

Spettrometro di massa interdipartimentale

Ubicazione: Piano verde, Laboratorio Fisiologia vegetale (Bracale-Vannini)

Tipologia: Spettrometro di massa a trappola ionica modello LXQ (ThermoFisher a pompa HPLC (MS pump plus, ThermoFisher) e auto-campionatore (Surveyor autosampler, ThermoFisher)

Riferimento: Marsoni Milena (0332421416)

Informazioni: lo strumento è a disposizione di tutti i gruppi che vogliono utilizzarlo previa prenotazione (vedi referente). Lo strumento non ha un tecnico dedicato ma solo un tecnico di riferimento (Milena Marsoni). Chi si è già interfacciato con uno strumento simile può utilizzarlo in autonomia assistito all'occorrenza dal tecnico di riferimento. Altrimenti si può concordare una collaborazione valutando il tipo di lavoro da svolgere.

Principali caratteristiche:

- Sorgente di ionizzazione ESI (Electrospray ion source),
- modalità di polarità ionica negativa o positiva.
- Possibilità di variare il flusso di ingresso (Tramite HPLC) da 0,1 $\mu\text{L} / \text{min}$ a 1000 $\mu\text{L} / \text{min}$
- Tecnica di dissociazione tipo CID (Collision-induced dissociation)
- Possibilità di analisi di massa a più stadi, MS^n
- Determinazione dello stato di carica mediante Ultra ZoomScan™
- Possibilità di iniezione diretta o mediante auto-campionatore

Stato: Lo strumento attualmente presenta un buono stato di manutenzione ed offre prestazioni di ottimo livello in particolare nell'ambito dell'analisi dei metaboliti. Per quanto riguarda l'analisi proteomica le sue prestazioni sono buone ma limitate per quanto riguarda la sensibilità in quanto ormai lo strumento è datato (2006) rispetto alle macchine più performanti disponibili ora sul mercato.

La spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica applicata sia all'identificazione di sostanze sconosciute, sia all'analisi in tracce di sostanze. Viene comunemente usata in combinazione con tecniche separative, quali la gascromatografia e la cromatografia in fase liquida (HPLC). Il principio su cui si basa la spettrometria di massa è la possibilità di *separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica* generalmente tramite campi magnetici statici o oscillanti. Tale miscela è ottenuta ionizzando le molecole del campione, principalmente facendo loro attraversare un fascio di elettroni ad energia nota. Le molecole così ionizzate sono instabili e si frammentano in ioni più leggeri secondo schemi tipici in funzione della loro struttura chimica. L'utilizzo di sorgenti di ionizzazione soft come la ESI ha permesso di estendere l'utilizzo di questa tecnica anche all'analisi di molecole di interesse biologico come le proteine che possono essere identificate e quantificate mediante esperimenti di spettrometria di massa.

In un'analisi tipica, un campione può essere introdotto in uno dei seguenti modi:

- Utilizzando la pompa a siringa (infusione diretta); generalmente si usa questo sistema per ottimizzare i parametri di analisi
- Utilizzando la valvola di iniezione (iniezione manuale) accoppiata o meno ad un sistema HPLC (LC/MS)

In analisi mediante LC / MS, un campione viene separato nei suoi vari componenti mediante una colonna cromatografica. I componenti eluiscono dalla colonna LC e passano nel rivelatore LXQ MS dove vengono analizzati. I dati dal rivelatore MS vengono quindi memorizzati e elaborati dal data system.

Il rivelatore LXQ MS è costituito da una sorgente ionizzante, un'ottica ionica, un analizzatore di massa e un sistema di rilevazione di ioni. L'ottica ionica, l'analizzatore di massa, il sistema di rilevazione di ioni e parte della sorgente di ionizzazione sono racchiusi in un collettore di vuoto.

Il campione viene ionizzato nella sorgente. Sorgenti diverse sfruttano diverse tecniche di ionizzazione. Gli ioni prodotti nella sorgente vengono trasmessi dalle ottiche ioniche nell'analizzatore di massa, dove sono intrappolate in orbite stabili da un campo elettrico variabile nel tempo. La polarità dei potenziali applicati alla sorgente e all'ottica ionica determina se verranno trasmessi all'analizzatore di massa ioni caricati positivamente o negativamente.

I rapporti mass-carica degli ioni prodotti nella sorgente sono misurati dall'analizzatore di massa. Ioni selezionati vengono espulsi dall'analizzatore di massa e raggiungono il sistema di rilevazione di ioni dove producono un segnale che viene poi amplificato e analizzato dal data system dello strumento. La data system serve come interfaccia utente del rivelatore MS. Ogni sequenza di caricamento di ioni nell'analizzatore di massa seguita da un'analisi di massa degli ioni viene chiamata scansione. Lo strumento utilizza diverse modalità di scansione per caricare, frammentare ed espellere gli ioni dall'analizzatore di massa offrendo all'utente una grande flessibilità nella strumentazione per risolvere problemi complessi analitici.

