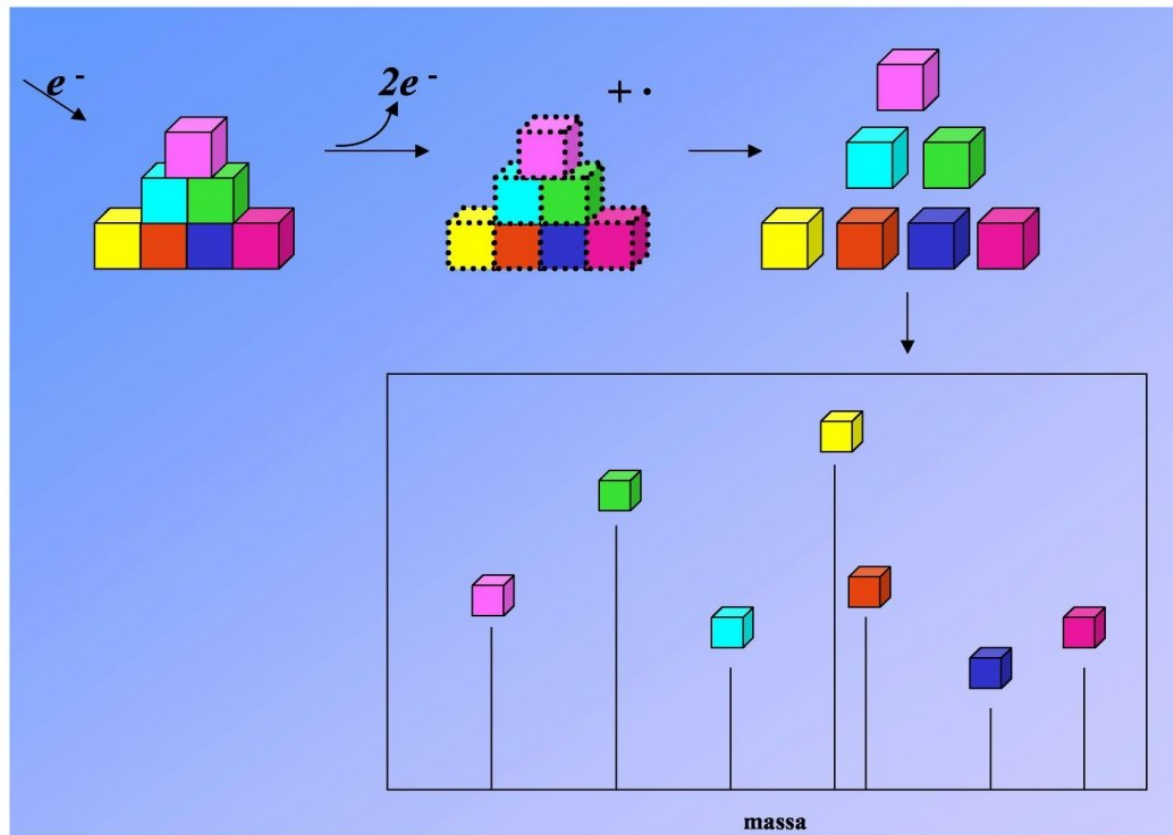


# Altre tecniche analitiche

- spettrometria di massa
- elettroforesi

# Spettrometria di massa

Tecnica per indagine che si basa sulla **ionizzazione** di una molecola e sulla successiva misura del rapporto  $m/Q$ , quindi della massa dello ione (praticamente uguale alla **massa totale della molecola**). In certe condizioni lo ione si frammenta in ioni con diverso rapporto  $m/Q$ .



