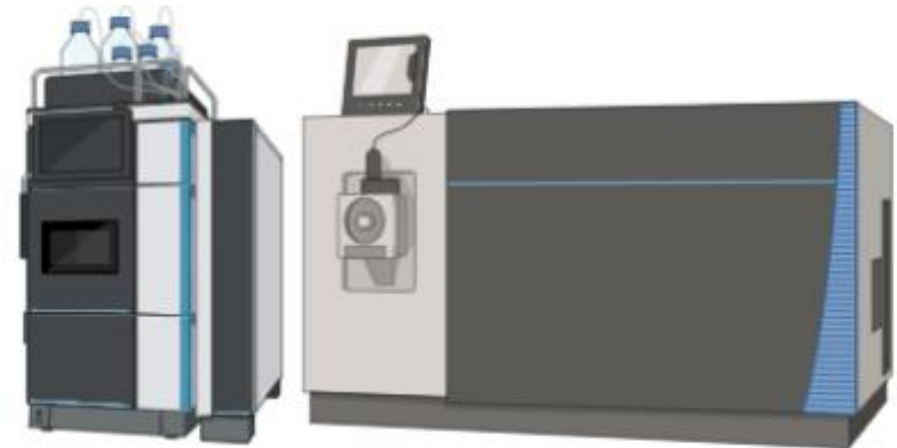
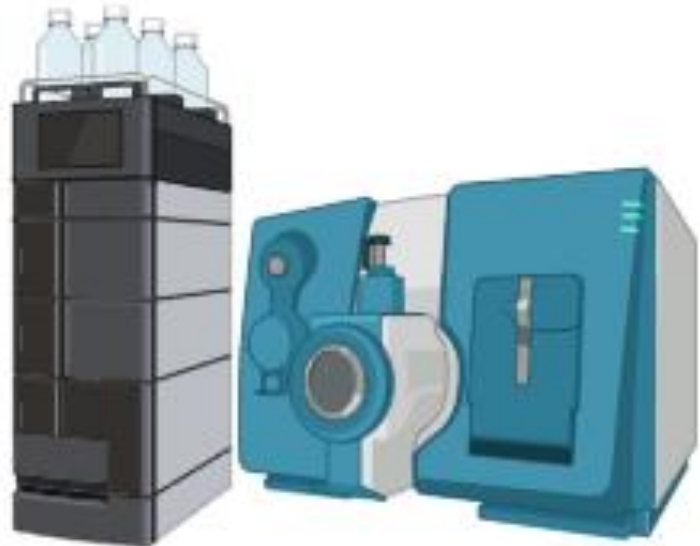


LC-MS/MS: Analisi Targeted, semi- untargeted e untargeted



Campione incognito



- Che campione è?
- Che tipo di pretrattamenti sono stati fatti?
- In che solvente si trova?
- Quali molecole devono essere rilevate?
- Quali informazioni devono essere ottenute?

Scopo del lavoro



Matrici alimentari



Analisi

Approcci aspecifici



Spettrofotometro



- ❖ Folin-Ciocalteu
- ❖ Contenuto di flavonoidi totali



Contenuto fenolico totale

Approcci specifici



➤ Gas cromatografia accoppiata con la spettrometria di massa (GC-MS)

➤ Cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) accoppiato con:

- UV-vis, Diode array detection (DAD)
- Mass spectrometry (MS)
- Tandem MS (MS/MS)

➔ LRMS



➔ Triple quadrupole (QqQ)

➔ **Analisi Targeted**



Uso di standard analitici di riferimento

➤ Cromatografia liquida ad altissime prestazioni (UHPLC) accoppiata con MS/MS

- TOF
- Orbitrap



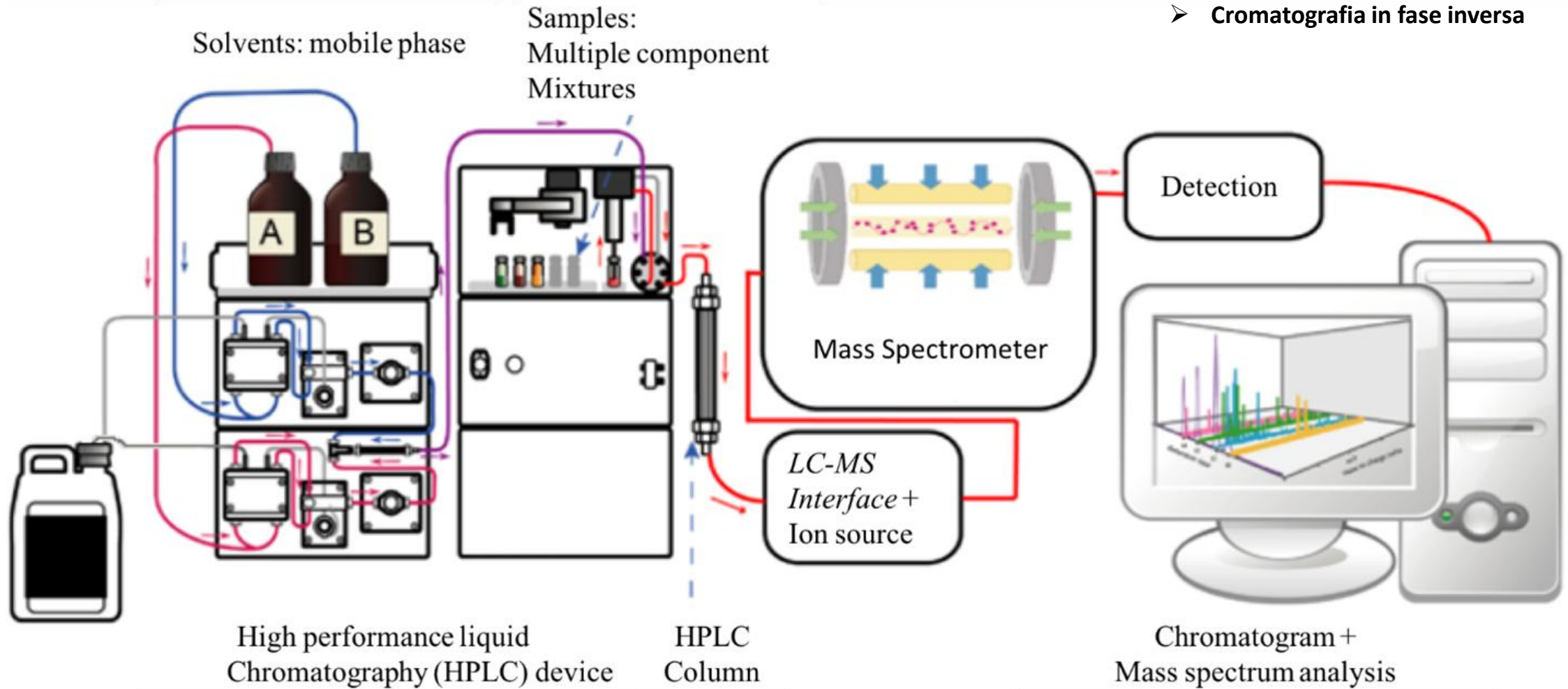
➔ HRMS



➔ **Analisi Untargeted**



HPLC-MS/MS



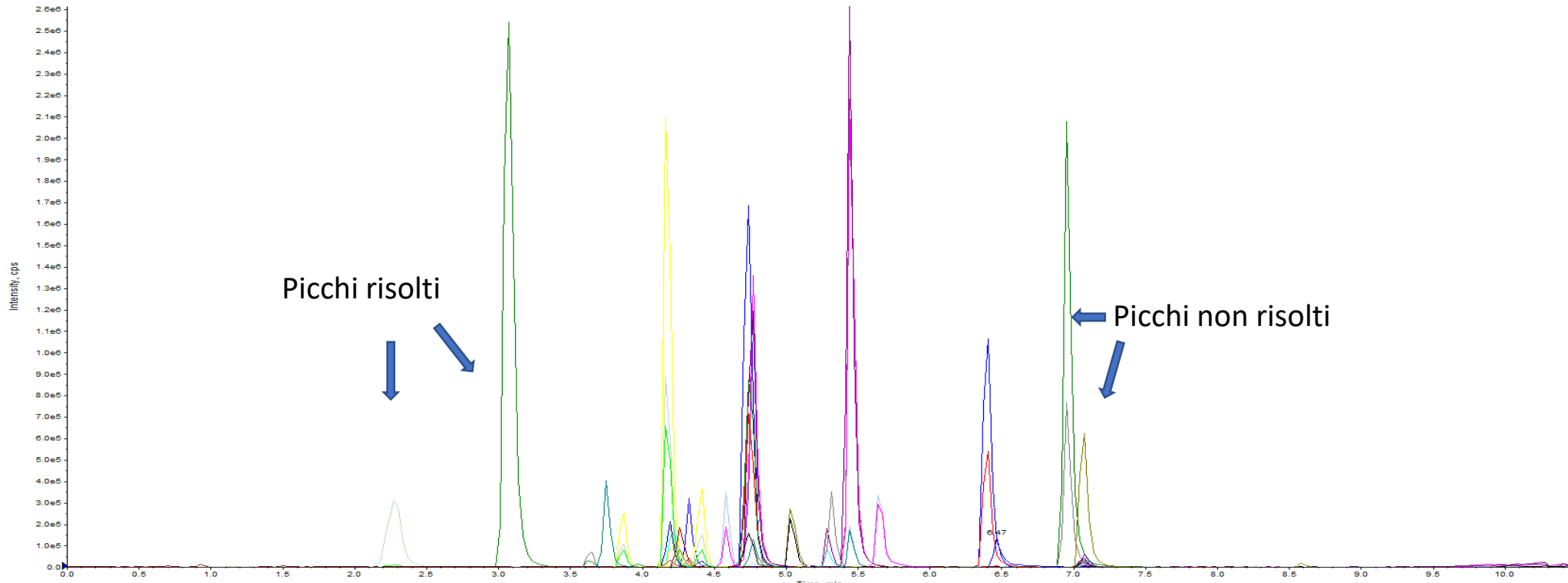
- **Cromatografia in fase diretta**
- **Cromatografia in fase inversa**

Cromatogramma

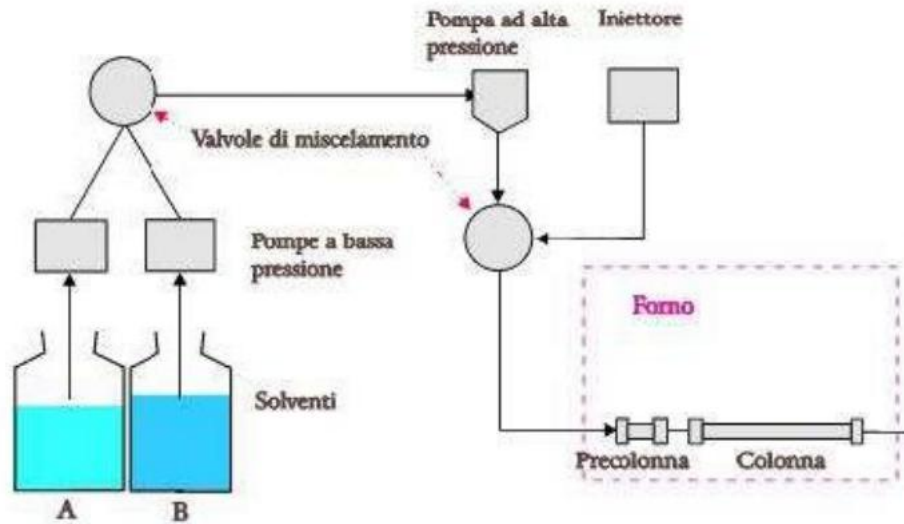
Un cromatogramma è una rappresentazione della separazione che ha avuto luogo a livello chimico [cromatografico] nel sistema HPLC. Viene tracciata una serie di picchi rispetto a una linea di base su un asse del tempo.

