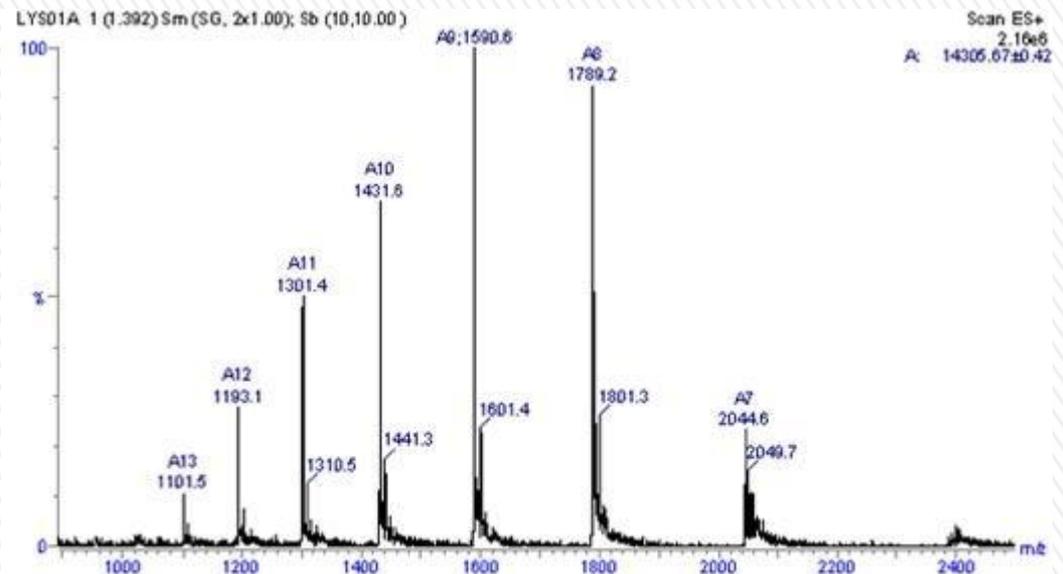
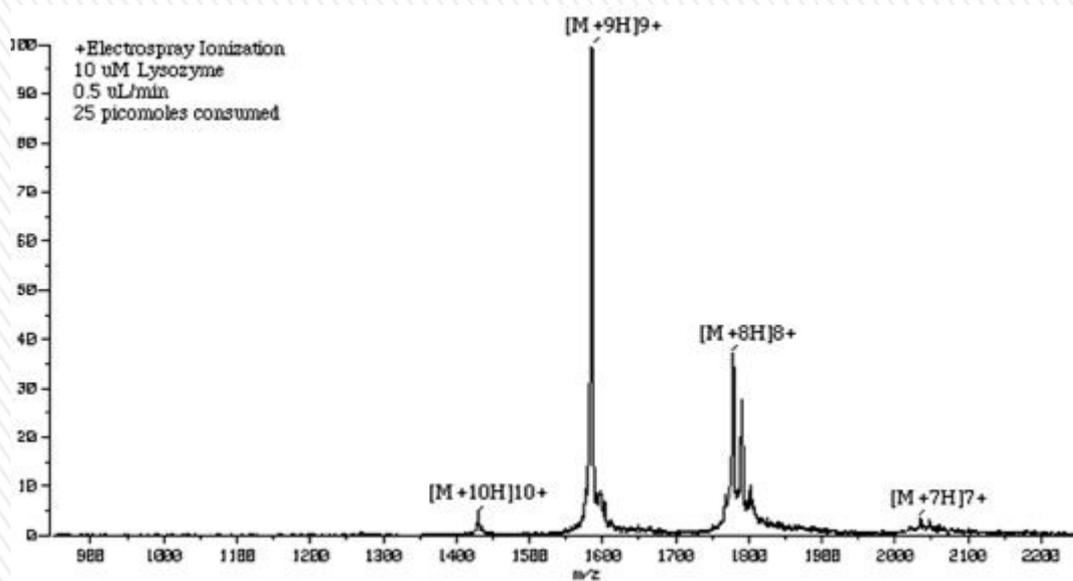
- La soluzione passa per un **ago capillare con un forte potenziale positivo (3-4 kV)**, e forma uno spray di goccioline con eccesso di carica positiva.
- La **carica positiva** delle goccioline è data da un **eccesso di ioni H^+** .
- All'interno delle goccioline, le molecole vengono protonate, e nel frattempo il solvente evapora e la densità di carica della gocciolina aumenta. Gli ioni vengono espulsi dalla superficie della gocciolina per repulsione elettrostatica.
- Se l'ago ha potenziale negativo si formano, in maniera analoga, ioni negativi.
- Questo processo avviene a pressione atmosferica, quindi all'esterno della zona ad alto vuoto dello spettrometro.
- Gli ioni che si formano entrano nello spettrometro attraverso una serie di fenditure fino ad arrivare nella zona a bassa pressione dello spettrometro di massa, dove sono accelerate ed inviate all'analizzatore.



Ioni multicarica

- Se la molecola ha **molte siti protonabili**, la sorgente electrospray genera **ioni a carica multipla**. Nel caso di peptidi grandi e proteine, si possono ottenere ioni con decine di cariche.
- Questo è importante perché **abbassa il rapporto m/z** degli ioni, permettendo di analizzare ioni anche molto pesanti con analizzatori standard.
- **A parità di peso molecolare, ioni a carica multipla hanno un rapporto m/z minore**
- Quando si formano ioni a carica multipla, non tutti gli ioni generati hanno lo stesso numero di cariche.
- Se il composto ha massa molto grande si formano molti tipi di ioni e lo spettro può presentare molti picchi.

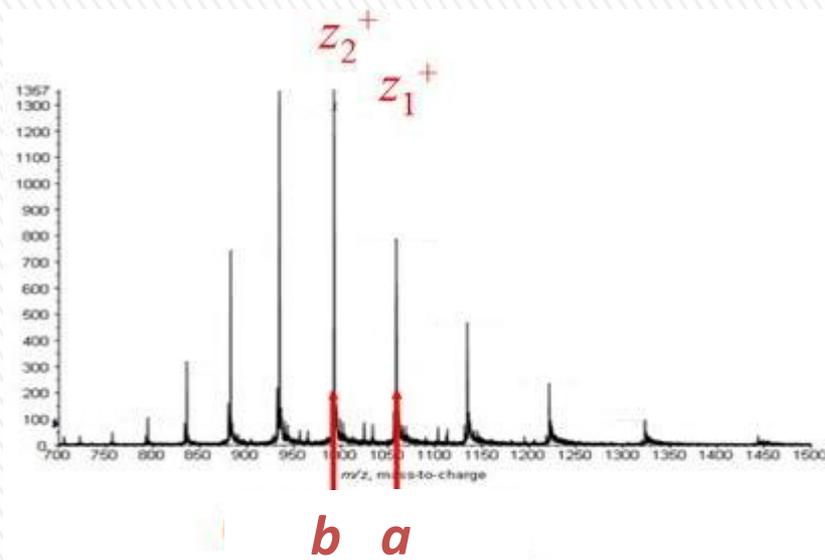
- Il numero e tipo di picchi dipende anche dallo spettrometro e dal solvente usati.



Spettri di massa del liozima acquisiti in condizioni diverse

Determinazione della massa molecolare

- Quando gli ioni prodotti dalla sorgente ESI hanno più di una carica, bisogna conoscere il numero di cariche z per calcolare la massa m dal rapporto m/z misurato.
- È ovvio che la carica di due picchi vicini differisce di una unità: quindi, per due picchi contigui, m è lo stesso, mentre z differisce di 1.
- Si hanno due equazioni e due incognite (m e z_1), si può quindi calcolare m .