# Spettrometro di massa

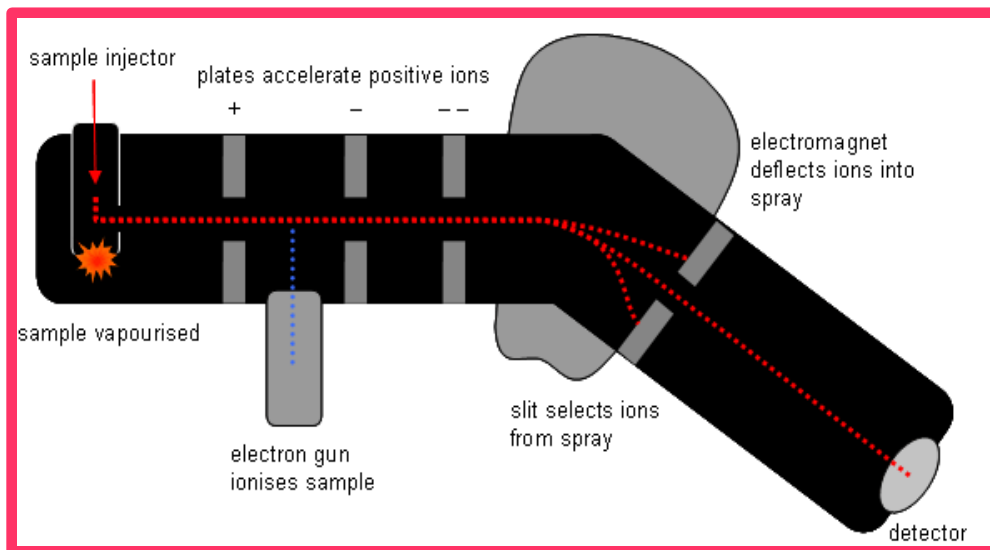
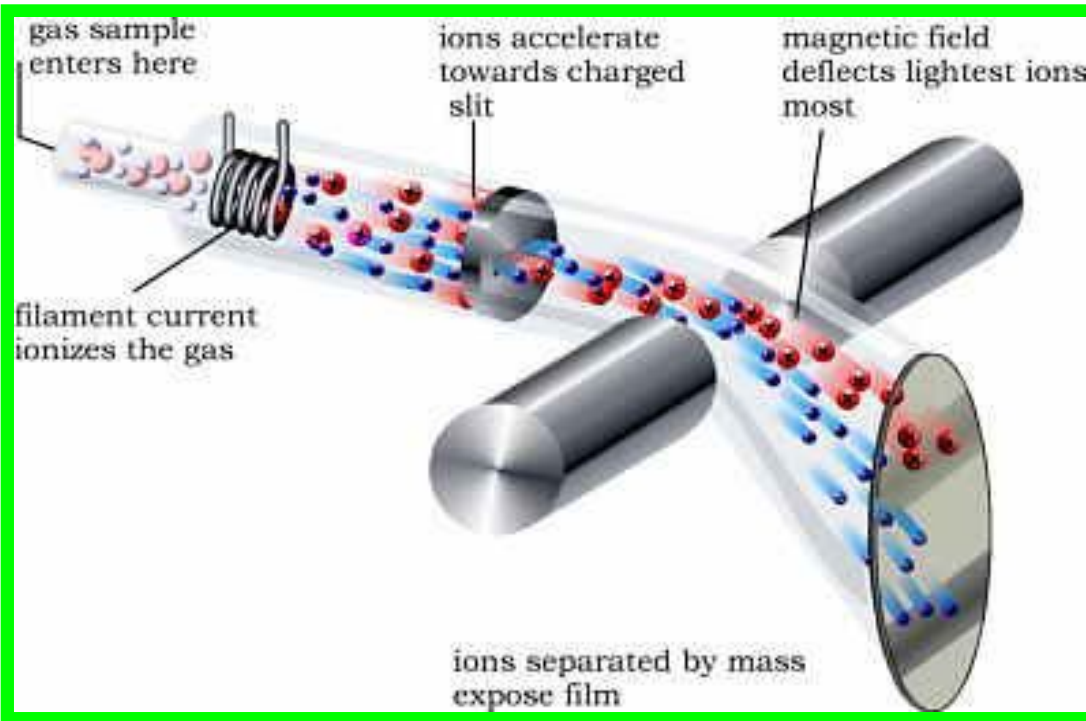
$$Q = Ze$$