Come si ottiene il cromatogramma? È necessario un rivelatore!

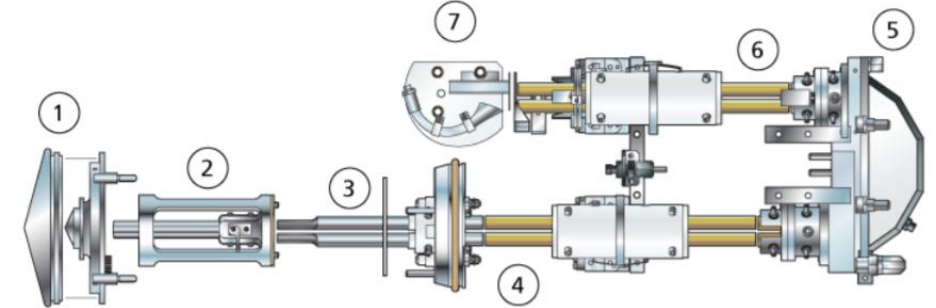
Ciascun picco rappresenta la risposta del **rivelatore** per un composto diverso. Il cromatogramma viene tracciato dalla workstation del computer



Interfaccia HPLC – Spettrometro di massa



Sorgente
Camera di ionizzazione



- Lavora a pressione atmosferica
- Elevata quantità di solvente in uscita (campione nello stato liquido)
- Lavora a 25-50° C



**Separazione degli analiti
presenti nella miscela di
campione**

- Lavora in condizioni di alto vuoto (10^{-5} - 10^{-7} torr)
- Lavora con ioni in fase gassosa
- Lavora a 100-350 °C
- Molto costosa



**Identificazione e
quantificazione degli analiti
analizzati**

Spettrometria di massa: Cos'è?

- La spettrometria di massa è una metodica che consente l'**identificazione** e la **quantificazione** di una molecola dalla sua massa/carica (m/z)
- Uno spettrometro di massa separa gli atomi o le molecole secondo uno dei principi indicati, ma per poter essere separati atomi e molecole **devono avere una carica**, devono cioè essere **ionizzate**. Inoltre, **devono essere allo stato gassoso**.

Tappe fondamentali del processo d'analisi:

1. ionizzazione delle molecole in esame, cioè la trasformazione in uno o più ioni, o con carica positiva o negativa (a seconda della natura degli analiti);
2. accelerazione degli ioni per immissione in un campo elettrico;
3. separazione degli ioni con massa diversa nell'analizzatore;
4. rivelazione dei diversi ioni formati e conseguente determinazione della loro massa.

Low Resolution Mass Spectrometry (LRMS) vs High Resolution Mass Spectrometry (HRMS)

LRMS

- può differenziare gli analiti con differenti rapporti m/z
- fornisce valori di massa con 1-2 decimali
- richiede un'adeguata preparazione del campione per ridurre le interferenze
- richiede l'uso di standard per identificare i composti presenti nei campioni (analisi targeted)

HRMS

- può differenziare gli analiti con la stessa massa nominale ma diversa composizione elementare
- fornisce valori di massa accurati con 4-6 decimali
- è in grado di rimuovere molte interferenze (specie isobariche) in base alla massa accurata e consente di semplificare le procedure di preparazione dei campioni
- identificazione dei composti residui
- alto potere di risoluzione, alta precisione e alta sensibilità
- consente l'identificazione di nuovi composti senza l'utilizzo di standard (analisi Untargeted)

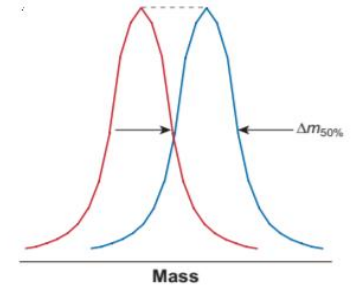
Risoluzione e Accuratezza

In uno spettro di massa due picchi adiacenti, di intensità simile, si considerano separati se l'altezza (h) della valle tra di loro è minore del 10% dell'altezza H del picco maggiore.

Il **potere risolutivo (R)** è quindi la **capacità di separare due picchi di massa diversa**:

$$R = \frac{m_2}{m_2 - m_1} = \frac{m_2}{\Delta m}$$

m_2 è il valore m/z maggiore
 m_1 quello minore



Gli analizzatori si considerano a **bassa risoluzione se R è < di 5.000** e ad **alta risoluzione se R è > di 5.000**.

All'aumentare del potere risolutivo dell'analizzatore aumenta l'**accuratezza** della misura che indica di quanto il valore di massa ottenuto o massa misurata si discosta dal valore reale o massa reale, indica cioè l'ampiezza dell'errore insito nella misurazione.

L'**accuratezza** si indica per convenzione come l'inverso del potere risolutivo

$$\text{Accuratezza} = \frac{m_1 - m_2}{m_2} = \frac{\Delta m}{m_2}$$

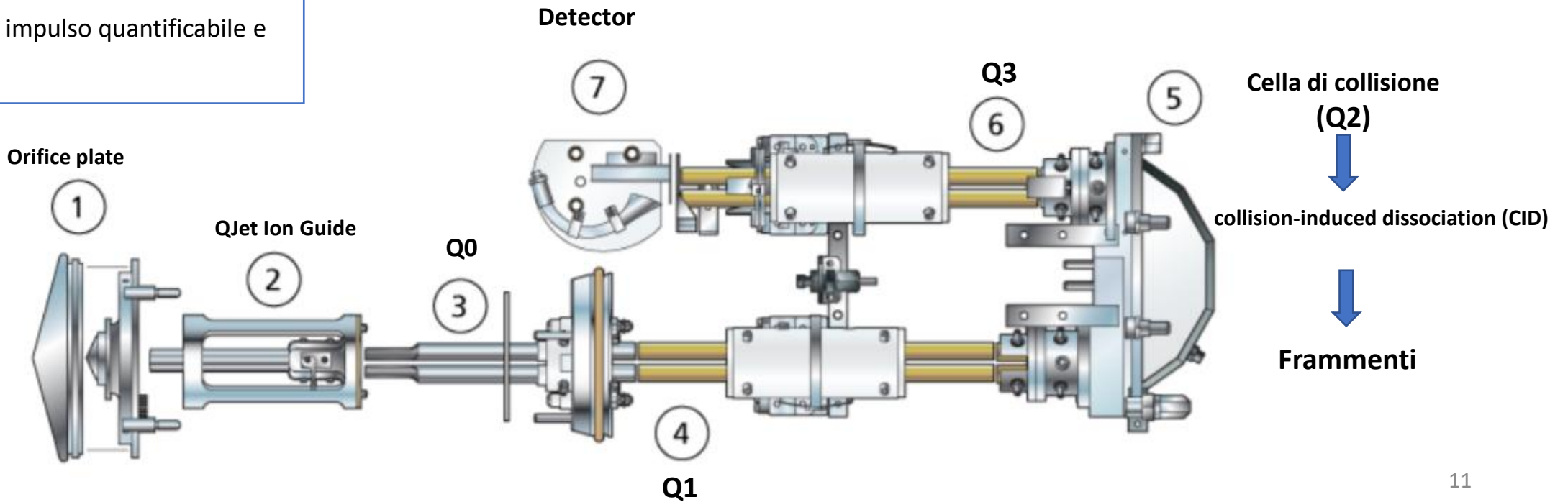
m_1 il valore di massa misurata
 m_2 il valore di massa esatta

Per determinare l'accuratezza di un'analisi si effettuano una serie di analisi eseguite nello stesso contesto sperimentale, va effettuata una calibrazione con una molecola di cui si conosce la massa esatta.

Spettrometro di massa

Componenti fondamentali:

1. camera di ionizzazione per produrre ioni;
2. un campo elettrico per accelerare gli ioni prodotti;
3. un analizzatore di massa, che utilizzando un campo magnetico e/o un campo elettrico, separa gli ioni di massa diversa (m/z);
4. un rivelatore, che raccoglie gli ioni generando un impulso quantificabile e registrabile.



Sorgente dello spettrometro di massa: Ionizzazione

Il pre-requisito fondamentale per l'analisi mediante spettrometria di massa è la formazione di ioni di campione in fase gassosa (Ionizzazione), che avviene in **SORGENTE**.

La ionizzazione si divide in tecniche «*hard*» e «*soft*» in base all'energia utilizzata.

Le nuove tecniche permettono di lavorare sia con campioni in fase liquida che inglobati in una matrice solida.

Il campione, che può essere solido, liquido o gassoso, viene introdotto in una camera da vuoto mediante un opportuno sistema di introduzione (ad esempio HPLC).

GC-MS

Tipologie di ionizzazione (più utilizzata) per GC:

➤ **Tecniche Hard (distruttive):**

- Electron Impact ionization (EI)

VS

LC-MS

Tipologie di ionizzazione (più utilizzate) per HPLC:

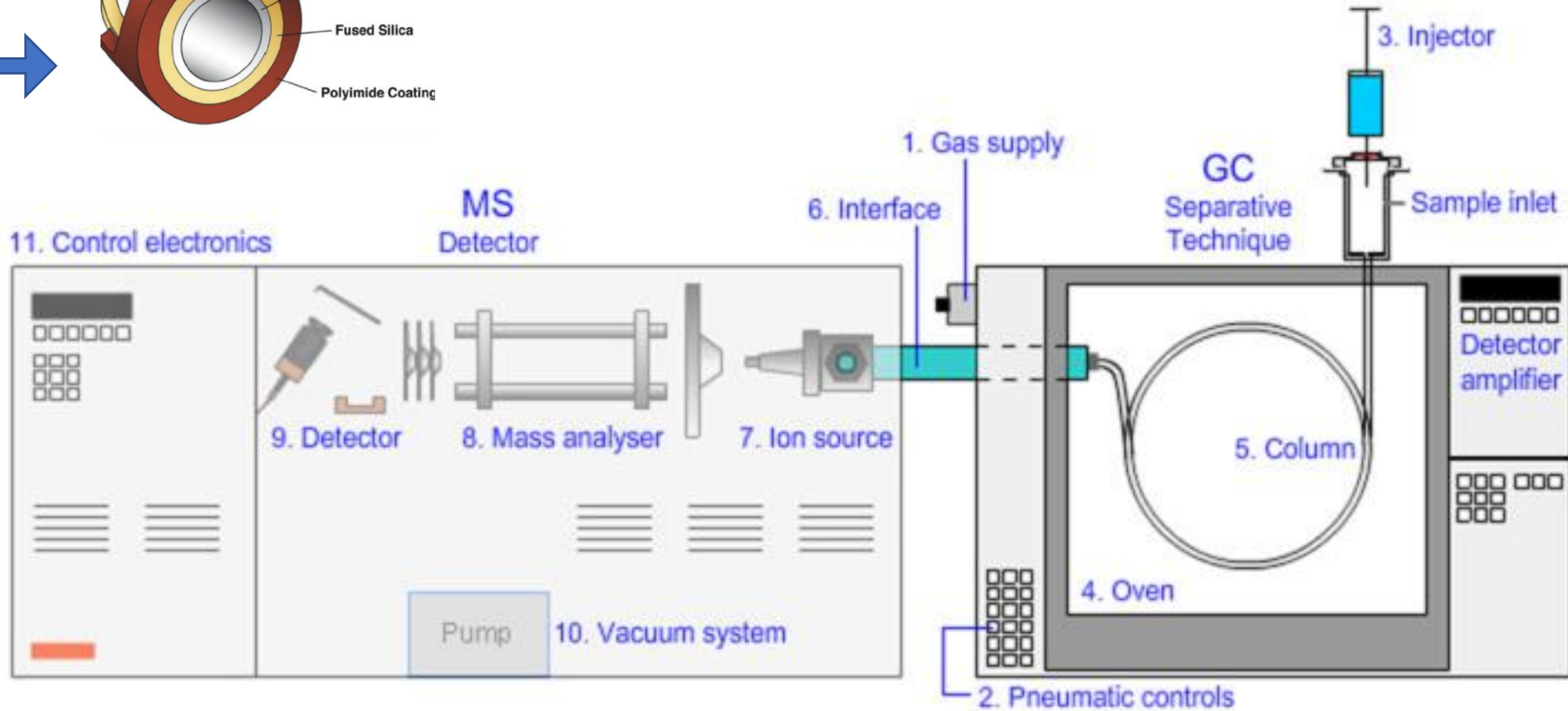
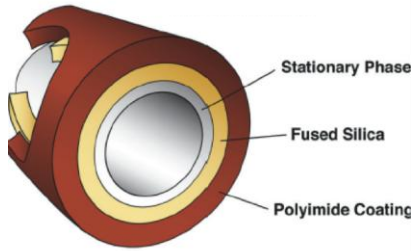
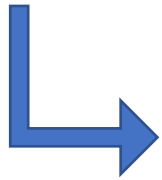
➤ **Tecniche Soft:**