$$(m+z_1)/z_1 = a$$

$$(m+z_2)/z_2 = b = (m+z_1+1)/(z_1+1)$$

Risolvendo questo sistema si calcola m

Due picchi contigui hanno carica differente di 1, e quindi $z_2 = z_1 + 1$



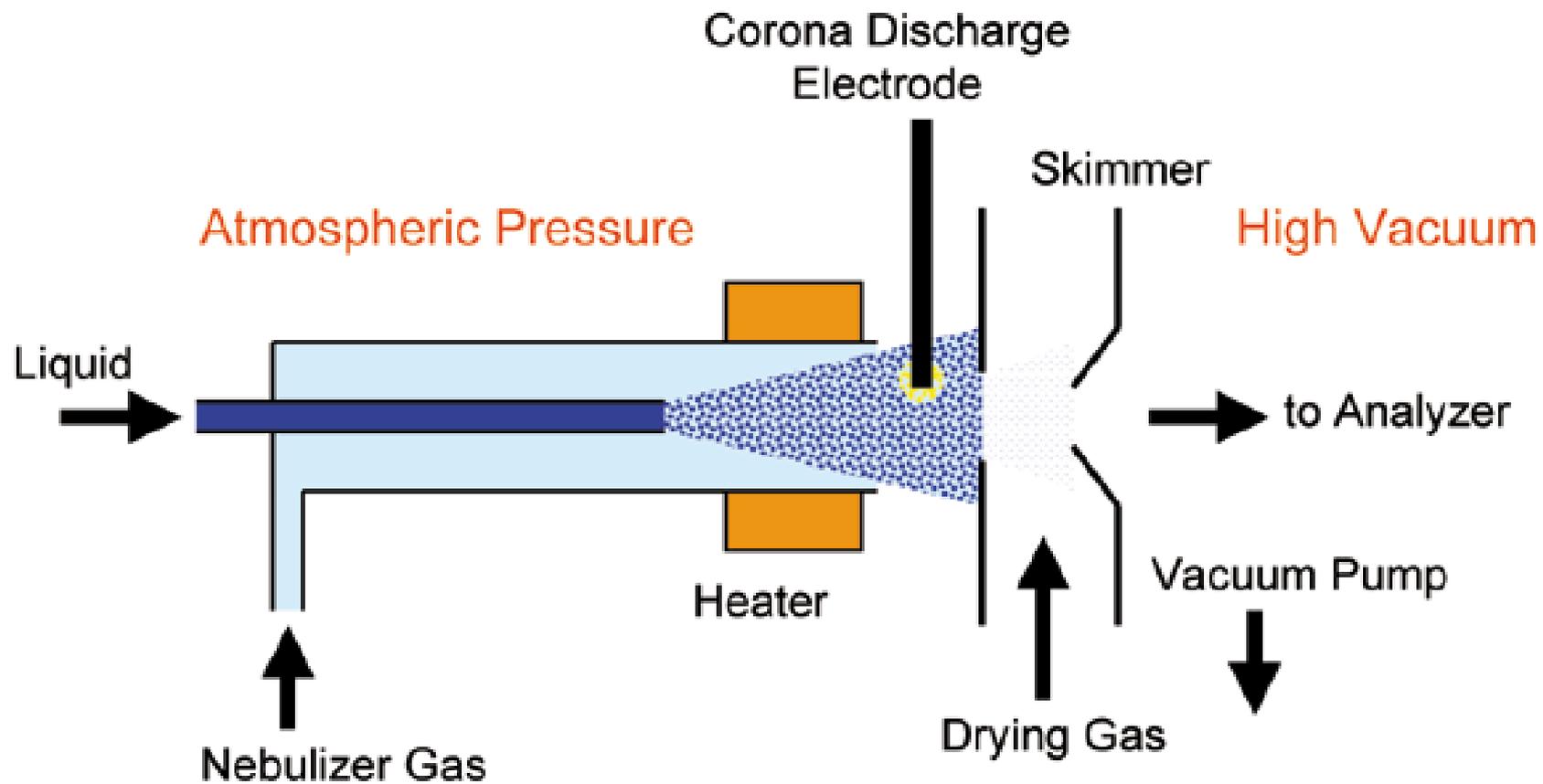
Caratteristiche generali dell'ESI

- E' una sorgente **adatta alla maggior parte dei composti**, dalle piccole molecole organiche (anche non volatili) fino a macromolecole come proteine (purché esse abbiano disponibili molti siti ionizzabili). Solo composti estremamente apolari come gli idrocarburi non sono analizzabili.
- La sensibilità non diminuisce sostanzialmente all'aumentare della massa della sostanza analizzata.
- L'electrospray generalmente produce **solo ioni pseudomolecolari**; in qualche caso è possibile osservare anche ioni frammento, ed in alcuni spettrometri è anche possibile favorire la frammentazione in sorgente agendo sulle condizioni sperimentali.
- La presenza di **metalli alcalini** non è particolarmente fastidiosa per l'analisi di piccole molecole organiche: si formano ioni $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$. È invece molto dannosa per ioni poliprotonati: infatti se uno o più Na^+ sostituiscono gli H^+ , si formano ioni aggiuntivi che complicano lo spettro e riducono la sensibilità.

Atmospheric Pressure

Chemical Ionization (APCI)

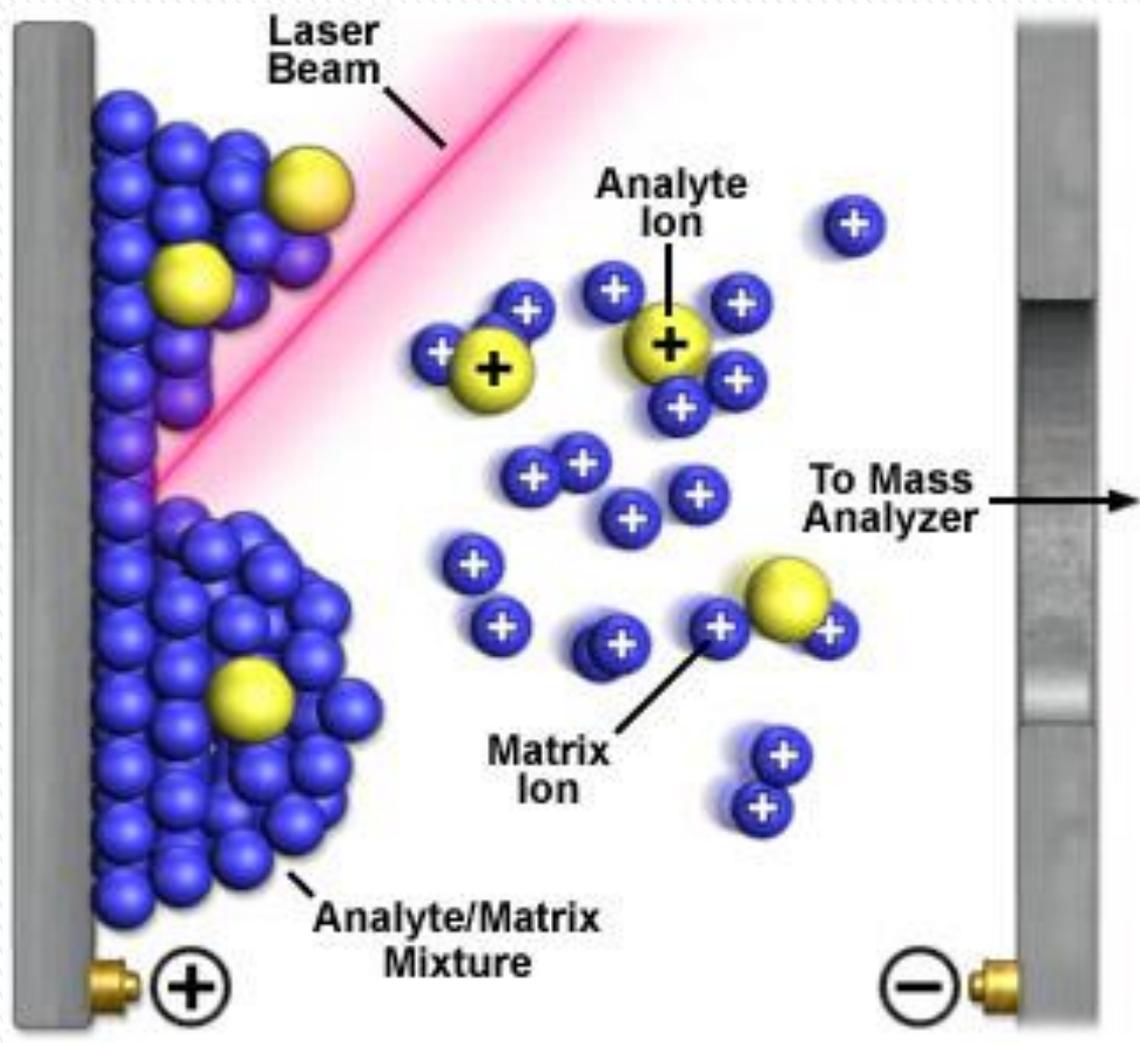
- L'impiego di questo tipo di ionizzazione consente l'**accoppiamento con l'eluizione del campione in HPLC**.
- Tipicamente la fase mobile contenente l'analita eluito viene riscaldata a temperature relativamente elevate (superiori a 400°C), spruzzato con un flusso molto forte d'azoto e la nube di aerosol così ottenuta viene sottoposta a scarica a effetto corona che genera gli ioni.
- La **ionizzazione** avviene **in fase gas**, a differenza dell'ESI, nel cui caso la ionizzazione avviene in fase liquida. E' così possibile usare un solvente non polare come fase mobile, invece di un solvente polare, poiché il solvente e le molecole di interesse vengono convertiti in stato gassoso prima di raggiungere l'elettrodo a corona. Tipicamente, l'APCI è una tecnica meno "soft" dell'ESI, poiché genera più ioni frammento rispetto agli ioni genitore.



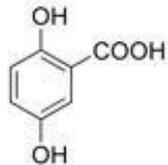
Matrix-Assisted Laser

Desorption Ionization (MALDI)

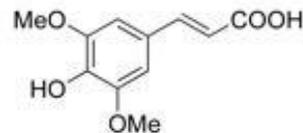
- La ionizzazione della molecola da analizzare è indotta da un brevissimo (ns) ma intenso **impulso di luce laser ultravioletta**.
- Per essere efficace, la radiazione ultravioletta deve essere assorbita, per cui il **campione** è **cocristallizzato** con una **matrice solida** che assorbe alla lunghezza d'onda (337 nm) prodotta da un laser ad azoto.
- L'impulso è concentrato su una superficie di pochi μm^2 , e con un microscopio si può scegliere il punto esatto del cristallo su cui mandare l'impulso laser.
- L'energia dell'impulso laser è in grado di indurre sia la volatilizzazione che la ionizzazione dell'analita. Si formano **ioni pseudomolecolari a singola carica positivi e negativi**.
- Il MALDI è una **tecnica di ionizzazione "soft"** e ionizza bene sia piccole molecole che macromolecole **senza** provocare **frammentazione**.