$$\frac{1}{2} m v^2 = QV$$

$$Q B v = \frac{m v^2}{R}$$

$$\frac{m}{Q} = \frac{B^2 R^2}{2V}$$

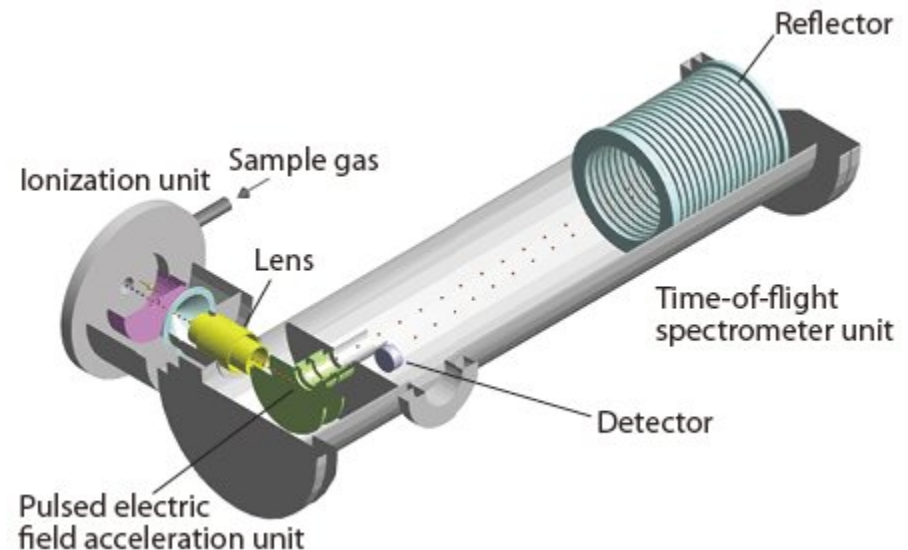
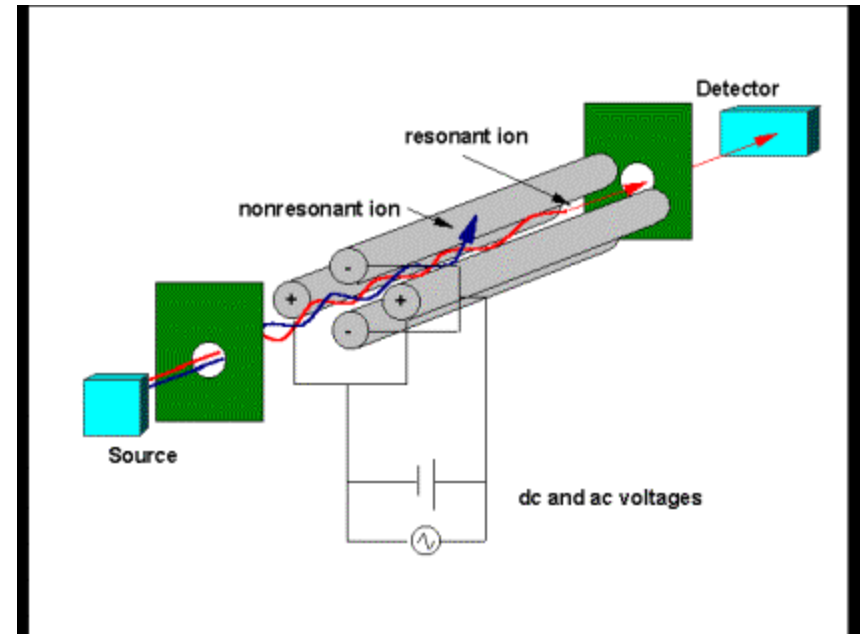
Per **campo magnetico**  $B$  e **potenziale accelerante**  $V$  fissati, ogni rapporto  $m/Q$  (o  $m/Z$ ) corrisponde ad un diverso raggio di curvatura



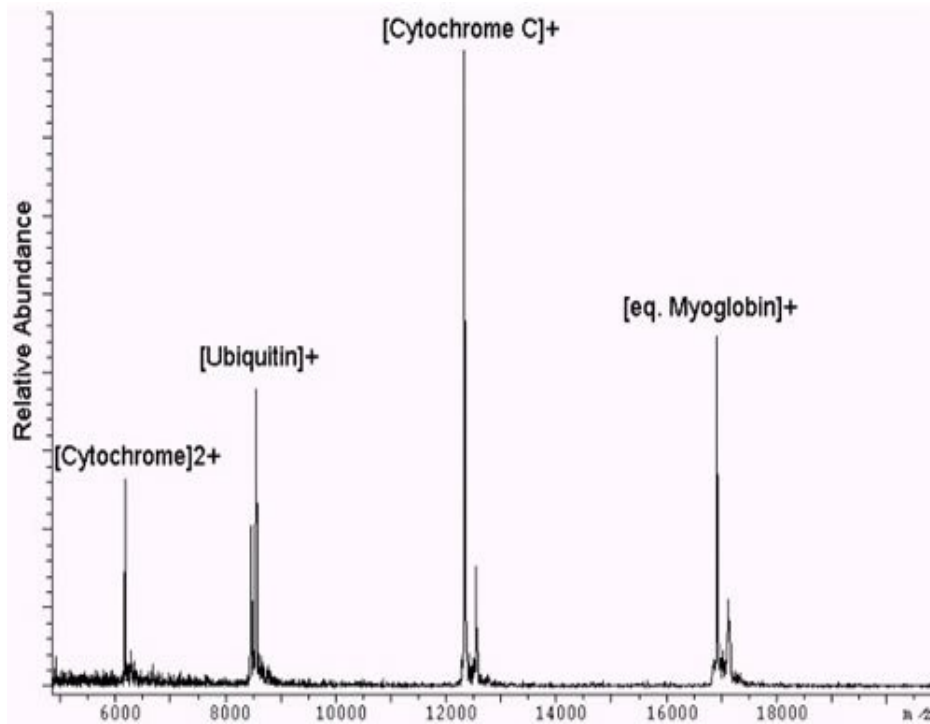
# Spettrometro di massa

Altri meccanismi di separazione delle masse:

- a campo elettrico di **quadrupolo oscillante** (la frequenza di risonanza dipende dalla massa);
- a **tempo di volo (TOF)** (a fissata energia cinetica, la velocità, e quindi il tempo per fare un percorso dipende dalla massa)