- **Interfacce atmospheric pressure ionization (API):**
 1. ElectroSpray Ionization (**ESI**)
 2. Atmospheric Pressure chemical Ionization (**APCI**)

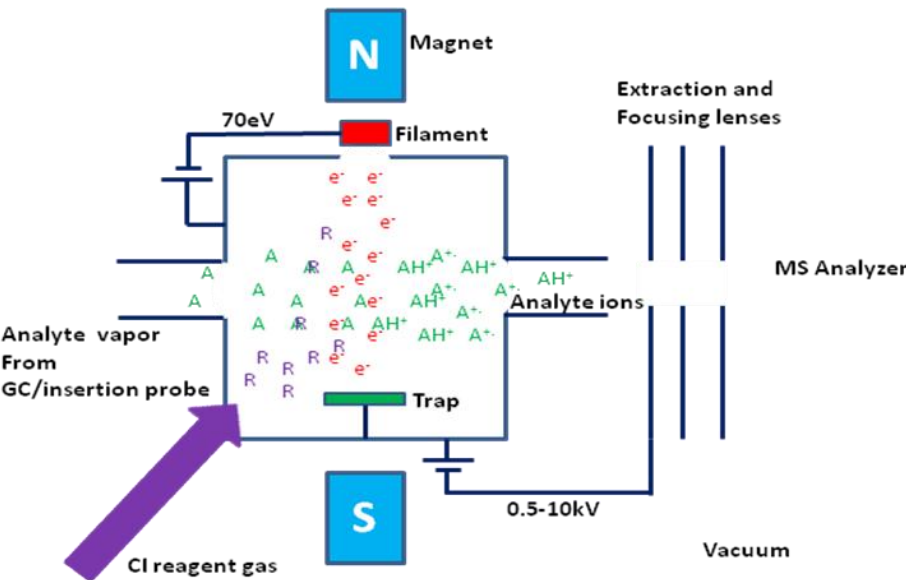
GC-MS



Column GC

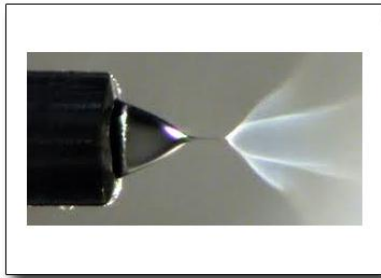
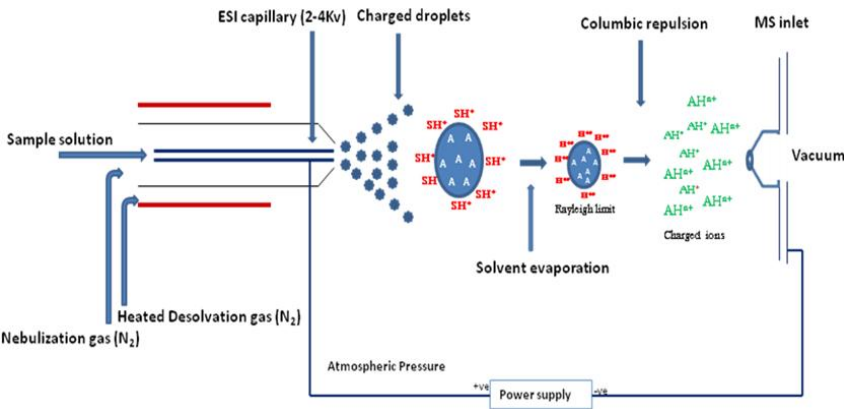


Modalità di ionizzazione: EI (Electron Impact ionization)



- La ionizzazione avviene volatilizzando un campione direttamente nella sorgente, che si trova in un sistema di vuoto, direttamente fissata all'analizzatore.
- La molecola (neutra) è ionizzata per bombardamento con un fascio di elettroni formato riscaldando una polarizzazione del filamento ad una tensione negativa rispetto alla sorgente.
- Un elettrone colpisce una molecola neutra, rimuovendo un elettrone dalla struttura e producendo un catione radicale, detto **ione molecolare**, che mantiene una addizionale energia residua. Questa energia residua, attraverso vibrazioni, rotazioni e riarrangiamenti molecolari, produce la **frammentazione della molecola**.
- Il **pattern di frammentazione** è specifico e caratteristico per ogni molecola ed è usato per il **fingerprinting** della sostanza analizzata.
- Lo ione, sotto l'effetto di un potenziale elettrico, raggiunge l'analizzatore.
- È una tecnica robusta e riproducibile.

Modalità di ionizzazione: ESI (ElectroSpray Ionization)



Adatto per l'analisi di biomolecole,
farmaci e composti organici complessi.

- L'**Electrospray Ionization (ESI)** è una tecnica di ionizzazione, basata sulla **nebulizzazione di un campione liquido** seguita dalla **generazione di ioni** a partire dalle goccioline cariche. Il processo avviene a pressione atmosferica e permette di ottenere **ioni in fase gassosa** senza un'eccessiva frammentazione.
- Il liquido (campione) viene fatto passare attraverso un **capillare sottile** con un debole flusso (circa **1-10 $\mu\text{L}/\text{min}$**) e sottoposto a un **forte campo elettrico (2-5 kV)** tra il capillare e un contro-elettrodo posto a distanza.
- L'azione del campo elettrico induce l'**accumulo di carica** sulla superficie del liquido alla punta del capillare, deformandolo fino a formare un **cono di Taylor**, da cui si staccano le prime **goccioline cariche** (dette di "prima generazione").
- Le goccioline cariche contengono sia **solvente**, sia **analiti**. Man mano che evaporano e si rimpiccioliscono (gocce figlie), la densità di carica aumenta fino a un punto critico in cui la repulsione tra cariche uguali supera la tensione superficiale della gocciolina, provocandone la **esplosione coulombiana**. Questo processo avviene in più fasi, con la formazione di goccioline sempre più piccole, che portano gradualmente alla **liberazione degli ioni molecolari desolvati** in fase gassosa.
- Gli **ioni desolvati** vengono guidati da un sistema di **fenditure e lenti elettrostatiche** in una zona a bassa pressione, dove vengono **accelerati e focalizzati** prima di entrare nell'**analizzatore dello spettrometro di massa**, che ne determina il rapporto massa/carica (**m/z**).

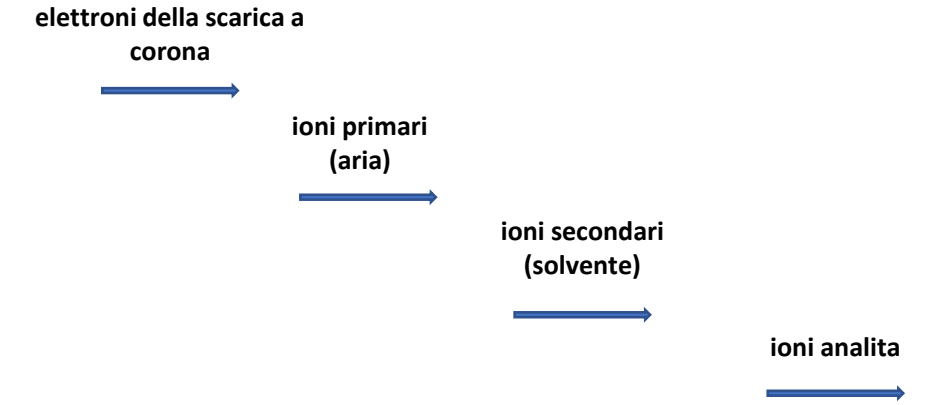
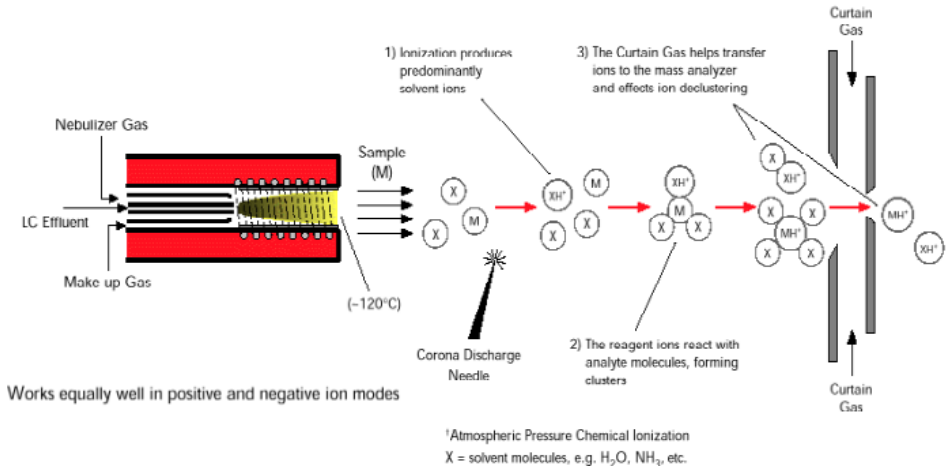
Modalità di ionizzazione: APCI (Atmospheric-pressure chemical ionization)



La sorgente serve a volatilizzare e ionizzare il campione

L'analizzatore serve a misurare il rapporto m/z degli ioni prodotti

Il detector serve a rivelare gli ioni che arrivano dall'analizzatore



- L'APCI è una tecnica di ionizzazione, particolarmente efficace per analizzare composti **meno polari** e **più volatili** rispetto all'ESI. Come l'ESI, opera a **pressione atmosferica**, ma il meccanismo di ionizzazione è differente, poiché si basa su reazioni chimiche in fase gassosa.
- Il campione liquido viene iniettato attraverso un capillare e **nebulizzato** in un flusso di gas (solitamente azoto).
- Il gas trasporta il campione nebulizzato in un riscaldatore (generalmente a 250-500°C), che evapora completamente il solvente e le molecole analizzate, trasformandole in fase gassosa.
- Un ago a scarica corona (elettrodo ad alta tensione, circa 3-5 kV) genera una scarica elettrica nel gas di trasporto, producendo ioni reagenti (come O₂⁺, N₂⁺, H₃O⁺).
- Gli ioni reagenti trasferiscono la carica alle molecole del campione attraverso reazioni di trasferimento di protoni o di scambio di carica, portando alla formazione degli ioni analiti.
- Gli ioni generati vengono poi guidati attraverso una serie di lenti elettrostatiche e aiutati da un **Curtain Gas**, verso l'analizzatore dello spettrometro di massa, dove vengono analizzati in base al loro rapporto m/z .

