



Società Chimica Italiana
Divisione di Spettrometria di Massa



Con il patrocinio di

Consiglio Nazionale delle Ricerche

Dagli ioni metastabili (1945) alle
tecniche MSⁿ: stato dell'arte,
novità, innovazione e
strumentazione

CNR

Piazzale Aldo Moro, 7 - Roma

15 dicembre 2015



SCANSIONI MS/MS ISOENERGETICHE DEI PRECURSORI: *PROOF-OF-PRINCIPLE* NELL'ANALISI DEL CERAMIDOMA.

Federico Maria Rubino, Giuseppe Campisi, Jessica Rizzo, Jacopo Antognetti, Rita Paroni

Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Milano

Lo strumento a triplo quadrupolo presenta, come principale punto di forza quale soluzione analitica per la caratterizzazione di miscele complesse di prodotti naturali, la possibilità di identificare singole specie molecolari entro famiglie chimiche omogenee, attraverso la ricerca di frammenti specifici che danno luogo a specie ioniche (spettroscopia dei precursori) o prive di carica ionica (spettroscopia delle perdite neutre). Questo approccio si è dimostrato di grande utilità sia nella ricerca delle forme bio-trasformate degli xenobiotici, sia nella caratterizzazione di strutture biologiche, quali quelle dei lipidi, che sono caratterizzate dalla presenza di micro-eterogeneità a livello della composizione in residui di acidi grassi e da variazioni nella composizione delle subunità polari, ciascuna delle quali dà luogo a frammenti caratteristici in almeno una delle polarità ioniche. L'analisi delle miscele complesse è basata sulla rivelazione, per ciascun componente appartenente alla classe chimica indagata, della transizione ionica relativa al possesso, da parte della sua struttura molecolare, della sottostruttura che identifica la specifica classe chimica, e dell'appropriato valore di massa molecolare, che identifica a sua volta lo specifico termine della serie chimica, eventualmente confermato dalla presenza, nello spettro dei frammenti, di un segnale corrispondente alla sotto-struttura variabile e caratteristica della specie molecolare identificata. Tutto ciò è possibile, o si verifica, in quanto la reazione di frammentazione che genera il frammento specifico della classe chimica è scarsamente sensibile alla presenza di altri elementi strutturali nelle diverse molecole, ovvero il massimo di abbondanza nella frammentazione si misura a un valore apprezzabilmente costante di energia di collisione.

L'ottimizzazione delle condizioni analitiche per la ricerca di molecole di identità nota (analisi target) include una fase nella quale viene identificato, in un campione standard autentico dell'analita, il valore di energia di collisione corrispondente alla massima conversione del precursore molecolare nel frammento ionico distintivo. Tale parametro strumentale è ordinariamente espresso, negli strumenti a triplo quadrupolo, come differenza tra il potenziale elettrico con il quale i precursori ionici sono trasmessi dal primo quadrupolo selettore (Q1) e quello al quale si trova il quadrupolo a sola radiofrequenza (q2) nel quale il precursore ionico collide con il gas-bersaglio (potenziale nominale di collisione, E_{lab}). In funzione della massa del precursore ionico (m_{PRE}) e di quella del gas bersaglio (m_{TAR}), l'energia massima (E_{CM}) depositata dalla collisione sul proiettile ionico è espressa dalla relazione (Equazione 1):

$$(Equazione 1) \quad E_{CM} = E_{lab} * \frac{m_{TAR}}{(m_{TAR} + m_{PRE})}$$

e, di conseguenza, a ogni valore costante di E_{lab} , l'energia efficace per attivare la reazione di frammentazione cala all'aumentare della massa molecolare del precursore ionico, ovvero diminuisce l'abbondanza del frammento ionico. Tale calo è, inoltre, di forma non-lineare al crescere della massa molecolare dell'analita e al crescere dell'energia di collisione richiesta per la formazione del frammento ionico. Questa ineliminabile conseguenza della dinamica della collisione

ione-molecola limita la possibilità di quantificare le diverse specie chimiche analoghe presenti in una miscela, se non ottimizzando i parametri per ciascun singolo termine della famiglia molecolare di interesse, se uno standard autentico è disponibile.