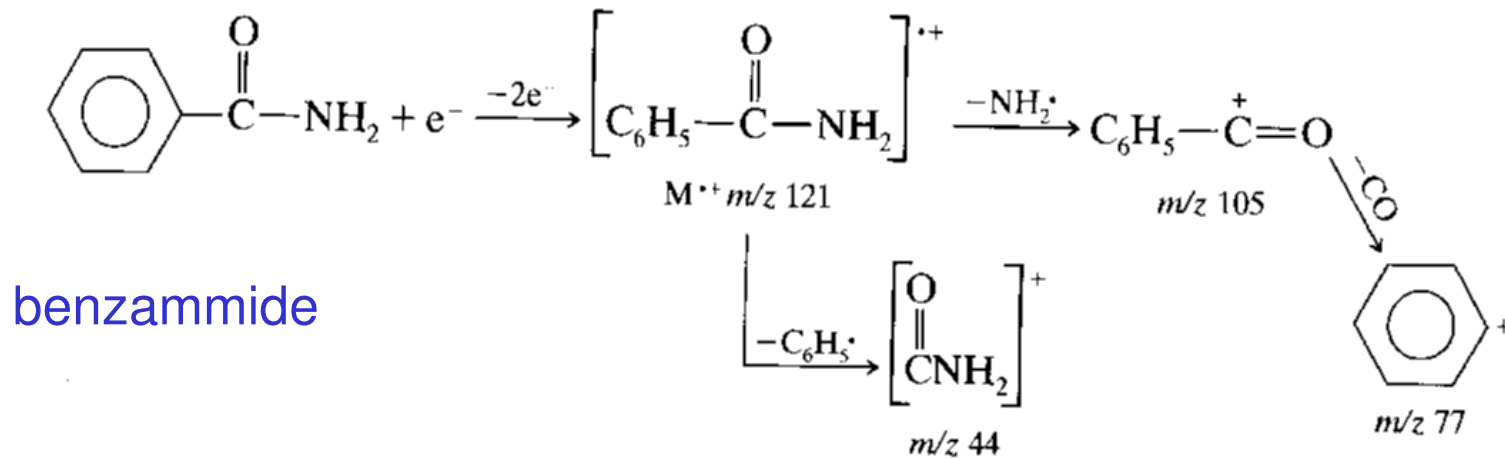
# Esempio: ioni positivi stabili



↑  
Cytochrome C ionizzato 2 volte

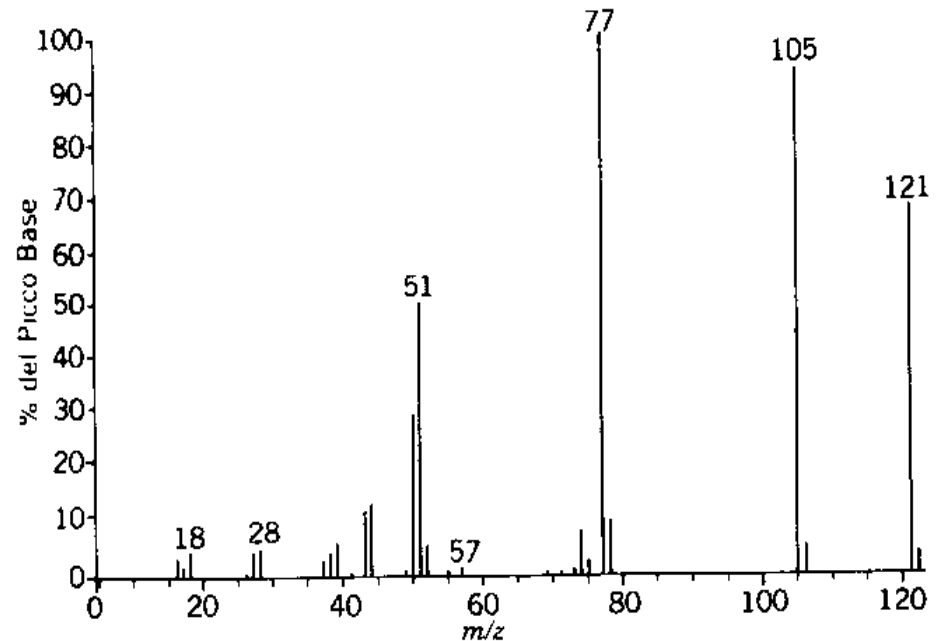
Una miscela di proteine è analizzata nelle sue componenti mediante uno spettrometro di massa a tempo di volo (TOF)

# Esempio: frammentazione



Lo ione iniziale, ottenuto per strappo di un elettrone, si frammenta quindi, per produrre una serie di ioni con diverso rapporto ***m/z***.

Lo spettro di massa è il grafico delle masse dei frammenti carichi positivamente in funzione delle loro concentrazioni relative.