Analizzatori



Negli spettrometri di massa la funzione degli analizzatori è quella di **separare gli ioni in base al rapporto massa/carica (m/z)**. Gli ioni con differente m/z arriveranno al rivelatore in tempi diversi, aparendo nello spettro a tempi differenti. Così come per le sorgenti di ionizzazione, la tecnologia in questo settore ha sviluppato vari tipi di analizzatori, dotati di caratteristiche diverse, ma con performance sempre maggiori.

Gli analizzatori possono essere classificati in base al modo in due gruppi:

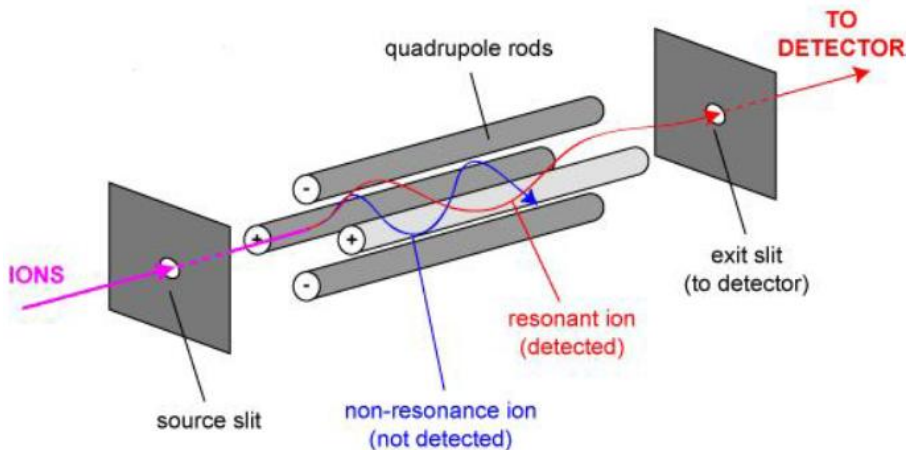
Analizzatori statici:

- settori magnetici a semplice o doppia focalizzazione; (originariamente i campi elettrici e magnetici venivano mantenuti costanti rispetto al tempo). Sono noti anche come analizzatori di quantità di moto.

Analizzatori dinamici: a loro volta possono essere suddivisi in diversi sottogruppi:

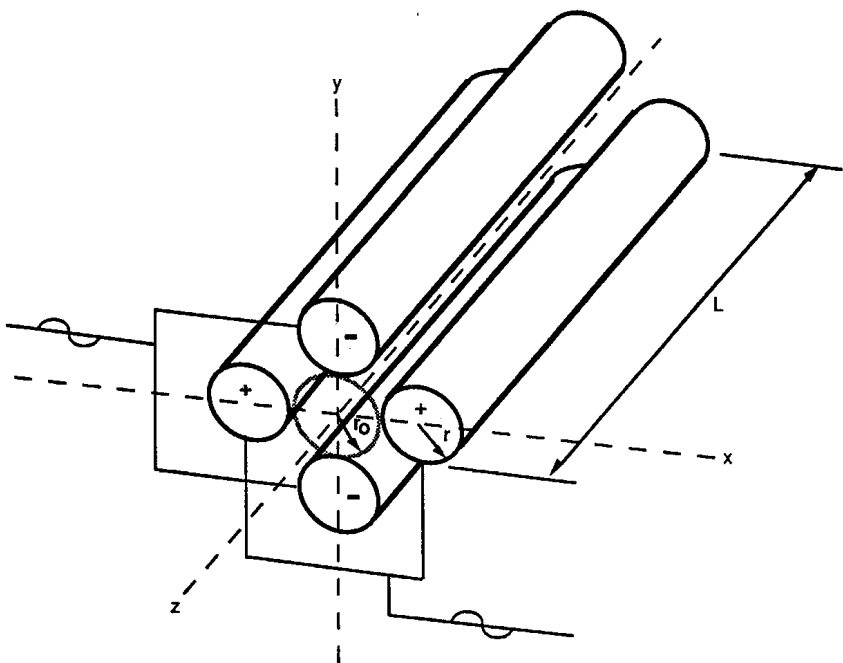
- analizzatori a stabilità di percorso (quadrupolo)
- analizzatori a tempo di volo (TOF=Time Of Flight)
- analizzatori a trappola ionica (ion trap e FT-ICR= Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance)

Analizzatore: Quadrupolo



- L'analizzatore a quadrupolo consiste in un tubo rettilineo in cui sono presenti quattro barre di metallo parallele (in condizione di alto vuoto **10^{-5} - 10^{-6} torr**), disposte simmetricamente intorno all'asse del tubo, di sezione circolare oppure iperbolica.
- Le barre diametralmente opposte sono collegate elettricamente tra loro: una coppia al polo positivo e l'altra al polo negativo.
- Le barre opposte sono in contatto elettrico tra di loro, mentre tra barre adiacenti è applicata un voltaggio formato da due componenti: una **corrente continua** e una **corrente alternata**.
- Lo ione con carica (+) (oppure -), entra nel quadrupolo muovendosi lungo l'asse z.
- Lo ione viene attratto dalle barre a potenziale negativo (o positivo se è un anione) e respinto da quelle positive, cambiando traiettoria e continuando il suo moto verso l'uscita del quadrupolo (ioni con **traiettoria stabile**).
- Gli ioni con traiettoria **instabile** andranno a collidere con le barre del quadrupolo e non raggiungeranno il detector

Funzionamento del quadrupolo



- La combinazione tra la corrente continua e la corrente alternata rende stabile la traiettoria di un particolare ione (identificato da uno specifico rapporto m/z).
- A determinati valori della tensione applicata, solo ioni aventi un certo rapporto massa su carica (m/z) usciranno dal quadrupolo stesso.
- Variando nel tempo le combinazioni di corrente continua e la corrente alternata si può passare da un'area di stabilità all'altra, permettendo il passaggio di ioni a crescente m/z . Ottenendo uno spettro di massa.

Un quadrupolo funziona come un filtro di massa a banda stretta

Trasmette soltanto gli ioni entro un limitato intervallo di valori m/z

Variando la corrente continua e la corrente alternata, tutti gli ioni saranno messi in condizione di uscire (a tempi diversi) dal quadrupolo.

La risoluzione di questi analizzatori generalmente è nell'ordine di 5-10.000.

Spettrometria di massa tandem (MS/MS):

Dissociazione attivata mediante collisioni (CAD)

Le sorgenti di ionizzazione soft producono abbondanti ioni, ma **scarsa frammentazione**, portando a un minor numero di informazioni per l'identificazione dei composti incogniti.

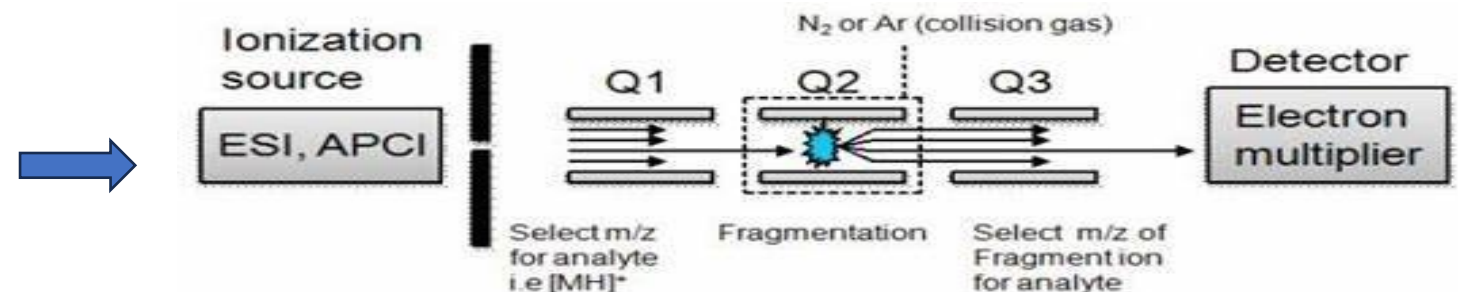
La spettrometria di massa tandem (MS/MS) permette di selezionare lo ione d'interesse e generare frammenti caratteristici, mediante una o più collisioni un gas neutro (N_2 o Ar), chiamata **Dissociazione Attivata da Collisione (CAD, Collision-Activated Dissociation)**.

Nel processo di collisione, una frazione dell'energia cinetica dello ione è trasformata in energia interna, determinandone la dissociazione in vari frammenti; l'estensione della frammentazione dipende dal contenuto totale di energia interna dello ione eccitato.

Ci sono due principali categorie di strumenti che permettono esperimenti MS/MS.

1. **spettrometri tandem nello spazio**, i primi ad essere ideati, all'inizio per assemblaggio sequenziale di due analizzatori a settore e successivamente di tre quadrupoli (**triplo quadrupolo**), **time-of-flight (TOF)** o loro combinazioni (**ibridi quadrupolo settore e quadrupolo-TOF**).
2. **spettrometri tandem nel tempo**, in cui la selezione dello ione e la sua dissociazione avvengono entro lo stesso spazio ma in tempi successivi; strumenti di questo tipo sono la **trappola ionica lineare** e la **trappola ionica a risonanza di ciclotrone**.

Attualmente lo spettrometro di massa tandem più utilizzato è il **triplo quadrupolo (QqQ)** costituito da un Q1, Q2 (cella di collisione) e Q3

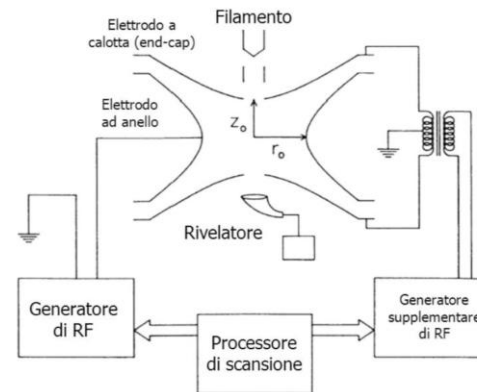


Analizzatori a trappola ionica

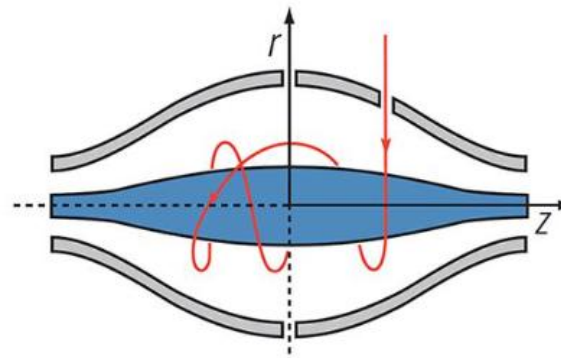
Una trappola ionica è un dispositivo in cui ioni gassosi possono essere trattieneuti nel suo interno per prolungati periodi di tempo mediante l'applicazione di campi elettrici e/o magnetici.