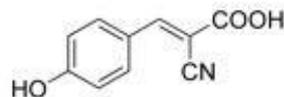
- Le matrici più usate sono il DHB, l'acido sinapinico e l'HCCA.
- Il campione è preparato sciogliendo l'analita e la matrice in un solvente organico volatile.
- Una goccia (1 μL o meno) della soluzione è posta su uno dei pozzetti del target (una piastra di acciaio) e lasciata evaporare.
- La matrice cristallizza formando una soluzione solida con l'analita.
- La sorgente MALDI è una **sorgente ad impulsi**, cioè non genera un flusso continuo di ioni, ma una grande quantità di ioni tutti in una volta.
- Una sorgente del genere non può essere usata con analizzatori come quello magnetico (vedi prossima sezione), che funzionano da filtri, perché questo richiedono un flusso continuo di ioni.



acido 2,5-diidrossibenzoico
DHB o
acido gentisico



acido 3,5-dimetossi-4-idrossicinnamico
acido sinapinico



acido α -ciano-4-idrossicinnamico
HCCA

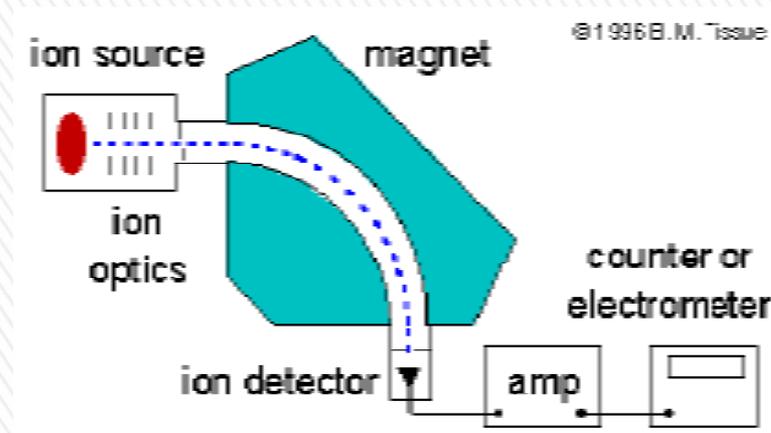


Gli analizzatori



Analizzatore a campo magnetico/elettrico

- Porta gli ioni a percorrere **traiettorie circolari**, il cui **raggio dipende dal rapporto m/z dello ione**.
- Cambiando le traiettorie degli ioni mediante variazioni del campo magnetico applicato, ioni con diverso rapporto m/z possono essere focalizzati sul rivelatore.



- E' costituito da un tubo lungo circa 1 metro, piegato con un raggio di curvatura r' ed immerso in un campo magnetico di intensità B .
- Quando gli ioni che escono dalla camera di ionizzazione entrano nel tubo analizzatore, per effetto del campo magnetico B subiscono una deviazione (**deflessione**) dalla loro traiettoria rettilinea che viene curvata.
- All'uscita della camera di ionizzazione il fascio di ioni è accelerato attraverso un potenziale V di 6000 - 8000 Volt.
- Gli ioni vengono espulsi, attraverso una fenditura di uscita, con circa la stessa energia cinetica pari a:

$$E_c = 1/2mv^2 = zV$$



- Quando gli ioni positivi entrano tra le sue espansioni polari vengono sottoposti ad una **forza centripeta Bzv** che fa loro percorrere un raggio r ; la forza centripeta è bilanciata dalla **forza centrifuga mv^2/r** , per cui

$$mv^2/r = Bzv$$

quindi

$$v^2 = 2zV/m = B^2z^2r^2/m^2$$

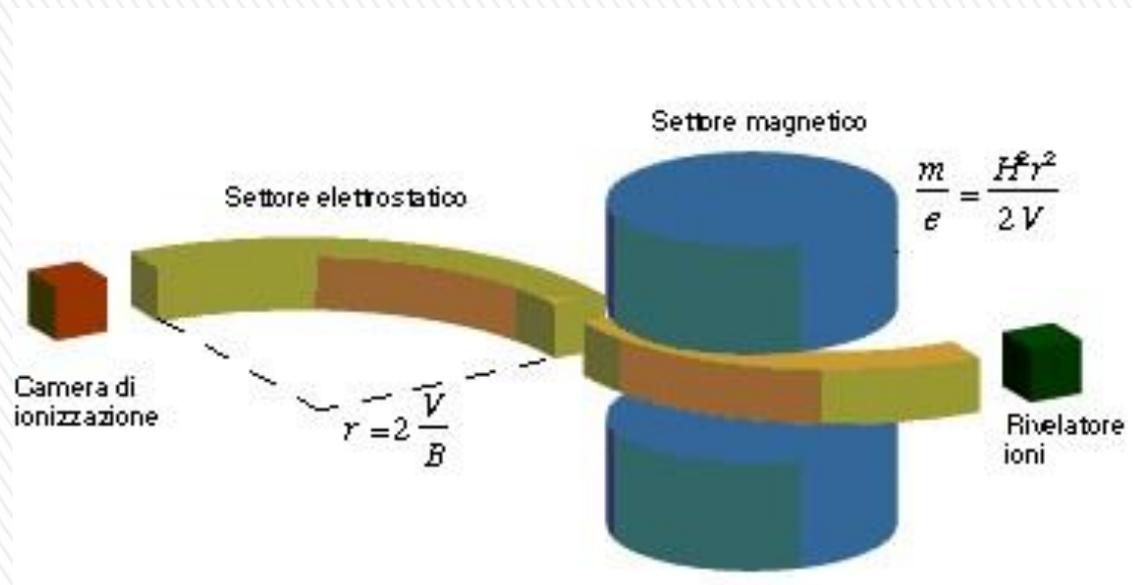
da cui

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

- Per ogni valore di B^2/V verranno portati al rivelatore solo gli ioni che possiedono il rapporto m/z che soddisfa tale equazione. Aumentando l'intensità di B (facendone una scansione) verranno portati all'analizzatore ioni di massa via via crescente. 

Analizzatore a doppia focalizzazione

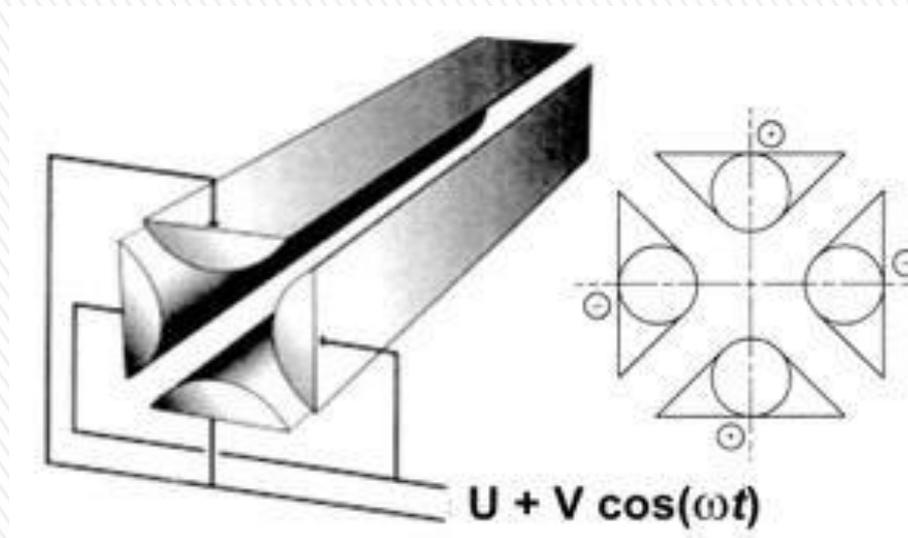
- E' un analizzatore che consente di ottenere risoluzioni elevatissime (massa esatta ed alta risoluzione).
- Aggiungendo prima dell'**analizzatore magnetico** un **analizzatore elettrostatico** (ESA) il percorso degli ioni positivi viene focalizzato ulteriormente in direzione dal campo elettrico statico.



- Nel settore elettrostatico (ES) gli ioni **non** vengono separati in funzione del rapporto massa/carica, ma solo focalizzati in base alla loro **Energia Traslazionale**.
- Gli ioni generati nella camera di ionizzazione possono essere dotati di energia cinetica iniziale diversa da 0. L'energia cinetica totale di uno ione dopo accelerazione nel campo V sarà quindi la somma di due componenti: **energia cinetica iniziale** ed **energia cinetica guadagnata durante l'accelerazione**.
- Il settore elettrostatico si limita ad uniformare le energie traslazionali degli ioni che hanno uguale m/z , compensando differenze di velocità iniziale; se così non fosse, nel settore successivo, quello magnetico, ioni con **ugual rapporto m/z ma differente energia traslazionale** seguirebbero traiettorie diverse, diminuendo la risoluzione dello strumento.