Perché utilizzare il rivelatore Finnigan LXQ MS?

Il rivelatore Finnigan LXQ MS può fornire diversi livelli di analisi. Ogni livello di analisi aggiunge una nuova dimensione di specificità per l'identificazione inequivocabile di un composto. I diversi livelli di analisi sono i seguenti:

- Separazione cromatografica e rilevamento di un composto (tecnica non MS usando il tempo di ritenzione cromatografico)
- Analisi di massa (informazioni sulla massa molecolare)
- Analisi di massa in due fasi, MS / MS (informazioni strutturali)
- Analisi di massa a più stadi, MSⁿ (informazioni strutturali)
- Analisi ZoomScan™ (informazioni sullo stato di carica)

La separazione cromatografica e il rilevamento di un composto possono essere ottenuti da tutti i sistemi LC / rivelatore (ex rivelatore UV). Il tempo di ritenzione da solo, tuttavia, non sempre permette di identificare positivamente un composto, in quanto composti diversi possono avere lo stesso tempo di ritenzione nelle

stesse condizioni sperimentali. Inoltre la co-eluzione di altri composti insieme a quello di interesse potrebbe alterare i risultati di quantificazione.

L'analisi della massa a singolo stadio (MS) permette invece una identificazione più sicura di un analita di interesse basandosi anche su informazioni di massa molecolare.

L'analisi in massa a due stadi (MS/MS) poi permette di ottenere ancora maggiore certezza nell'identificazione di un composto. L'analisi MS / MS monitora come si frammenta uno ione parente quando è esposto ad una fase aggiuntiva di eccitazione. In particolare la tecnica single reaction monitoring (SRM) monitora la produzione di un ione figlio specifico prodotto da uno ione genitore e questo permette di quantificare facilmente e in maniera molto specifica analiti di interesse in matrici complesse quali tessuti vegetali o animali, plasma, urina, acque sotterranee o terreno.

L'analisi di massa a più stadi (MSⁿ) è invece una funzione adatta per ottenere informazioni strutturali utili per elucidare la struttura dei metaboliti, prodotti naturali e degli zuccheri.

Sorgente di ionizzazione ESI (Electrospray ion source)

I rilevatori di massa necessitano di una sorgente per ionizzare il composto da analizzare. Lo strumento in questione è dotato di una sorgente ESI (Electrospray ion source)

La sorgente ESI:

- Può analizzare masse molecolari maggiori di 50.000 u se lo ione presenta una carica multipla.
- La sorgente ESI è particolarmente utile per analisi dei composti polari come ad esempio polimeri biologici (proteine, peptidi, glicoproteine e nucleotidi), prodotti farmaceutici e loro metaboliti e polimeri industriali.
- È possibile utilizzarla in modalità di polarità ionica negativa o positiva.
- È possibile variare la portata nello spettrometro di massa su un campo da 0,1 µL / min a 1000 µL / min (flusso HPLC)

Raccomandazioni per uso di sorgente ESI

In ESI, il tipo di buffer e la concentrazione di tampone hanno entrambi un notevole impatto effetto sulla sensibilità.

- I sistemi misti di solventi organici/ acquosi che comprendono solventi organici quali metanolo, acetonitrile e alcool isopropilico sono raccomandati per ESI.
- Non è consigliabile utilizzare solo acqua come solvente.
- Acidi e basi volatili danno buoni risultati.
- Le soluzioni saline con concentrazioni superiori a 10 mM non sono raccomandate.
- Acidi minerali e basi forti possono danneggiare lo strumento e non devono essere utilizzati.

- Molte applicazioni LC utilizzano buffer non volatili come i tamponi di fosfato e borato. È meglio evitare l'uso di buffer non volatili con il rilevatore MS perché possono causare problemi: bloccare il capillare nella sorgente o causare accumulo di sale nel punto in cui viene emesso lo spray compromettendo così la volatilizzazione del campione.

Per ottenere un buon segnale in ESI, quindi, seguire queste regole:

- **Evitare sali e buffer non volatili.** Ad esempio, evitare l'uso di soluzioni contenenti sodio, potassio, fosfato o borato.
- **Utilizzare sistemi solventi organici / acquosi e acidi e basi volatili:**
 - ✓ Acido acetico
 - ✓ Acetato di ammonio
 - ✓ Formato di ammonio
 - ✓ Idrossido d'ammonio
 - ✓ Trietilammina (TEA)
- **Se possibile, ottimizzare il pH del sistema di solvente per l'analita di interesse.** Ad esempio, se il tuo analita di interesse contiene un'ammina primaria o secondaria, la fase mobile dovrebbe essere leggermente acidica (pH da 2 a 5).