Sono state studiate diversi tipi di trappole, ma quelle più comuni sono tre:

1. trappola ionica lineare (più semplice):



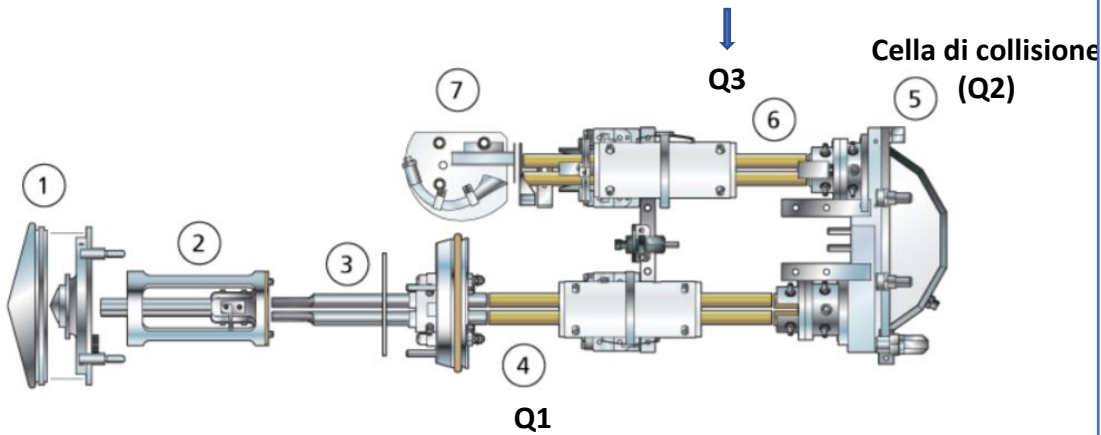
1. Trappola ionica orbitale (Orbitrap):



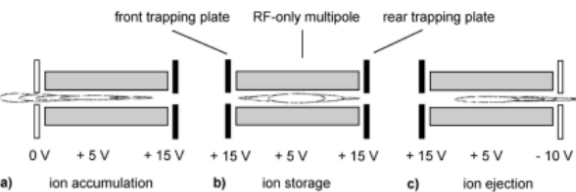
2. trappola ionica a risonanza di ciclotrone (più complessa)

Analizzatore a trappola ionica lineare (LIT)

linear ion trap (LIT)



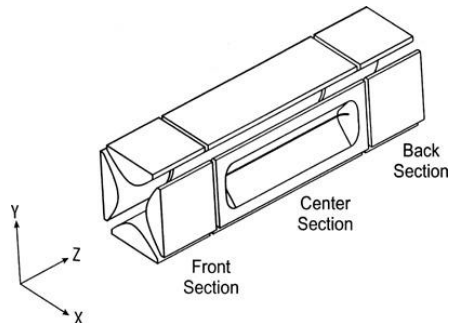
espulsione assiale



gli ioni vengono espulsi dalle estremità della trappola, generando un potenziale attrattivo

espulsione radiale

gli ioni vengono espulsi attraverso una fenditura applicando una corrente alternata all'elettrodo, verso il rivelatore



- Una trappola ionica è un dispositivo che utilizza un **campo elettrico oscillante** per immagazzinare ioni in uno spazio confinato detto "trappola". Può essere integrata in uno spettrometro di massa a **triplo quadrupolo (QqQ)**. Questa combinazione offre maggiore sensibilità e versatilità nelle analisi **MS/MS** e **tandem in tempo reale**.
- **La LIT è costituita da quattro elettrodi paralleli che generano un campo elettrico quadrupolare per confinare gli ioni nello spazio.** Il confinamento avviene in due direzioni: **Radiale** (perpendicolare all'asse), grazie a un potenziale oscillante RF applicato agli elettrodi quadrupolari; **Assiale** (lungo l'asse), tramite elettrodi di estremità che creano una barriera di potenziale. Così, gli ioni vengono intrappolati nella LIT e rimangono sospesi senza toccare le pareti dell'analizzatore.
- Una volta intrappolati, gli ioni possono essere analizzati in base al rapporto massa/carica (m/z).
- Per farlo, si applica un potenziale oscillante RF variabile. A seconda della frequenza del campo elettrico, alcuni ioni diventano instabili e vengono espulsi sequenzialmente dalla trappola. Ci sono due tipi di espulsione, in base alla progettazione della LIT: espulsione assiale o radiale (tipico delle LIT ibride).
- Gli ioni vengono inviati al rivelatore, che misura l'intensità del segnale per ogni valore di m/z . Il risultato è uno spettro di massa, che mostra i diversi ioni presenti nel campione.
- Nel caso di analisi MS/MS, gli ioni frammentati vengono immagazzinati temporaneamente nella LIT. Una volta raccolti, vengono rilasciati selettivamente e analizzati con una maggiore sensibilità.

Rivelatori (Detector)



Il detector converte l'energia cinetica delle particelle in arrivo in segnale elettrico.

Senza un sistema di rivelazione adatto, l'informazione portata da sorgenti ed analizzatori non potrebbe essere registrata.

La maggioranza dei rivelatori funzionano ad impatto ionico o per cattura ionica. Tutti i tipi di rivelatori richiedono una superficie che raccolga gli ioni e dove la carica venga neutralizzata sia per la raccolta sia per donazione di elettroni.

Nel rivelatore gli ioni generano un segnale elettrico proporzionale al numero di ioni presenti. Il sistema di elaborazione dati registra questi segnali elettrici in funzione del rapporto m/z e li converte in uno spettro di massa.

Le caratteristiche di un rivelatore HPLC ideale sono:

- Sensibilità adeguata al problema
- Buona stabilità e riproducibilità
- Risposta lineare al soluto, possibilmente per parecchi ordini di grandezza
- Tempi di risposta rapidi
- Risposta verso tutti i soluti, oppure risposta selettiva verso una o più classi di soluti

I rivelatori per HPLC più comuni sono quelli ad: "assorbimento UV", "fluorescenza", "conduttimetrico", "spettrometro di massa", "indice di rifrazione", "elettrochimico" e "assorbimento IR".

NB: NON esiste un rivelatore per HPLC universale!

Rutina: 609.0 m/z

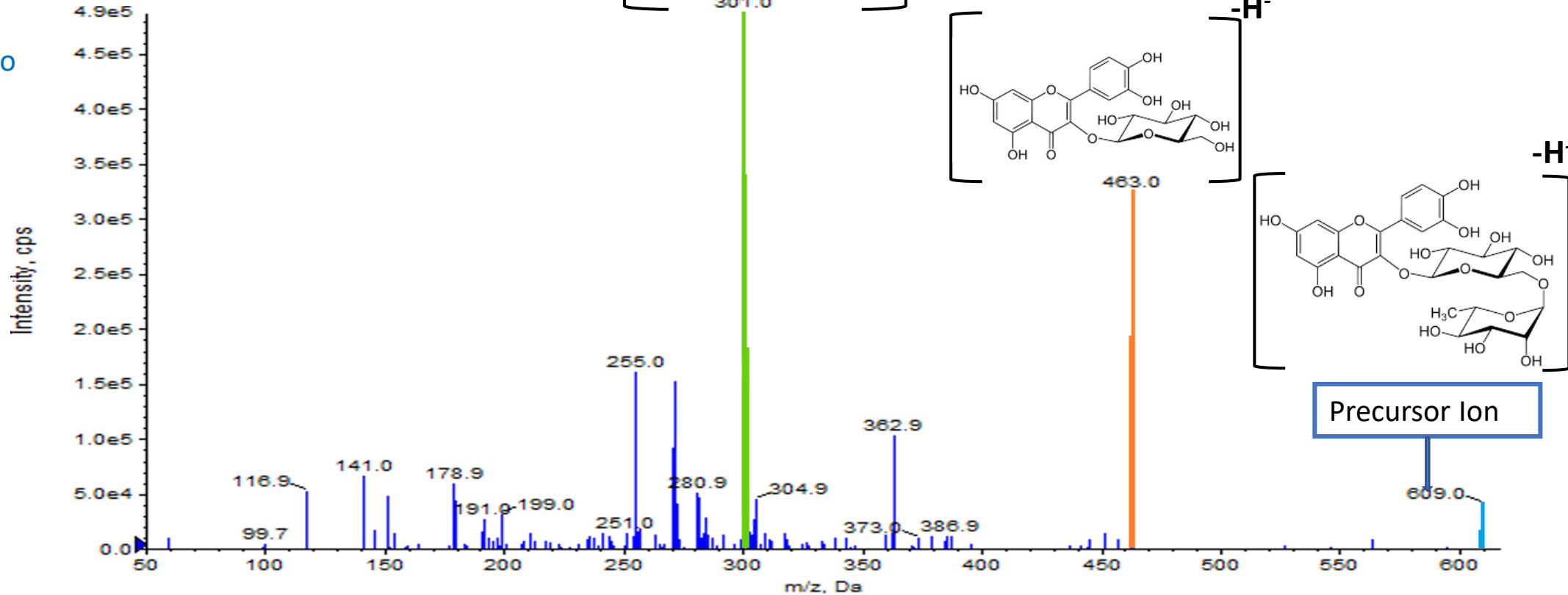
Spettro di frammentazione (MS/MS)

Aglicone:
Quercetina
301 m/z

Glicoside:
Rutinosio

463 m/z

Legame
glicosidico



Parametri spettrometro di massa

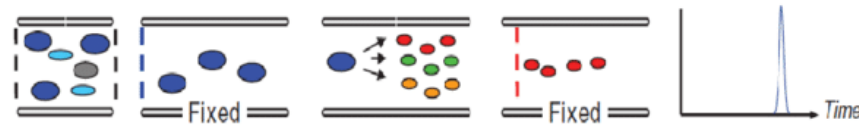
Infusione dello standard analitico in sorgente dello spettrometro di massa MS/MS

ID	Q1	Dp	Ep	Q3	CE	CXP	ID	Q1	Dp	Ep	Q3	CE	CXP	ID	Q1	Dp	Ep	Q3	CE	CXP
Epicatechin/Catechin	288,9	-85,0	-8,0	245,0	-24,0	-9,0	Vanillic Acid	167,1	-49,0	-11,0	107,9	-28,5	-5,0	3/4-OH-Benzoic Acid	136,9	-12,0	-9,0	89,0	-15,5	-6,0
				108,9	-38,5	-8,0					151,9	-19,5	-6,5					66,0	-30,0	-10,0
Ferulic Acid	192,8	-63,0	-11,0	134,0	-21,0	-8,0	Apigenin	268,9	-110,0	-4,0	116,9	-50,0	-9,0	Trans-Cinnamic Acid	147,2	-50,0	-8,0	102,9	-16,0	-4,0
				177,8	-18,0	-6,0					151,0	-34,0	-5,0					77,2	-30,0	-6,0
Gallic Acid	168,9	-70,0	-10,5	124,9	-21,0	-9,0	Myricetin	316,9	-115,0	-5,0	150,9	-34,0	-6,0	Orientin (Luteolin-8-Glucoside)	447,1	-105,0	-11,0	356,9	-29,0	-11,0
				96,9	-26,0	-6,0					136,9	-36,0	-9,5					297,0	-43,0	-11,0
o-Coumaric Acid	163,0	-50,0	-5,0	119,0	-19,0	-8,0	Luteolin	284,9	-100,0	-8,0	150,9	-35,0	-11,0	Hyperoside (Querc-3-D-Galactoside)	462,9	-110,0	-5,0	300,9	-48,0	-10,0
				117,0	-33,0	-7,0					199,0	-35,0	-6,0					299,9	-40,0	-11,0
p-Coumaric Acid	162,8	-60,0	-5,0	119,0	-20,0	-9,0	Trans 3OH Cinnamic Acid (m-coumaric acid)	163,1	-50,0	-6,0	118,9	-19,0	-9,0	Tyrosol	137,0	-65,0	-9,0	119,0	-21,0	-8,5
				116,7	-42,0	-9,0					117,0	-33,0	-7,0					106,9	-23,0	-5,5
Quercetin	300,9	-94,0	-10,0	151,0	-30,0	-6,0	Kampferol	285,0	-135,0	-7,0	228,8	-40,0	-9,0	(-)-Epigallocatechin	305,0	-98,0	-6,5	136,9	-36,0	-10,0
				178,8	-26,0	-6,0					159,0	-42,0	-6,0					166,9	-28,5	-6,5
Caffeic Acid	178,8	-60,0	-10,0	133,8	-33,0	-7,0	Isoquercitrin (Querc-3-b-D-Glucoside)	463,0	-100,0	-9,0	300,9	-33,0	-11,0	(-)-Epigallocatechin Gallato	457,2	-10,0	-7,0	168,8	-20,0	-17,0
Rosmarinic Acid	359,0	-78,0	-4,5	160,8	-24,0	-7,0					270,9	-58,0	-10,0					190,9	-25,5	-6,5
Rutin	609,2	-100,0	-6,0	300,9	-45,0	-11,0	Chlorogenic Acid	353,1	-60,0	-7,0	160,9	-35,0	-6,0	OH-Tyrosol	152,9	-75,0	-7,0	122,9	-22,0	-8,0
				254,7	-70,0	-9,0					255,8	-40,0	-9,0					104,6	-30,0	-7,0
Siringic Acid	196,9	-57,0	-11,0	181,9	-19,0	-6,0	Diosmetin (Luteolin-4-methyl ether)	299,1	-90,0	-6,0	150,9	-40,0	-10,0							
				120,9	-22,0	-8,0					Oleuropein	539,2	-55,0	-10,0	275,0	-32,0	-9,0			