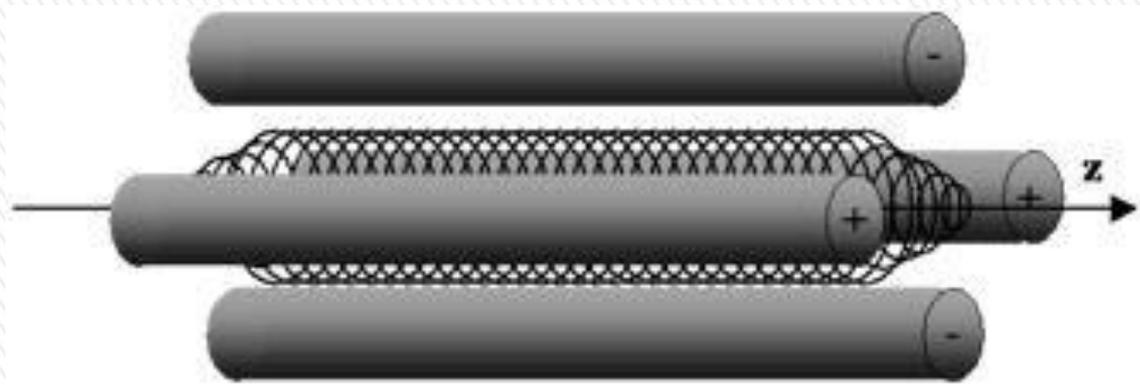


Filtro di massa a quadrupolo



- L'analizzatore a quadrupolo consiste in un **tubo rettilineo** in cui è fatto il vuoto ed in cui sono presenti **quattro barre parallele** di sezione circolare oppure iperbolica.
- Le barre opposte sono in contatto elettrico tra di loro, mentre tra barre adiacenti c'è un voltaggio formato da una **componente continua** (che possiamo chiamare U) e una **oscillante** ad alta frequenza ($V \cos(\omega t)$).

- I campi elettrici continuo ed oscillante spingono gli ioni a seguire una **traiettoria a spirale**, fino ad uscire dall'altro lato dell'analizzatore.
- Tuttavia **regolando U e V** si può fare sì che la **traiettoria sia stabile solo per ioni i cui rapporti m/z sono compresi in un piccolo intervallo**, mentre tutti gli altri ioni sbattono sulle pareti del tubo.



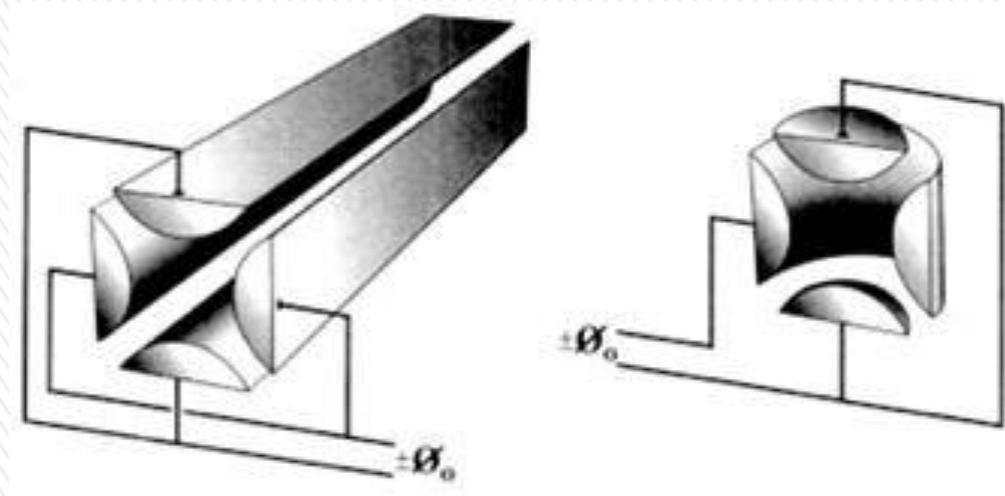
Gli ioni percorrono una traiettoria a spirale nell'analizzatore a quadrupolo



Caratteristiche dell'analizzatore a quadrupolo

- L'analizzatore a quadrupolo funziona da filtro come l'analizzatore magnetico.
- Può essere accoppiato a sorgenti EI, FAB ed electrospray, ma non MALDI.
- È meno costoso, meno ingombrante, consuma meno elettricità e necessita di minore regolazioni dell'analizzatore magnetico.
- Ha un limite superiore per il rapporto m/z piuttosto basso (spesso solo 1000-1500, raramente più di 2000-2500).
- Non riesce a raggiungere una risoluzione sufficiente ad effettuare misure di massa esatta.
- Per questo, è usato molto spesso negli spettrometri di massa più economici quando non servono misure di massa esatta.

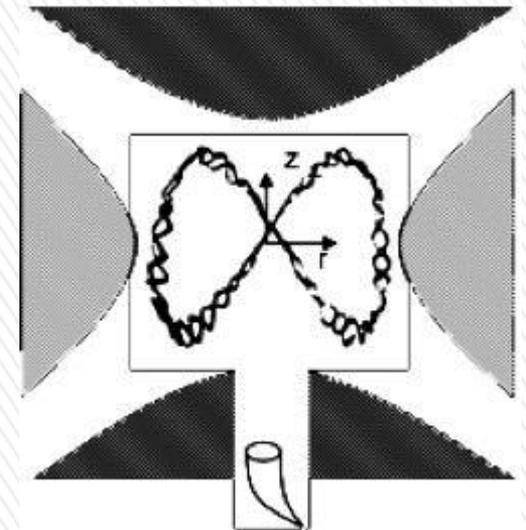
Quadrupole Ion Trap (Q-Trap)



- La trappola ionica (Ion Trap) può essere considerata come un **analizzatore a quadrupolo curvato su se stesso in modo da formare un'anello** (o una ciambella).
- L'elettrodo centrale (il "buco della ciambella") è eliminato, ed il voltaggio continuo ed alternato sono applicati tra l'elettrodo esterno (che è un anello) e gli elettrodi inferiore e superiore, che sono due superfici convesse.

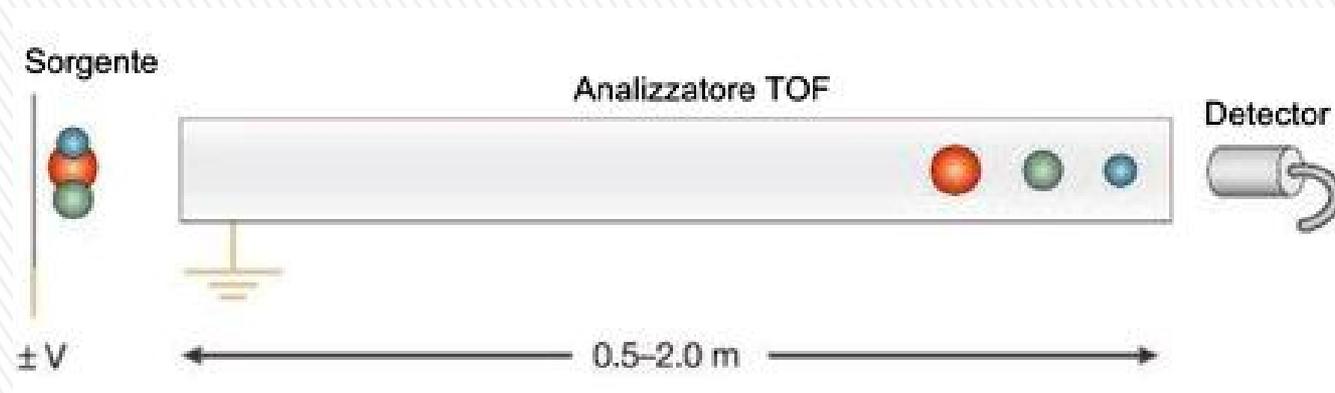
- Utilizzando come nel quadrupolo dei voltaggi costanti U ed oscillanti $V \cos(\omega t)$, è possibile intrappolare per un tempo lungo a piacere gli ioni che provengono dalla sorgente.
- Una piccola quantità di elio all'interno della trappola aiuta questo processo, diminuendo l'energia cinetica degli ioni e facendoli rimanere nei pressi del centro della trappola e lontani dalle pareti.
- Oltre che per "conservare" gli ioni, la ion-trap può essere utilizzata come analizzatore: aumentando progressivamente la radiofrequenza V , le traiettorie di ioni a rapporti m/z via via crescenti diventano instabili e escono dalla trappola.
- Come analizzatore la ion-trap offre prestazioni pari a quelle di un quadrupolo, e non è molto più costoso, ma è meno adatto ad applicazioni quantitative.

Aumentando V la traiettoria di alcuni ioni diventa instabile



Time of Flight (TOF)

- La sorgente MALDI è una sorgente ad impulsi: non genera un flusso continuo di ioni, ma una grande quantità di ioni in pochissimo tempo.
- Questa sorgente necessita di un particolare analizzatore, l'analizzatore a tempo di volo.
- Questo analizzatore misura il rapporto m/z degli ioni sulla base del tempo che essi impiegano ad arrivare al detector

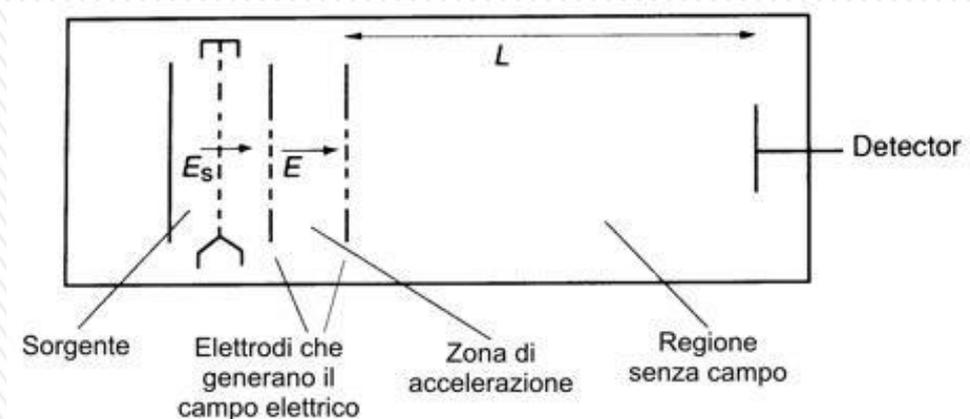


Analizzatore a tempo di volo (TOF). Gli ioni più leggeri arrivano al detector prima degli ioni più pesanti



- L'analizzatore TOF è un **tubo rettilineo di 50-100 cm**. Ad un'estremità del tubo c'è un **campo elettrico**, che accelera gli ioni provenienti dalla sorgente.
- Gli ioni attraversano poi una regione rettilinea senza campo.
- Gli ioni sono sottoposti tutti allo stesso campo elettrico, e assumono la stessa energia cinetica.
- Essendo $E_c = 1/2mv^2$, a parità di energia cinetica **gli ioni con rapporto m/z maggiore (più pesanti) hanno velocità minore rispetto agli ioni con rapporto m/z minore (più leggeri)**, e quindi impiegano più tempo ad arrivare al detector.
- Per questo il tempo di volo dei vari ioni misura il loro rapporto m/z .
- Il TOF può funzionare solo se è noto il momento di partenza degli ioni, cioè se la sorgente è ad impulsi.