# Isotopi e loro abbondanza

isotopi = elementi con stesso  $Z$  e diverso numero di neutroni  $N$  nel nucleo

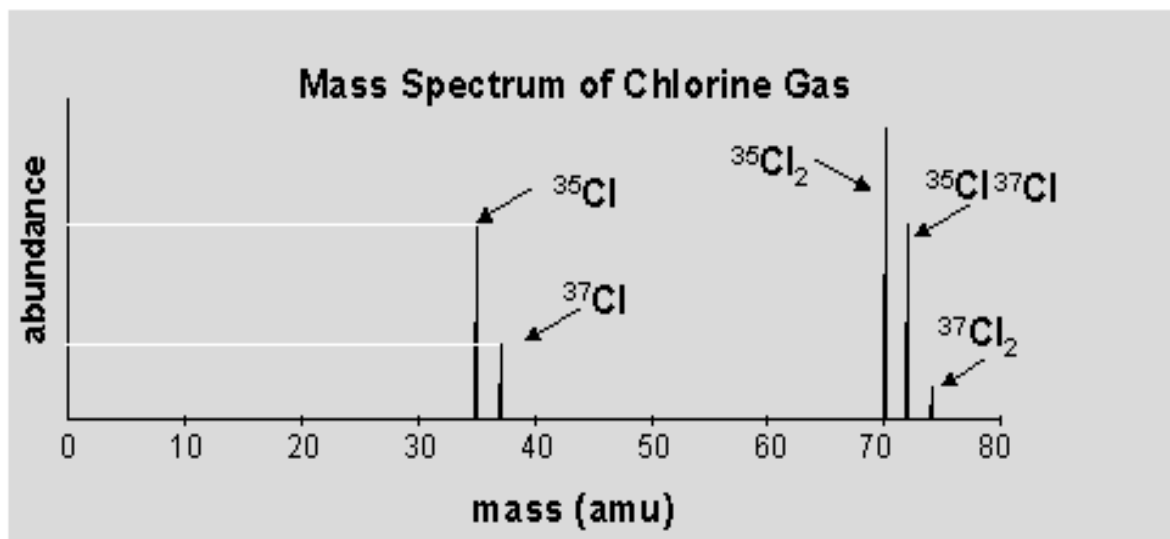
l'indicino in alto a sinistra indica  $A=Z+N$

elemento	isotopi	$Z$	$A$	$N=A-Z$	abbondanza relativa (%)	peso atomico medio [a.m.u.]
carbonio	$^{12}\text{C}$	6	12	6	98.89	12.011
	$^{13}\text{C}$	6	13	7	1.11	
	$^{14}\text{C}$	6	14	8	tracce	
ossigeno	$^{16}\text{O}$	8	16	8	99.759	15.9994
	$^{17}\text{O}$	8	17	9	0.037	
	$^{18}\text{O}$	8	18	10	0.204	
potassio	$^{39}\text{K}$	19	39	20	93.138	39.0983
	$^{40}\text{K}$	19	40	21	0.012	
	$^{41}\text{K}$	19	41	22	6.800	
piombo	$^{204}\text{Pb}$	82	204	122	1.3	207.19
	$^{206}\text{Pb}$	82	206	124	26.0	
	$^{207}\text{Pb}$	82	207	125	20.7	
	$^{208}\text{Pb}$	82	208	126	52.0	

# Picchi isotopici

## Atomic Weights from Mass Spectra

- Sostanze di uguale formula contenenti miscugli di **isotopi** diversi con diversa abbondanza
- picchi a masse  $m$ ,  $m+1$ ,  $m+2$ , ...



isotope	abundance	mass (amu)
$^{35}\text{Cl}$	75.77%	34.96885
$^{37}\text{Cl}$	24.23%	36.96699