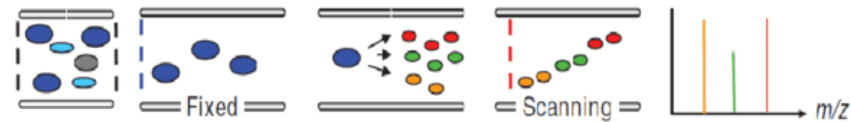
- **Declustering Potential (DP):** Il parametro DP controlla il voltaggio applicato all'orifizio che controlla la capacità di separare i cluster di ioni tra l'orifizio e la guida ionica QJet . È impiegato per ridurre al minimo i cluster di solvente che possono restare sugli ioni campione dopo che questi entrano nella camera del vuoto e, se necessario, per frammentare gli ioni. Maggiore sarà la tensione, maggiore sarà l'energia impartita agli ioni. Se il parametro è impostato su un valore troppo alto, potrebbe verificarsi una frammentazione indesiderata.
- **Entrance Potential (EP):** Il parametro EP è il potenziale in entrata che guida e focalizza gli ioni attraverso l'alta pressione applicata alla regione Q0.
- **Collision Energy (CE):** Il parametro CE controlla la differenza di potenziale tra la regione Q0 e la camera di collisione Q2. È usato solo nelle scansioni di tipo MS/MS. Questo parametro corrisponde alla quantità di energia che gli ioni precursori ricevono quando sono accelerati nella camera di collisione Q2, dove collidono con le molecole di gas e i frammenti.
- **Collision Cell Exit Potential (CXP):** Il parametro CXP è impiegato solo nelle scansioni di tipo Q3 e MS/MS. Questo parametro trasmette gli ioni nel quadrupolo Q3. 25

Tipi di scansione nel triplo quadrupolo

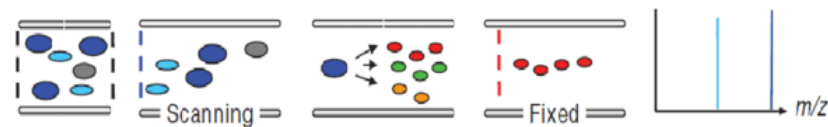
MRM (MRM): una scansione MS/MS in cui uno ione selezionato dall'utente passa attraverso il quadrupolo Q1 e viene frammentato nella camera di collisione Q2. Il quadrupolo Q3 quindi seleziona lo ione frammento che entra nel rivelatore. Questa modalità di scansione è usata prevalentemente per la **quantificazione**.



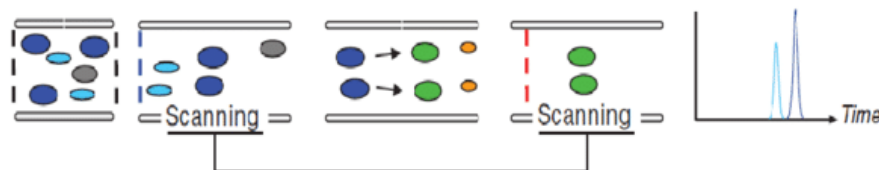
Product Ion (MS2): una scansione MS/MS completa dove il quadrupolo Q1 è impostato per trasmettere un determinato ione precursore e il quadrupolo Q3 effettua una scansione su un intervallo di massa definito. È usato per **identificare** tutti i prodotti di un determinato ione precursore.



Precursor Ion (Prec): una scansione MS/MS dove il quadrupolo Q3 è impostato a un determinato rapporto massa/carica per trasmettere uno ione prodotto specifico e il quadrupolo Q1 scansiona un determinato intervallo di massa. È impiegata per verificare la presenza di uno ione precursore, o più comunemente **per identificare i composti che condividono uno stesso ione prodotto**.



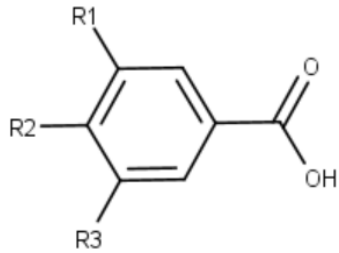
Neutral Loss (NL): una scansione MS/MS nella quale sia il quadrupolo Q1 che il quadrupolo Q3 effettuano una scansione su un intervallo di massa, mantenendo una differenza di massa prefissata. Si osserva una risposta se lo ione selezionato dal quadrupolo Q1 si frammenta perdendo il frammento neutro specificato (la massa prefissata). È impiegata per verificare la presenza di uno ione precursore, o più comunemente per identificare i composti che condividono una **perdita neutra** comune.



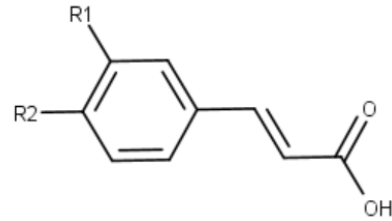
Applicazione: Polifenoli

Phenolic Acids C₆-C₁

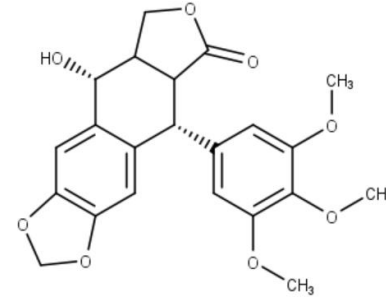
Hydroxybenzoic Acid



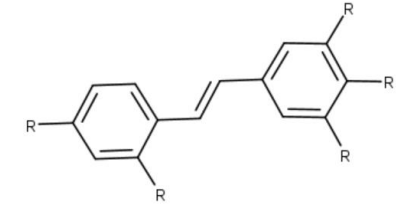
Hydroxycinnamic Acid



Lignans C₂₂H₂₂O₈

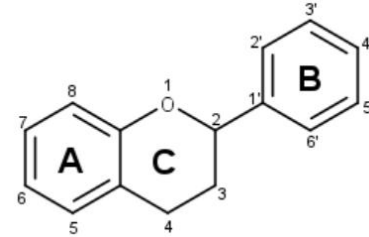
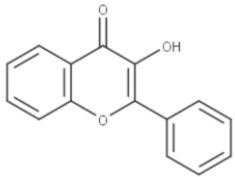


Stilbenes C₁₄H₁₂

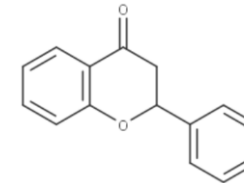


Flavanoids C₆-C₃-C₆

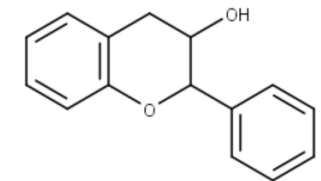
Flavonols C₁₅H₁₀O₃



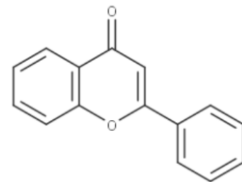
Flavanones C₁₅H₁₂O₂



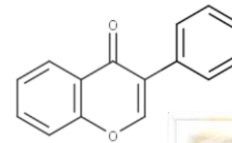
Flavan-3-ols C₁₅H₁₄O₂ (Catechines and Proantocyanidines)



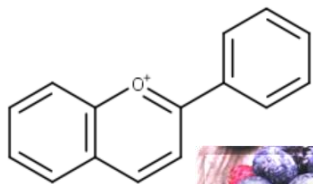
Flavones C₁₅H₁₀O₂



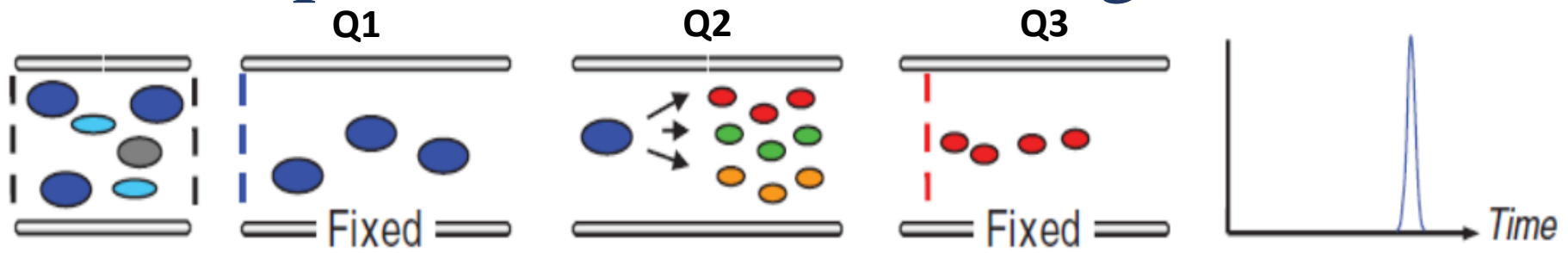
Isoflavones C₁₅H₁₀O₂



Anthocyanidin C₁₅H₁₁O⁺



Multiple Reaction Monitoring (MRM)