Principio di funzionamento dell'analizzatore TOF



Vantaggi e svantaggi dell'analizzatore TOF

- Non ha praticamente **nessun limite superiore per la massa analizzabile**, basta aspettare tempo a sufficienza e anche gli ioni più pesanti giungono al detector.
- È un analizzatore **molto sensibile**, poiché tutti gli ioni generati dalla sorgente arrivano al detector (al contrario degli analizzatori che funzionano come filtro).
- Con opportuni accorgimenti, può raggiungere risoluzione sufficiente per misure di **massa esatta**.
- Il principale svantaggio è che **richiede una sorgente ad impulsi** (tipicamente MALDI, ma anche l'electrospray può essere reso ad impulsi).



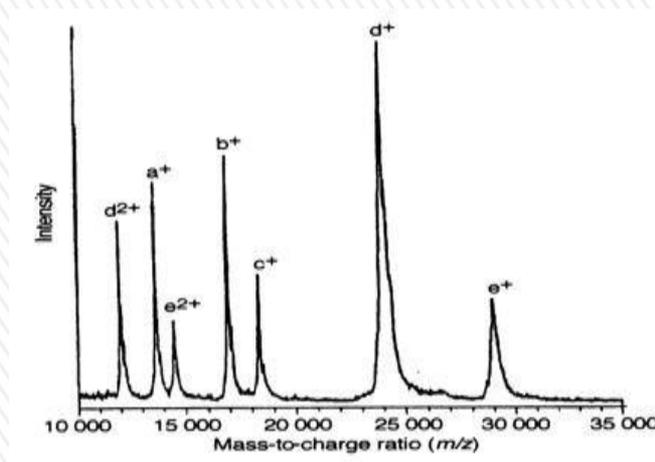
La risoluzione del TOF...

I primi analizzatori TOF avevano risoluzione bassa.

Il motivo è essenzialmente l'energia cinetica con cui gli ioni sono desorbiti dalla matrice dopo l'impulso del laser, e che si somma a quella fornita dal campo elettrico.

Ioni con la stessa massa ma con energia cinetica iniziale diversa arrivano al detector in momenti leggermente diversi.

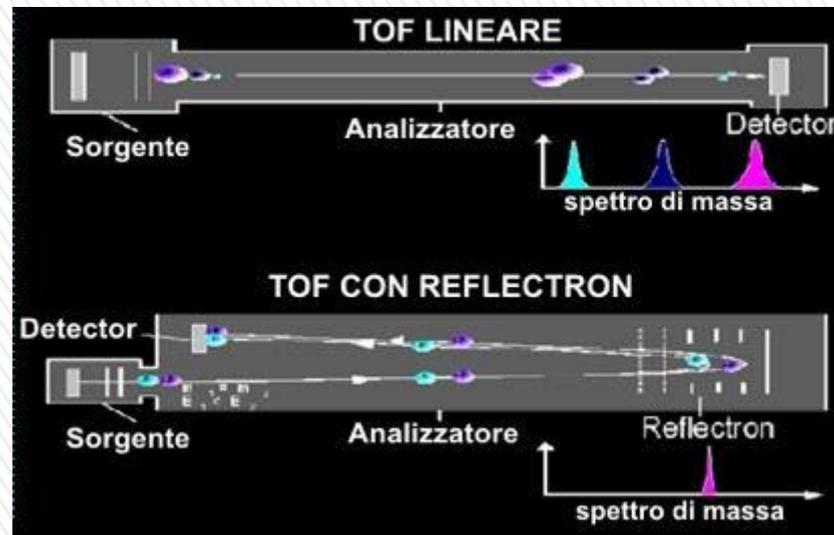
Questo allarga i picchi e diminuisce la risoluzione.



... reflectron e delayed extraction

La risoluzione degli attuali analizzatori TOF è invece molto buona grazie a due accorgimenti:

1. 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.



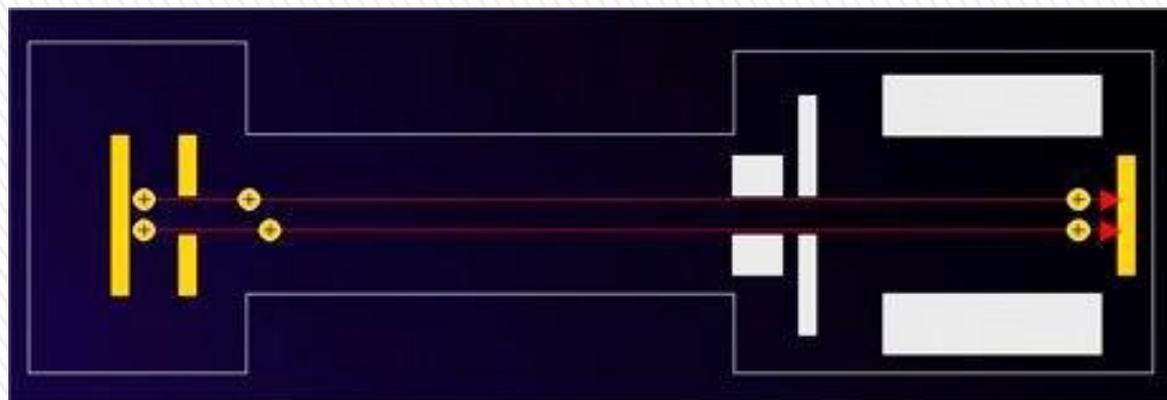
Il TOF con reflectron ha migliore risoluzione del TOF lineare (senza reflectron)



2. L'altro accorgimento è la **delayed extraction** (estrazione ritardata).

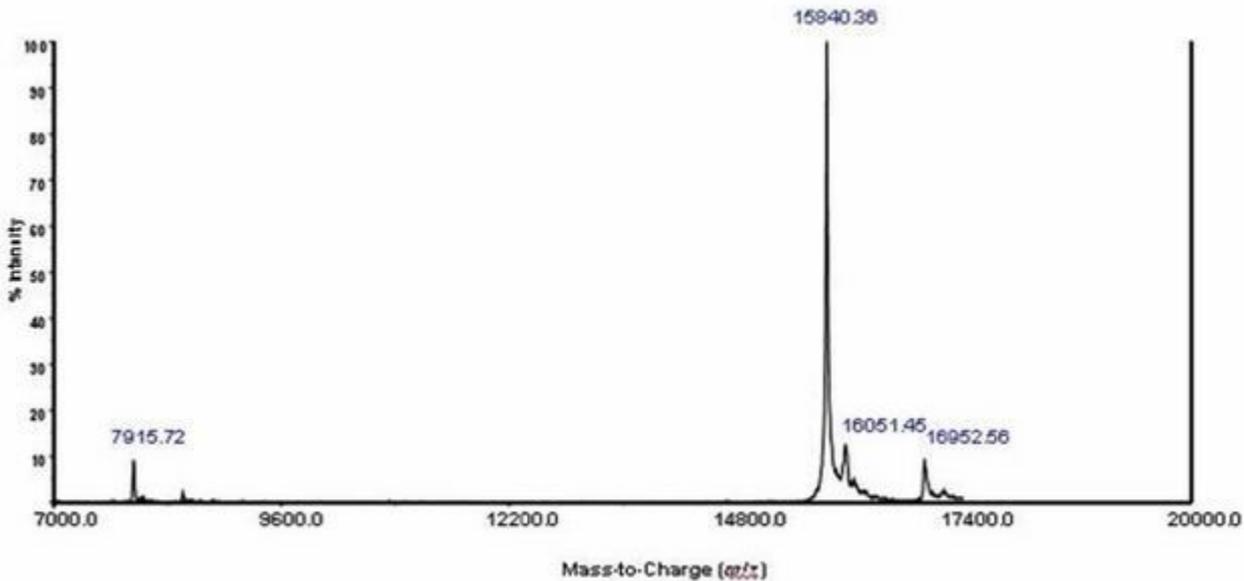
Il campo elettrico che accelera gli ioni non è acceso esattamente al momento dell'impulso laser, ma alcuni microsecondi più tardi.

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.