Tuttavia, riarrangiando i termini dell'equazione (1) è possibile derivare una nuova relazione, di forma lineare (Equazione 2), che prevede, per una specifica reazione generale di decomposizione unimolecolare in fase gas che si verifica in una serie chimica omogenea, il valore di potenziale nominale di collisione (E_{lab}) di specie i cui standard non sono disponibili, o che sono addirittura ancora ignote.

$$(Equazione\ 2) \quad E_{lab} = E_{CM} + \frac{E_{CM}}{m_{TAR}} * m_{PRE}$$

Quale esempio di applicazione, sulla base di questa previsione, e della possibilità di alcuni moderni strumenti a triplo quadrupolo di effettuare aggiustamenti veloci del potenziale del q2 nel corso della scansione dei quadrupoli analizzatori, abbiamo messo a punto una tecnica per la discovery semi-quantitativa di specie ceramidiche in standard di provenienza ignota e in miscele provenienti da estratti biologici ed analizzate mediante ESI⁺.

La ricerca dei ceramidi utilizza la transizione $MH^+ \rightarrow O''$ (m/z 264⁺), corrispondente al formale distacco del frammento corrispondente all'acido grasso legato con legame ammidico alla sfingosina (Rubino, 1984). Sono state misurate le curve di *breakdown* nell'intervallo nominale di E_{lab} compreso tra 0 e 50V per alcuni precursori ionici compresi tra m/z 368 (CerC6, un analogo non-naturale sintetico, usato in studi di farmacologia cellulare) e 648 (CerC24, lo standard a catena acilica più lunga commercialmente disponibile). Il valore massimo di efficienza per la transizione $MH^+ \rightarrow O''$, è risultato corrispondente, per il CerC6, a 23,5 V, ovvero a 1,66 eV_{CM}. Applicando l'Equazione 2 è stato possibile prevedere i valori corrispondenti per i ceramidi della serie metilenica pari, compresi tra C12 (lo standard interno comunemente impiegato per la quantificazione del ceramidoma in letteratura) e C24. I valori calcolati sono stati confrontati mediante regressione lineare con quelli misurati sperimentalmente con la tecnica di ottimizzazione della sensibilità analitica suggerita nei protocolli strumentali e con quelli suggeriti in diversi metodi analitici pubblicati (Shaner, 2009). L'accordo della previsione con la misura estemporanea è risultata accurata entro 1-2 V_{lab} (0,08-0,14 eV_{CM}, in funzione della massa molecolare dello ione precursore, ovvero della massa molecolare del ceramide di interesse), e non è stato osservato un trend all'aumentare della massa molecolare ovvero del numero di gradi di libertà dello ione precursore, a conferma della previsione che il meccanismo di frammentazione risulta indipendente dalla lunghezza della catena alchilica dell'acido grasso.

Da ultimo, è stata implementata sullo spettrometro API3000LTQ una modalità di scansione congiunta per la ricerca di ceramidi in estratti biologici che opera una ricerca dei precursori del frammento O'' attraverso una scansione lineare sincronizzata del Q1 (480-740 Th) e della differenza di potenziale tra Q1 e q2 (23-44 V), corrispondente all'intervallo C12-C26 di lunghezze della catena acilica dell'acido grasso.

Bibliografia

F.M.Rubino, L.Zecca, S.Sonnino, *Biol. Mass Spectrom.*, **23**, 82-90 (1994)

R.L. Shaner, J.C. Allegood, H. Park, E. Wang, S. Kelly, C.A. Haynes, M. Cameron Sullards, A.H. Merrill, Jr. *J Lipid Res.* **50**, 1692-1707 (2009)