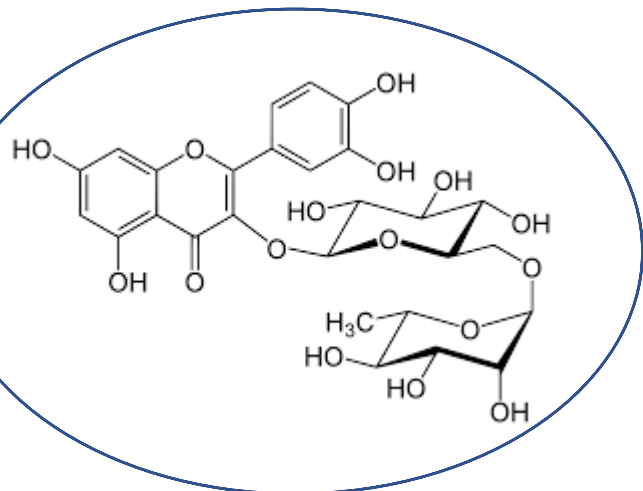


Q1:
Selezione ione
precursore

Q2:
Lo ione
precursore viene
frammentato
nella cella di
collisione

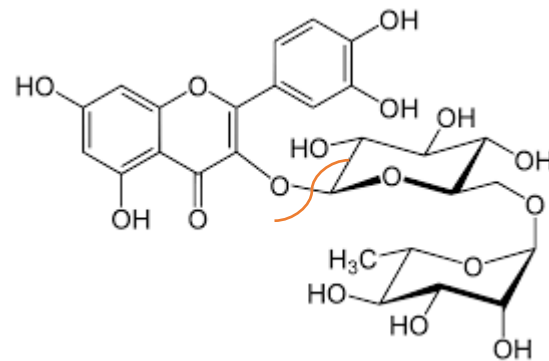
Q3:
Selezione dello
ione prodotto

609.0 m/z



Q1

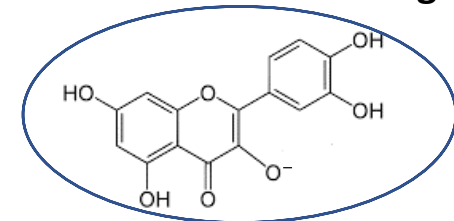
Precursor ion



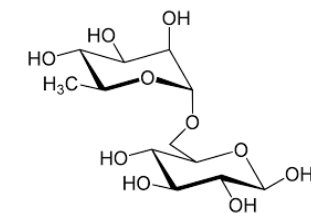
Q2

Aglicone

301 m/z



+

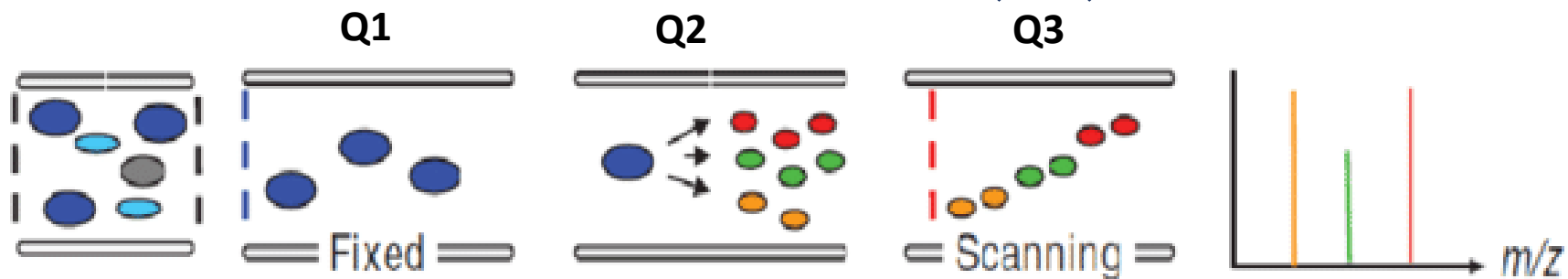


Q3

Glicone

Product ion

Product Ion Scan (PI)



Q1:
Selezione ione precursore

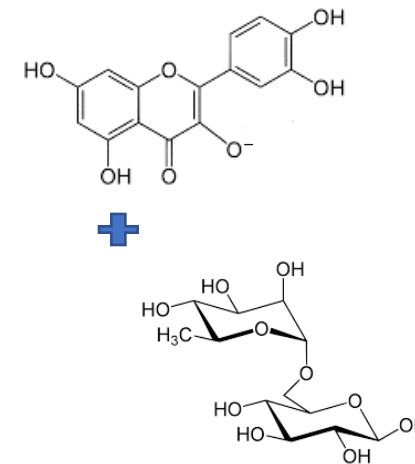
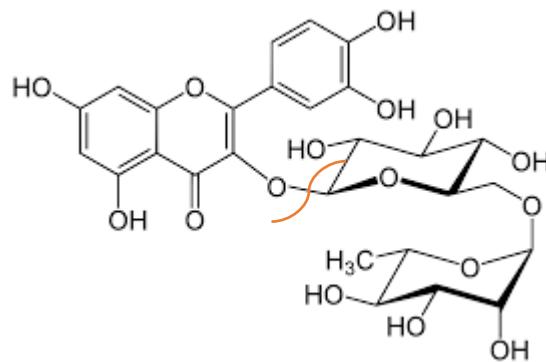
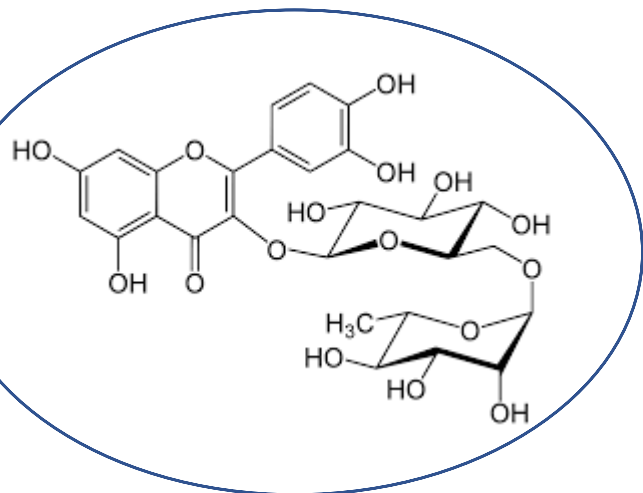
Q2:
Lo ione precursore viene frammentato nella cella di collisione

Q3:
scansione degli ioni prodotto

609.0 m/z

Aglicone

301 m/z



Q1

Precursor ion

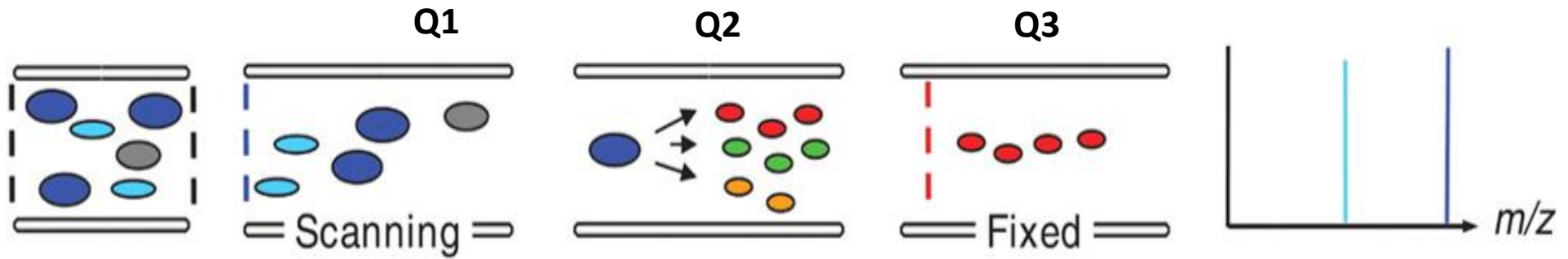
Q2

Q3

Product ion

Glicone

Precursor ion scan (PIS)

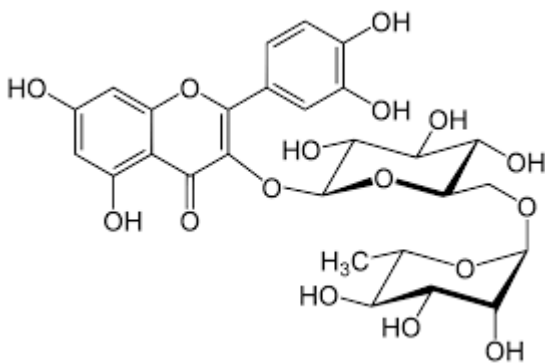


Q1:
scansione

Q2:
Frammentazione
ione precursore in
cella di collisione

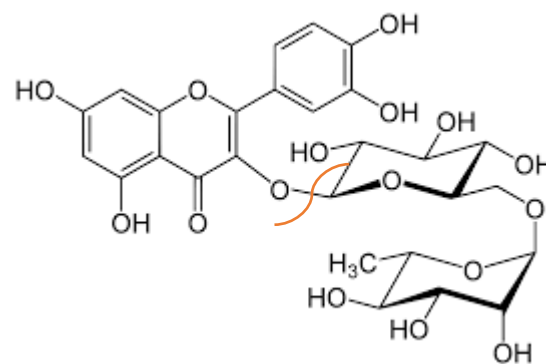
Q3:
*Selezione ione
prodotto*

609.0 m/z

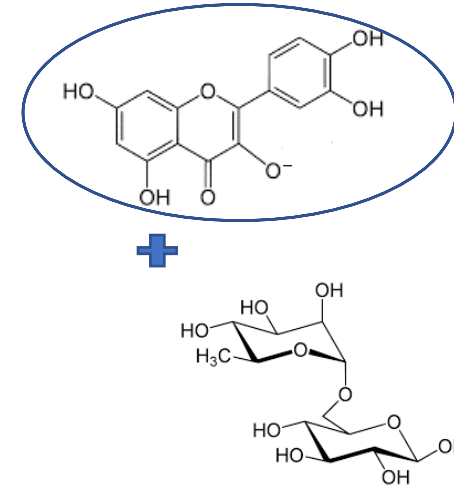


Q1

Precursor ion



Q2



Q3

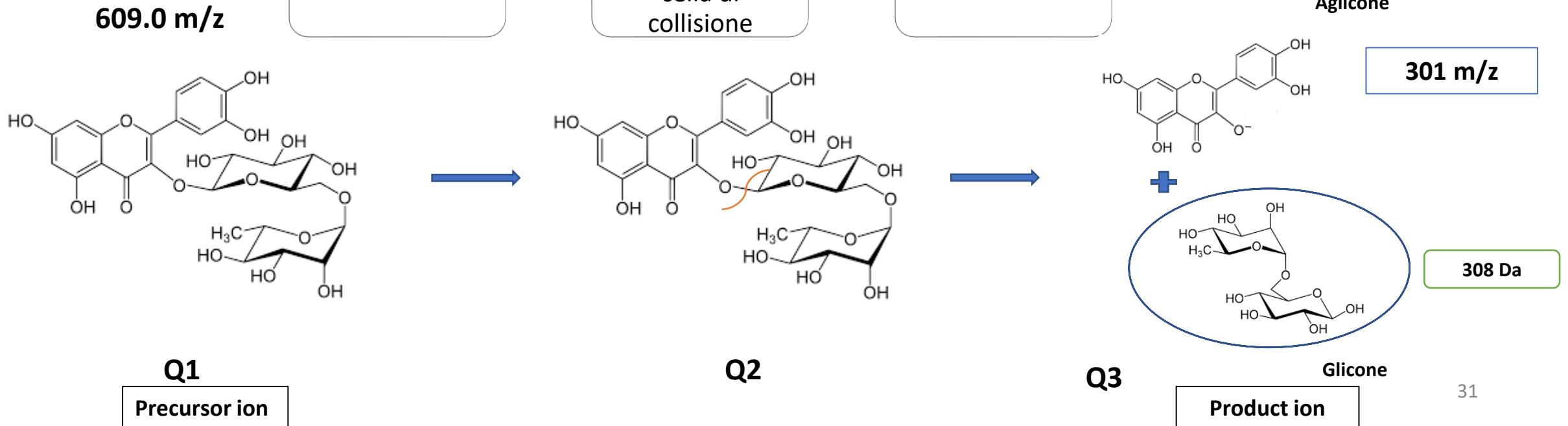
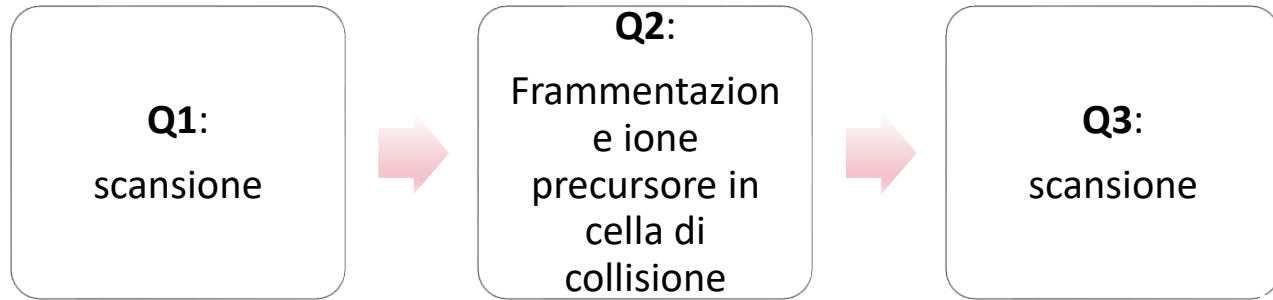
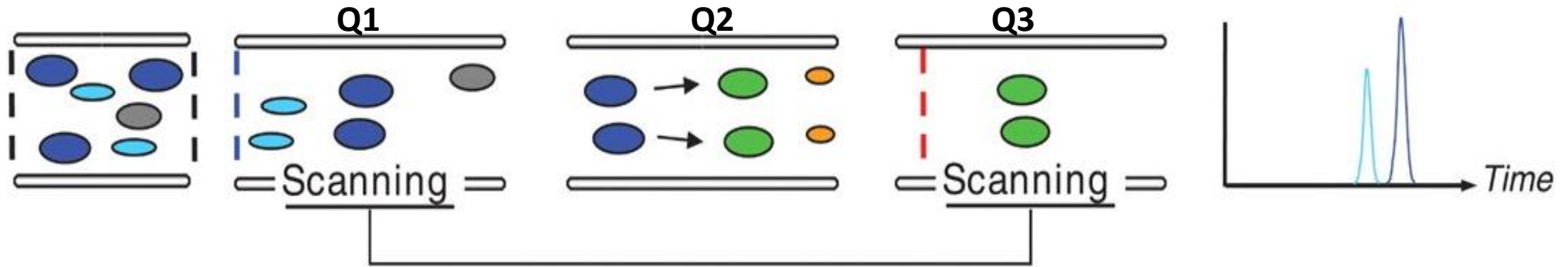
Product ion