La **delayed extraction** compensa la diversa velocità iniziale degli ioni





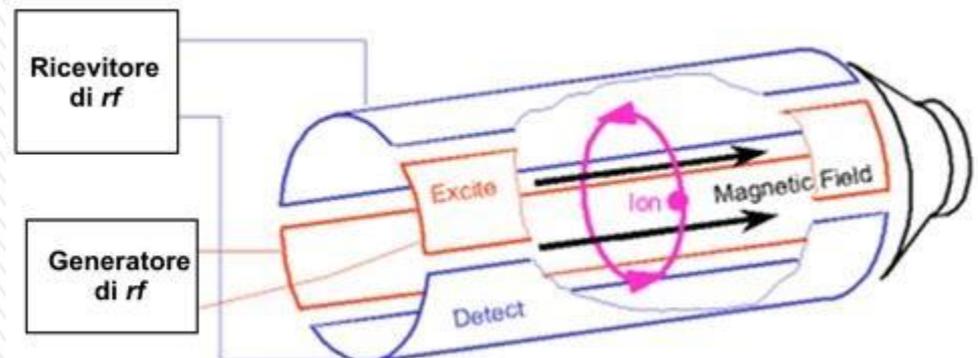
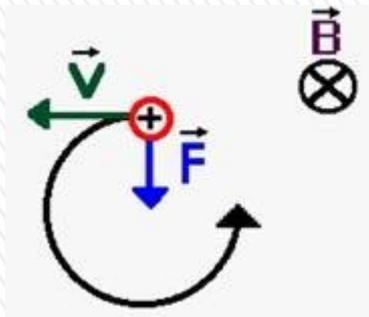
In questo recente spettro MALDI-TOF la risoluzione è molto maggiore



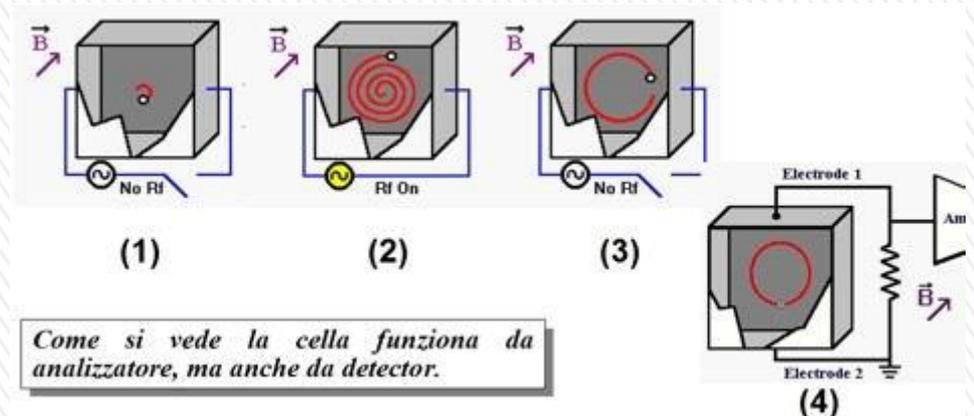
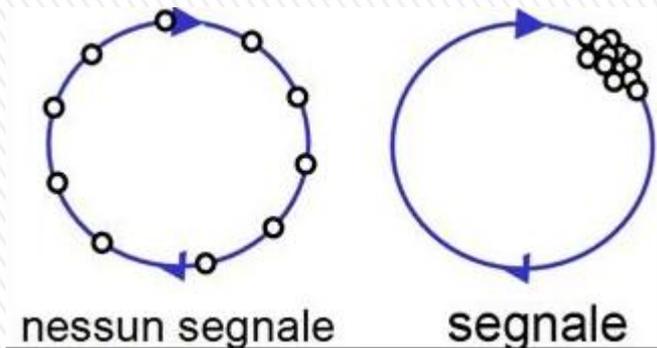
Fourier Transform-Ion

Cyclotron Resonance (FT-ICR)

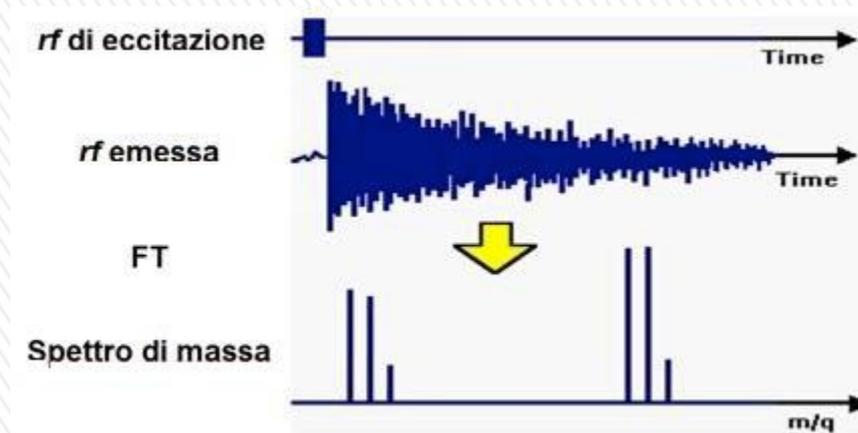
- Uno ione in un campo magnetico uniforme segue una **traiettoria circolare**.
- Il numero di giri al secondo percorsi dagli ioni, cioè la frequenza di rotazione degli ioni, è detta **frequenza di ciclotrone**.
- La frequenza di ciclotrone è **inversamente proporzionale al rapporto m/z** (ma è indipendente dal raggio dell'orbita).
- **Misurare la frequenza di ciclotrone equivale quindi a misurare il rapporto m/z degli ioni.**
- Gli ioni sono cariche in movimento, e ruotando generano un campo elettrico (e un campo magnetico) oscillante: una radiofrequenza (rf). Questa rf può essere rivelata da una coppia di elettrodi posti ai lati della cella.



- Se però gli ioni sono distribuiti uniformemente lungo l'orbita, non si genera alcun segnale.
- Perché si osservi un segnale, gli ioni devono essere raggruppati in modo da formare un "pacchetto" di ioni in rotazione.
- La frequenza della rf è pari alla frequenza di ciclotrone (quindi è diversa per ogni ione, ed è inversamente proporzionale al suo rapporto m/z).
- Gli ioni vengono introdotti nella cella, e all'inizio sono a riposo al centro della cella (1).
- Il "pacchetto" di ioni è generato da una radiofrequenza alla frequenza di ciclotrone degli ioni, che cede energia agli ioni aumentando il raggio della loro orbita, e soprattutto li mette tutti in fase (2).
- A questo punto si "spegne" la radiofrequenza (3), e si registra il segnale emesso dagli ioni (4).



- Se nella cella c'è uno solo tipo di ione, questo emette alla sua frequenza di ciclotrone (con intensità che decresce nel tempo), che può essere misurata.
- Se nella cella ci sono due o più tipi di ioni (come succede quasi sempre) ogni tipo di ione emette alla sua frequenza di ciclotrone.
- Il segnale emesso è perciò la somma di più radiofrequenze a frequenze diverse.
- Esiste una procedura matematica, detta **Trasformata di Fourier** (FT) che permette di ricavare le frequenze di ognuna delle radiofrequenze.
- **Ricavare le frequenze equivale a ricavare i rapporti m/z** , per cui la trasformata di Fourier del segnale emesso dagli ioni dà lo spettro di massa degli ioni presenti nella cella.



Caratteristiche della FT-ICR

- L'analizzatore FT-ICR ha la **risoluzione più alta tra tutti gli analizzatori**. Può facilmente raggiungere 600.000 per un m/z di 1000. È quindi ideale per determinare la formula molecolare anche per molecole piuttosto grandi.
- Il **limite superiore di massa è abbastanza elevato**, intorno a m/z 30.000.
- Gli strumenti FT-ICR sono costosi, perché richiedono un campo magnetico molto intenso (si usano magneti superconduttori, come vedremo per l'NMR).
- Gli strumenti FT-ICR sono **molto sensibili**, e hanno il vantaggio di non distruggere gli ioni nella misura.