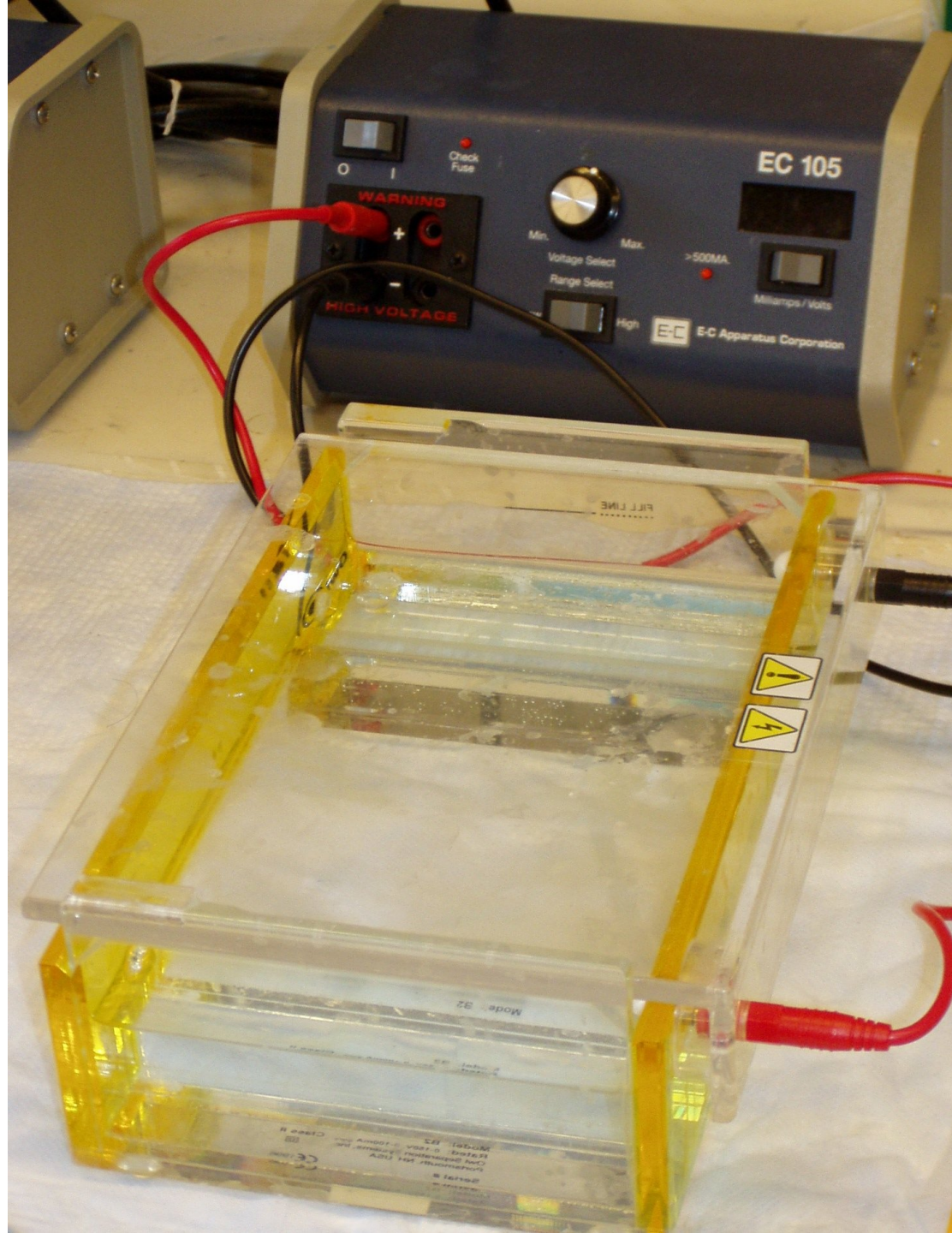


average atomic  
weight:  
35.453



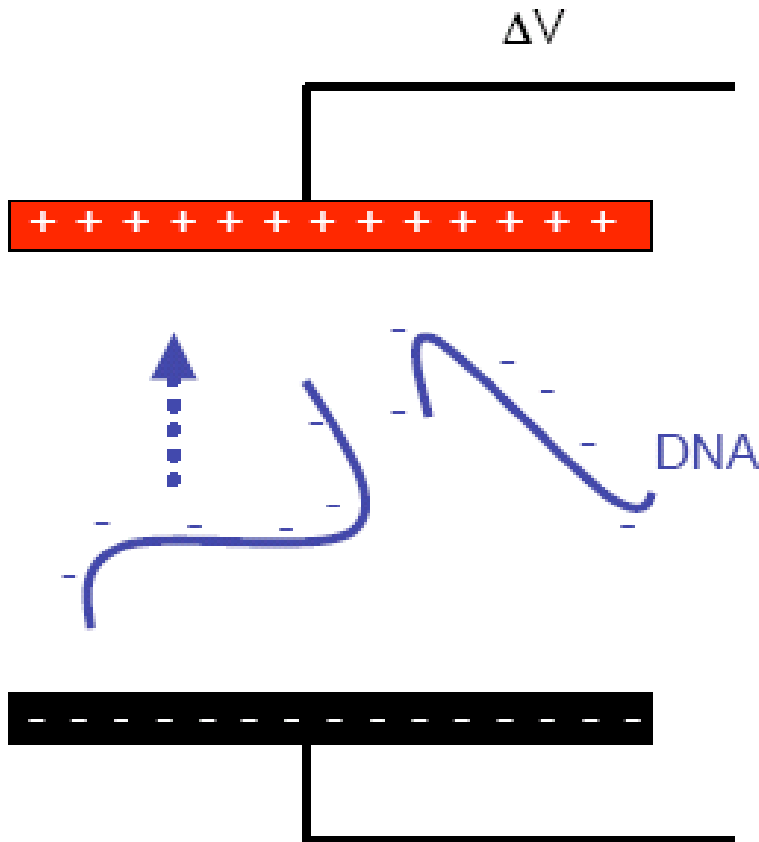
# Elettroforesi

- ◆ Migrazione di particelle **cariche** (ioni molecolari) sotto l'influenza di un **campo elettrico**
- ◆ Rappresenta un **metodo di separazione** eccellente per macromolecole (proteine e acidi nucleici) che hanno gruppi ionizzabili (DNA - gruppo  $\text{PO}_4^{3-}$ ).
- ◆ Cariche negative migrano verso anodo, positive verso il catodo (per ogni pH tranne il punto isoelettrico).
- ◆ Metodo molto semplice e veloce, adatto per analizzare polimeri biologici, ad es. DNA.



# Forza elettrica

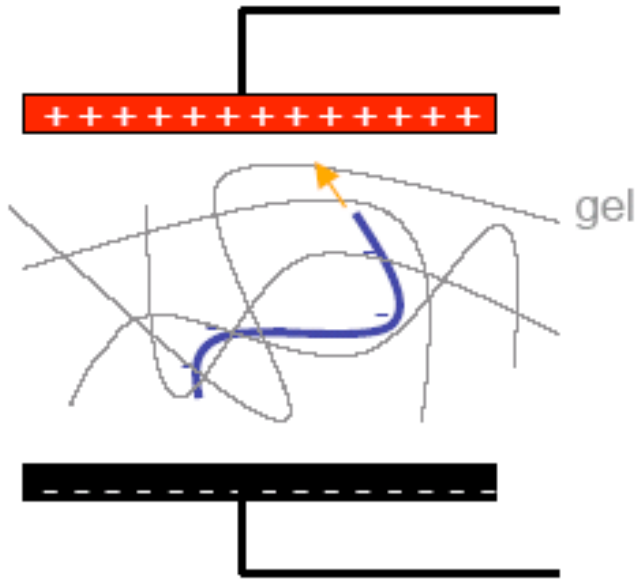
- Calcolo il campo elettrico tra le due piastre
- Calcolo il moto del DNA ionizzato negativamente (a causa del fosfato del backbone del DNA) attraverso la relazione



$$\vec{F}_E = q \vec{E}$$

$q = N q_0 =$  carica totale sul  
DNA di  $N$  basi

# Moto viscoso



- Utilizzo supporto solido (gel) poroso (poliammide o agarose) immerso in una soluzione elettrolitica, il tampone che stabilizza il pH per ionizzazione costante.
- Gel = setaccio: rallenta molto di più le catene lunghe delle corte. Se non ci fosse il gel, l'attrito viscoso del DNA sarebbe proporzionale alla sua lunghezza, quindi a  $N$

$$\vec{F} = \vec{F}_E - \gamma \vec{v}$$

$\gamma$  è il coefficiente di attrito viscoso

La forza di attrito viscoso dipende dalla forma e dalle dimensioni della molecola, dalle dimensioni e dalla densità dei pori del gel, dalla viscosità del tampone

# Il moto in regime viscoso

L'equazione del moto è:

(l'equazione del paracadutista!)

$$m \vec{a} = \vec{F}_E - \gamma \vec{v}$$

- $F_E$  è costante
- molto rapidamente  $v$  aumenta nel tempo fino a che  $a = 0$
- dopo un breve transiente iniziale, gli ioni viaggiano di moto rettilineo uniforme con velocità uguale a

$$\vec{v} = \frac{\vec{F}_E}{\gamma}$$

# La velocità di migrazione dipende:

- dal campo elettrico  $E$
- dalla carica della particella  $q$
- inversamente da forze d'attrito viscoso  $\gamma$

$$v = E q / \gamma$$

Se  $q \propto N$  e anche  $\gamma \propto N$ ,  $v$  risulta indipendente da  $N$  e l'elettroforesi non funziona!

A parità di “viscosità” del mezzo, la migrazione dipende dalla differenza di potenziale e dalla densità di carica. Si definisce **mobilità elettroforetica**:

$$\mu_e = v / E \quad [ \text{in m}^2/(\text{V s}) ]$$

pari dunque a  $\mu_e = q / \gamma$ .

# Relazione di Ferguson

- Molecole diverse migrano con velocità diversa secondo le rispettive mobilità
- Nel gel molecole grandi (PM maggiore), fanno maggiore attrito, hanno quindi minore  $\mu$ , quindi migrano molto più lentamente (e vanno meno lontano)
- Relazione tra mobilità e PM (quindi  $M$ ) non è lineare ma logaritmica
- Anche la relazione tra mobilità e concentrazione di gel è logaritmica:

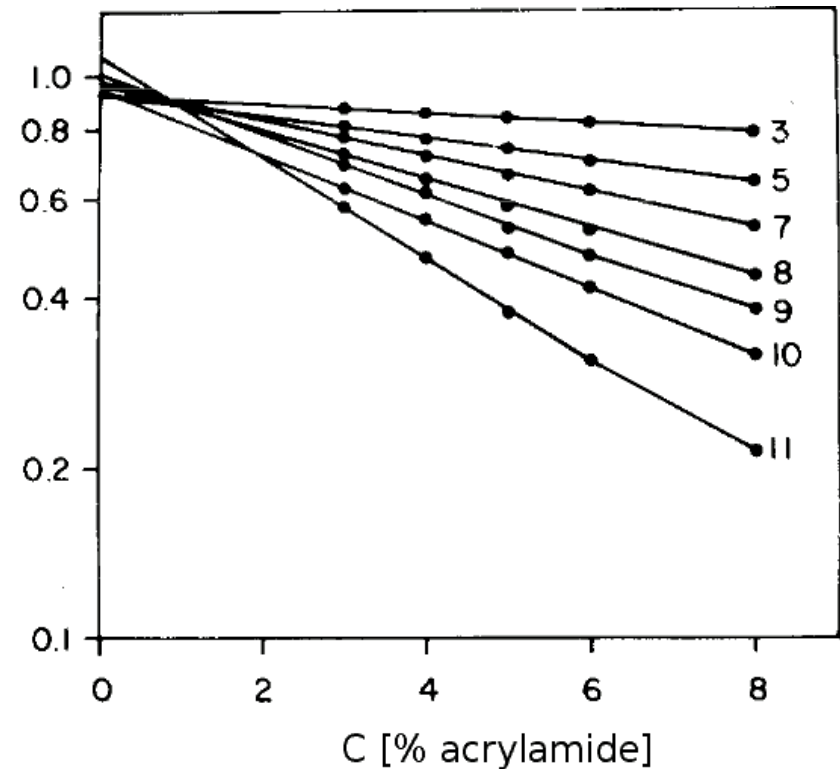
$$\log \mu = \log \mu_0 - K_R C$$

$\mu$  = mobilità relativa

$\mu_0$  = mobilità in fase libera

$C$  = concentrazione % del gel

$K_R$  = coefficiente di ritardo



# Riassumendo

- molecole diverse hanno diverse **dimensioni** e **carica elettrica**; l'attrito viscoso dipende fortemente dalla lunghezza  $N$ ; molecole diverse acquistano velocità differenti nello stesso campo  $E$
- gruppi di molecole uguali si separano dalle altre formando delle bande che si muovono lentamente verso uno degli elettrodi
- la distanza percorsa è proporzionale alla velocità di drift, che è maggiore per molecole più piccole grazie al gel
- l'elettroforesi serve quindi da setaccio molecolare per separare ioni molecolari in base alle dimensioni

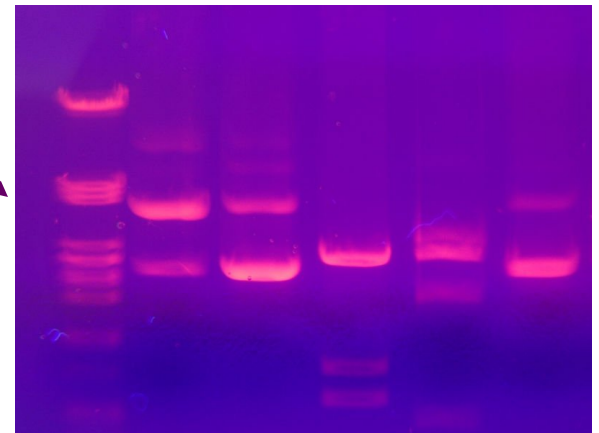
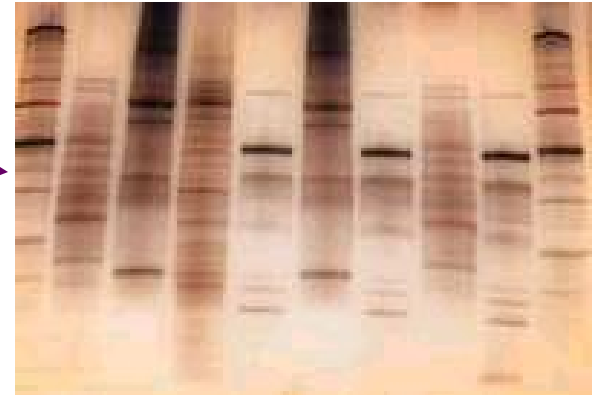
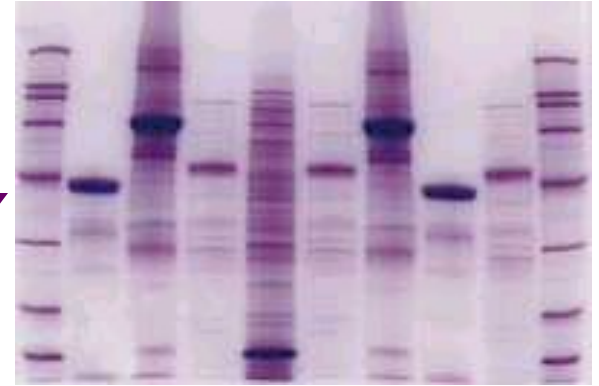
vedi: <http://learn.genetics.utah.edu/units/biotech/gel/>



# Rivelazione

## Coloranti

- Coomassie Blue (si lega alle proteine)
- Argento
- ethidium bromide (si lega al DNA e fluoresce in luce UV)



# Fattori determinanti la risoluzione

$d.d.p \propto E$  campo elettrico  $\propto$  migrazione

Aumento d.d.p  $\Rightarrow$  aumenta corsa elettroforetica  $\Rightarrow$

Aumenta corrente elettrica  $\Rightarrow$  aumento di calore per effetto Joule

## CONSEGUENZE

- Aumento velocità di **diffusione** casuale con formazione di bande meno definite
- Comparsa di correnti convettive che portano al mescolamento dei campioni separati
- Denaturazione dei campioni che sono instabili all'aumento della temperatura (necessità di sistemi di raffreddamento)
- Preferibile usare basse correnti (non troppo basse per prevenire l'allargamento delle bande causato dalla lenta diffusione)