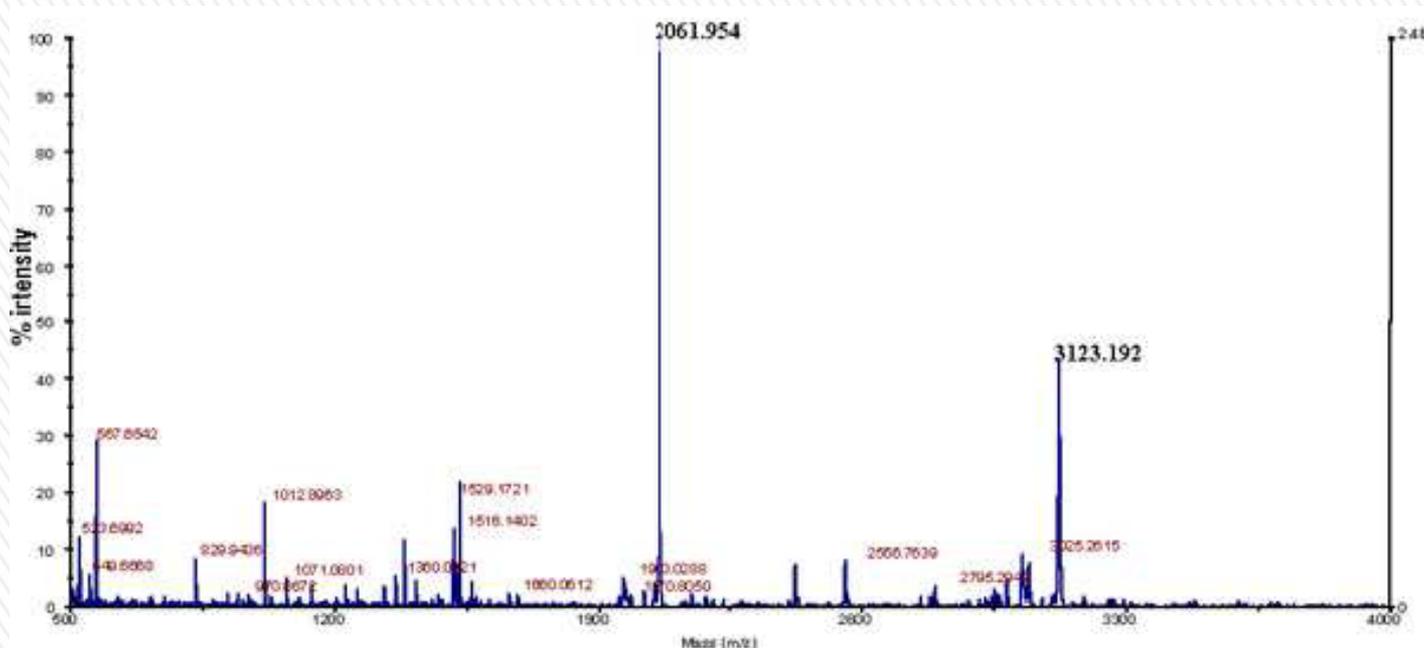
Applicazioni allo studio delle proteine



Identificazione di proteine

- La prima informazione utile per giungere all'identificazione di un polipeptide si può ottenere mediante **peptide mass fingerprinting**.
- L'impronta altro non è che lo spettro di massa degli oligopeptidi generabili da quel polipeptide adottando una determinata procedura chimica o enzimatica di frammentazione.
- Il metodo si basa sul confronto per omologia tra i dati sperimentali (lo spettro di massa) e i dati ottenuti dalla digestione "in silico" (o virtuale) delle proteine presenti nelle banche dati disponibili in rete.
- La digestione con un enzima proteolitico, nella maggior parte dei casi **tripsina**, va a frammentare il polipeptide o la miscela di proteine in oligopeptidi.
- L'analisi spettrometrica dei frammenti ottenuti fornisce una misura accurata dei loro valori di massa nella forma di uno spettro di massa

- Se si sottopone a proteolisi con tripsina un determinato polipeptide, la miscela di oligopeptidi che si ottiene come prodotto è del tutto riproducibile in quanto la tripsina frammenta la catena polipeptidica agendo quasi esclusivamente sui legami peptidici in cui lisina e arginina impegnano la loro funzione carbossilica.



Spettro di massa MALDI-TOF di un digerito triptico di β -caseina. Una ricerca in database tramite PMF è solitamente utilizzata in esperimenti che utilizzano spettrometria di massa MALDI-TOF, in cui i peptidi vengono rilevate come specie cariche singolarmente ($[M+H]^+$). In ascisse si trovano i valori di m/z corrispondenti ai peptidi rilevati.

- Le masse degli oligopeptidi ottenuti dalla digestione triptica vengono messi a confronto con database proteomici disponibili in rete.
- Viene effettuato il confronto fra le masse dei frammenti ottenuti *in vitro* dalla proteina incognita e le masse dei frammenti ottenuti dalla digestione *in silico* di tutte le proteine presenti in bancadati.
- I risultati che si ottengono vengono successivamente valutati per identificare la sequenza per cui la corrispondenza dei valori è massima.
- Dal grado di sovrapposizione tra il set di dati sperimentali e il set di dati ottenuti *in silico* viene ricavato, mediante semplici procedimenti matematici e statistici, un punteggio (score) che definisce la probabilità che l'identificazione sia corretta.
- Il vantaggio del metodo sta nel fatto che si può identificare una proteina senza determinarne la sequenza amminoacidica ma semplicemente conoscendo le masse dei peptidi ottenuti per proteolisi.
- La principale limitazione è che la proteina incognita non può essere identificata se la sua sequenza non è contenuta nella banca-dati a cui si fa riferimento

Sequenziamento di oligopeptidi mediante spettrometria di massa-massa (tandem)

- Nella sua forma più semplice, uno spettrometro di massa "tandem" risulta praticamente costituito dalla combinazione di due spettrometri di massa:
 - il primo spettrometro seleziona una singola massa (ione precursore).
 - lo ione selezionato passa attraverso una camera di collisione; in questa camera, per frammentazione causata da collisioni con molecole di un gas inerte, dallo ione precursore si originano ioni figli;
 - gli ioni figli vengono separati nel secondo quadrupolo.
- Elaborando i dati analitici con software dedicati, il processo di frammentazione dello ione genitore consente di effettuarne in maniera del tutto strumentale il sequenziamento.



Uno spettrometro di massa tandem ha due analizzatori, e una camera di collisione.

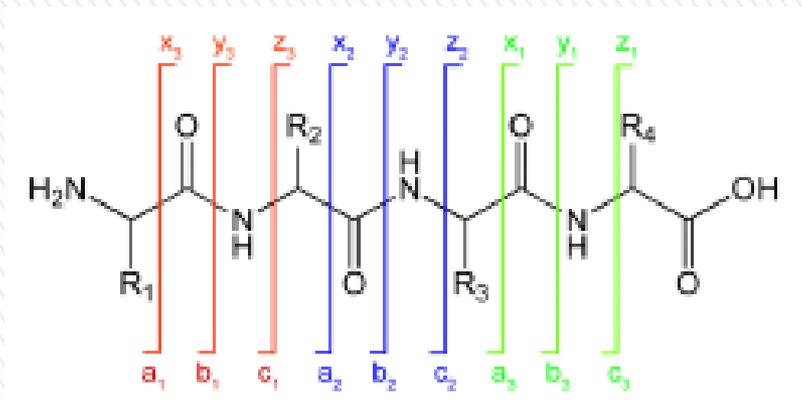
Il primo analizzatore seleziona un certo ione molecolare (ione genitore).

La camera di collisione serve a provocare la frammentazione dello ione.

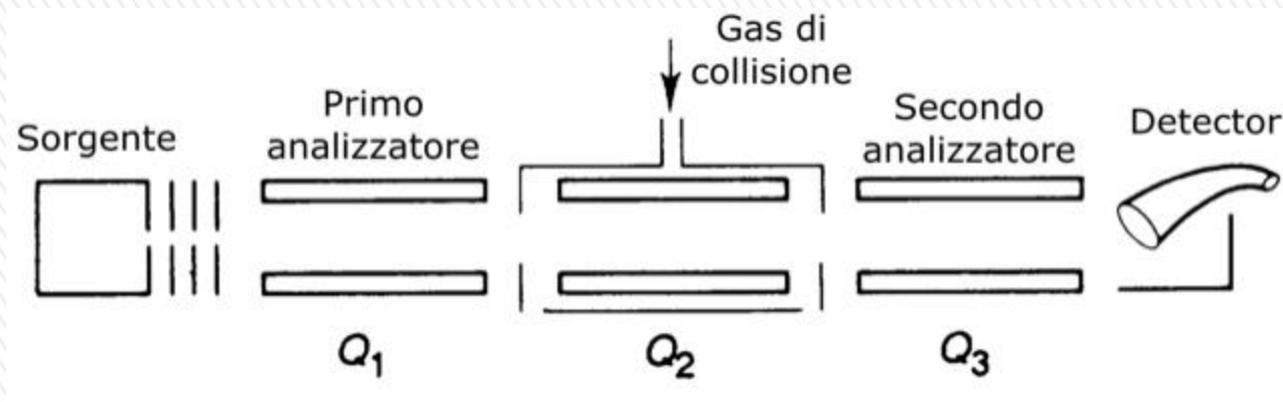
Il secondo analizzatore misura la massa dei frammenti prodotti.

- Nella camera di collisione possono essere frammentati tre diversi tipi di legame della sequenza amminoacidica: I legami NH-CH, CH-CO e CO-NH.
- Per rottura di ciascun legame si ottengono due frammenti: il primo è neutro mentre l'altro (l'unico da considerare perché rilevabile dallo spettrometro) è carico.
- La carica può trovarsi in uno qualsiasi dei due frammenti; quale dei due dipende dalla loro affinità relativa per il protone.

- I frammenti che si possono ottenere sono convenzionalmente indicati con le lettere a, b, o c se la carica è trattenuta nel frammento N-terminale e con le lettere x, y o z se la carica è mantenuta nel frammento C-terminale.
- Il pedice indica il numero di residui amminoacidici contenuti nel frammento mentre l'apice è talora utilizzato per indicare perdite neutre (* per la perdita di ammoniacca, ° per la perdita di acqua).
- Per ogni amminoacido della catena ci sono sei possibili ioni prodotti dalla frammentazione: gli ioni a, b e c, con la carica elettrica nel frammento N-terminale, e gli ioni x, y e z che hanno la carica nel frammento C-terminale.
- **Il sito di frammentazione più probabile è il legame peptidico, cioè legame CO-NH, e quindi i frammenti carichi più probabili sono b e/o y. La differenza di massa fra due ioni b o y adiacenti, dà la misura della massa di quel particolare residuo amminoacidico.**



- Il secondo quadrupolo dello spettrometro di massa tandem, usando la stessa logica descritta in precedenza, rileva i valori m/z di tutti i frammenti figlio, fornendo così un'impronta digitale del peptide analizzato molto più affidabile di quella ottenibile con uno spettrometro di massa ad un solo quadrupolo.



In uno spettrometro MS/MS a triplo quadrupolo la camera di collisione è anch'essa un quadrupolo, ma regolato in modo da far passare tutti gli ioni, e contenente una certa quantità di gas che provoca la frammentazione.



Studio delle proprietà strutturali delle proteine

- Negli spettri ESI di campioni proteici esiste una **correlazione tra lo stato di carica delle proteine ripiegate e l'estensione della superficie accessibile al solvente** della struttura nativa delle proteine stesse.
- Ciò consente di ricavare fondamentali informazioni su:
 - lo **stato di folding delle proteine** (e quindi i processi di cambiamento conformazionale, denaturazione, rinaturazione, unfolding)
 - la **formazione di complessi non covalenti** (oligomerizzazione, interazioni ligando-proteina)

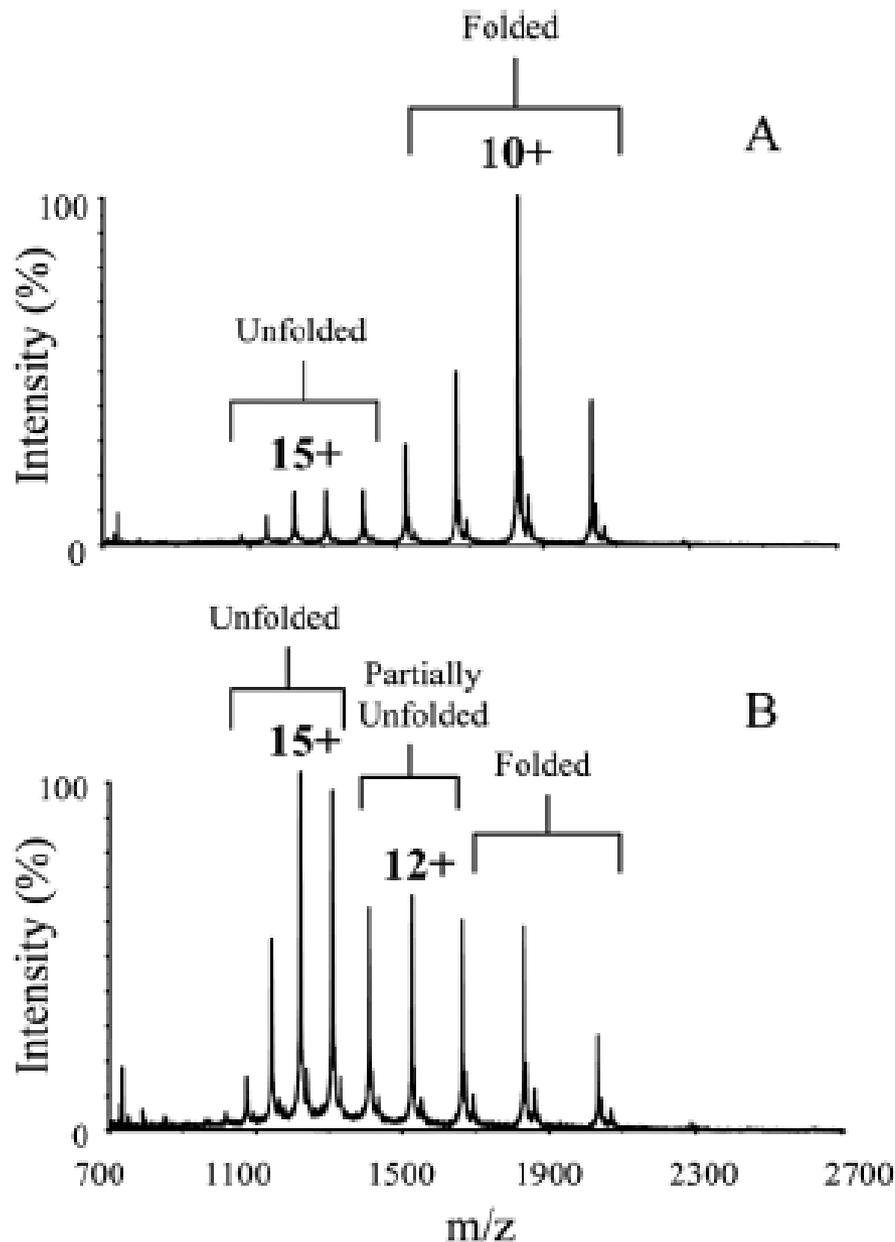


Figure 1. Nano-ESI-MS spectra of 5 μ M BLG in 1% formic acid at different TFE concentrations: 14% (A), 16% (B). Adapted from reference [32].

- Le proteine folded sono caratterizzate da CSD strette con valore di m/z relativamente elevati
- le proteine unfolded danno CDS larghe spostate verso m/z minori

CSD: charge-state distribution



- La formazione di complessi non covalenti viene rilevata da uno shift della massa dal valore relativo allo stato free a quello relativo allo stato bound
- per interazioni proteina-piccolo ligando la massa del complesso normalmente corrisponde alla somma esatta delle masse delle componenti molecolari
- nel caso degli oligomeri si osserveranno picchi specifici per una data stechiometria; al crescere del numero di subunità la CSD è caratterizzata da più picchi «ammucchiati»

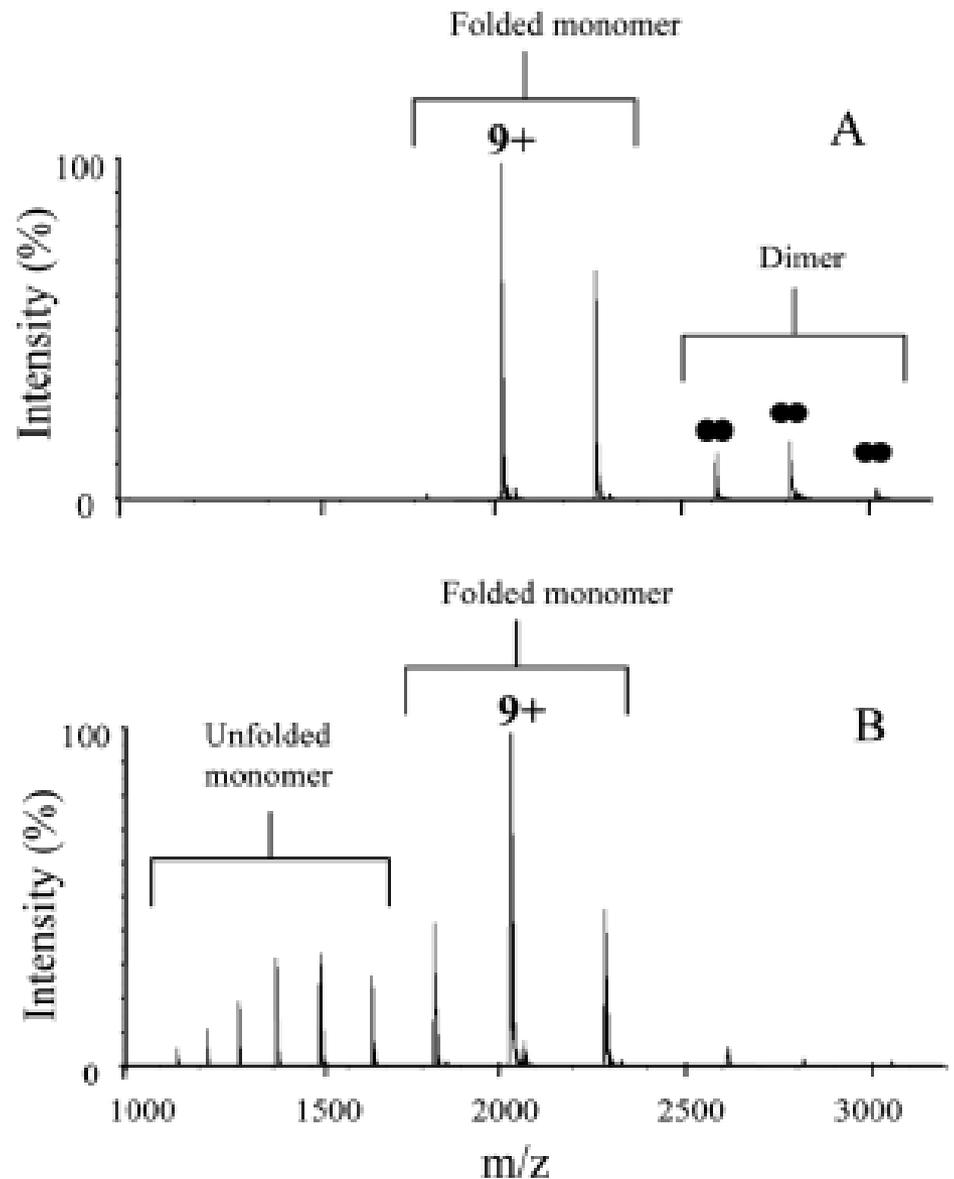


Figure 2. Nano-ESI-MS spectra of 10 μ M BLG in 10 mM ammonium acetate pH 6.7 at different interface temperatures: room temperature (A), 150°C (B). The spectra were acquired on a quadrupole-TOF instrument (QSTAR Elite, Applied Biosystems) equipped with an ion cooler guide.