Aglicone

301 m/z

Glicone

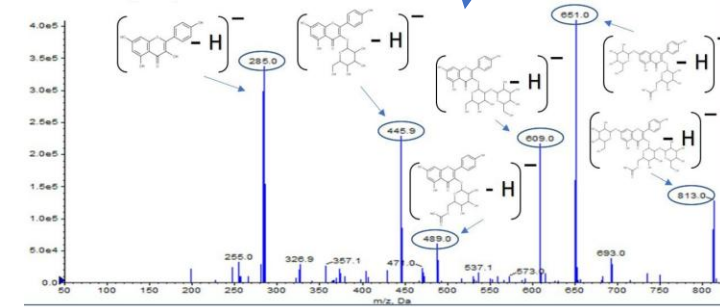
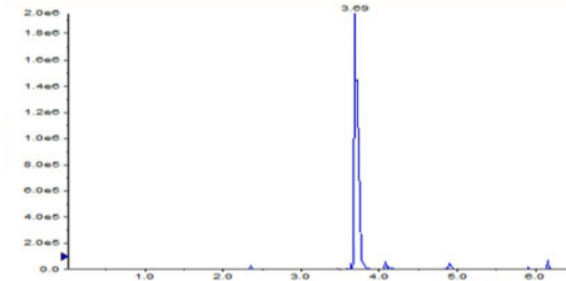
Neutral Loss (NL)



Analisi qualitativa e quantitativa

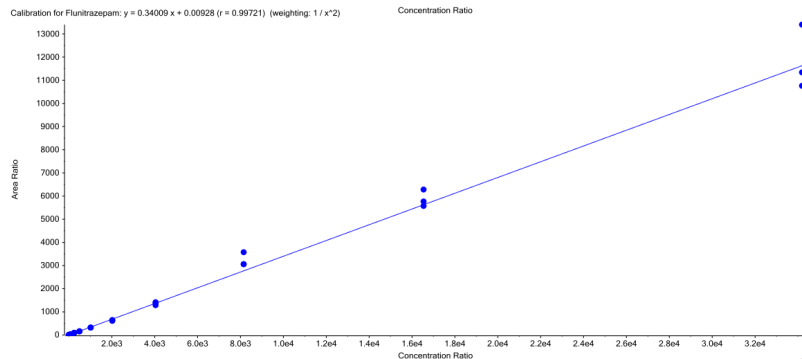
Analisi qualitativa

Indica se una specie chimica (analita) è presente o meno in una matrice. Si deduce dal tR del picco se si usa uno standard analitico (analisi targeted) o studiando lo spettro MS/MS se non si usa lo standard (analisi semi-untargeted)

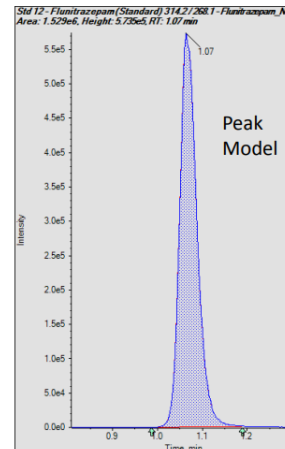


Analisi quantitativa

- Indica la quantità di specie (analita) presente (concentrazione).
- Uso di standard di riferimento a diverse concentrazioni (retta di calibrazione)
- Analisi targeted



retta di calibrazione standard



Integrazione area del picco del composto incognito

Conosciamo la concentrazione dell'analita nel campione

Definizione di standard e bianco

Standard analitico di riferimento → è una sostanza chimica pura e ben caratterizzata, utilizzata per calibrare, identificare e quantificare un analita in un campione complesso.

- ✓ **Elevata purezza** (generalmente > 95-99%)
- ✓ **Composizione nota e certificata**
- ✓ **Stabilità chimica e fisica**
- ✓ **Utilizzabile per calibrazione e validazione del metodo analitico**

Gli **standard** vanno possibilmente preparati con la stessa matrice del campione da analizzare, ma privo dell'analita, oppure nello stesso solvente di estrazione del campione.

Bianco → è un campione privo dell'analita di interesse, utilizzato per controllare eventuali contaminazioni, interferenze o rumori di fondo nel sistema analitico.

Gli standard si sintetizzano in laboratorio o si acquistano presso aziende certificate



Analisi targeted: analisi qualitativa

- Si usa **standard analitico** di ogni molecola che cerchiamo nel campione.



Condizioni da soddisfare tra picco standard e picco nel campione X:

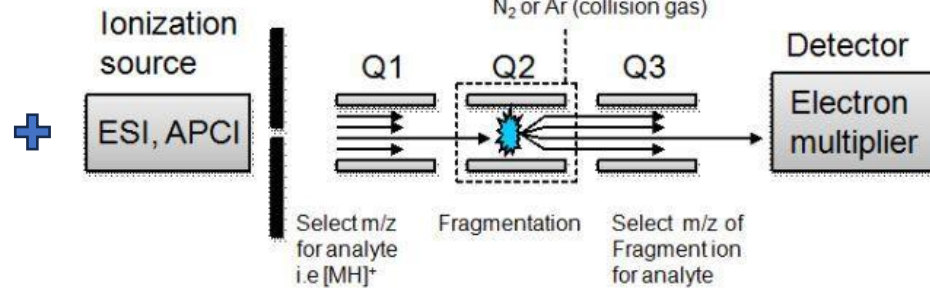
- ✓ Stesse transizioni MRM
- ✓ Stesso tR



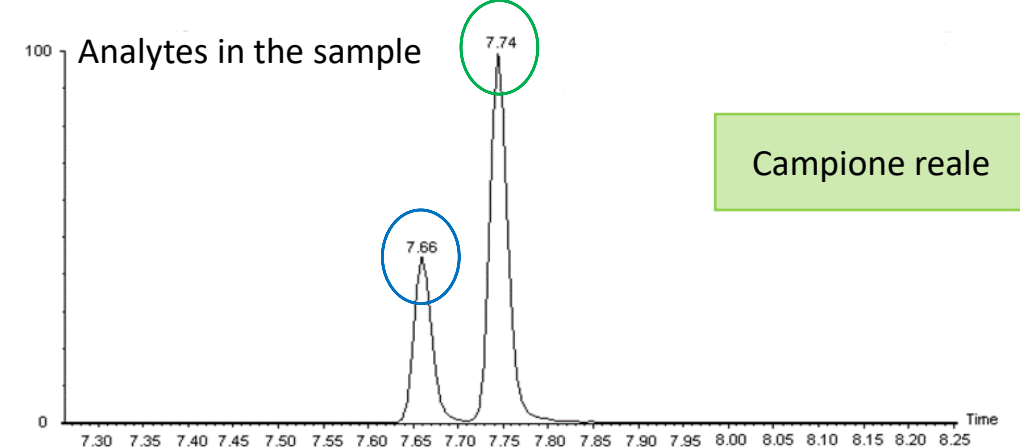
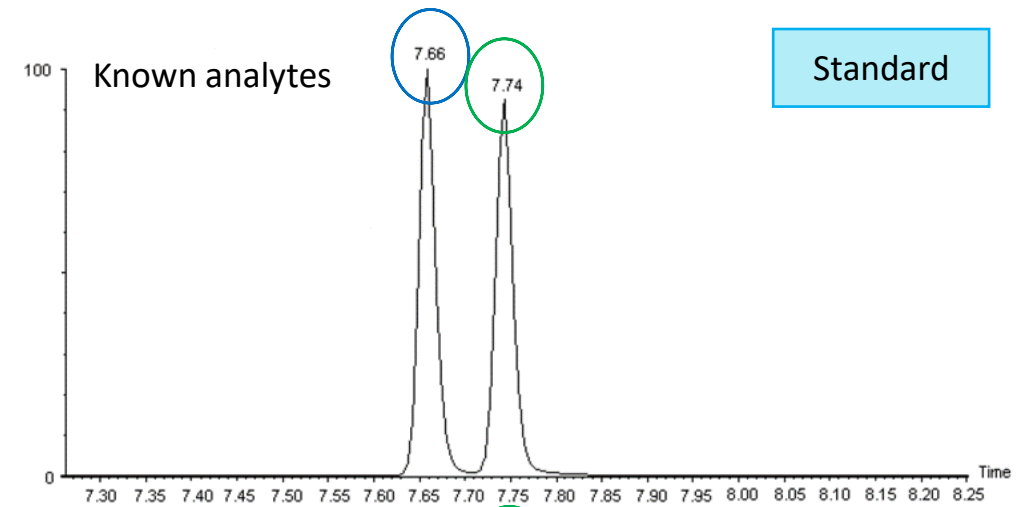
✓ **Identificazione**



UHPLC

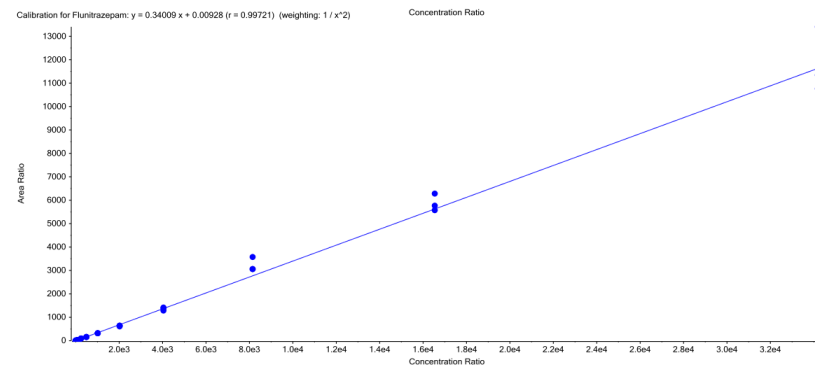


Triplo quadrupolo (QqQ)



Analisi quantitativa: Curva di calibrazione

- La quantificazione delle molecole viene eseguita attraverso l'uso di standard analitici e, se disponibili, standard interni (sostanze chimicamente simili all'analita di interesse, spesso marcate isotopicamente, impiegate per correggere variazioni durante l'analisi), per creare curve di calibrazione per ciascuna delle molecole target nello studio.
- La curva di calibrazione o retta di taratura costituisce un metodo indispensabile per la determinazione della concentrazione di un campione incognito per interpolazione.
- Al fine di poter interpretare i dati sperimentali è necessario che vi sia una relazione lineare tra la concentrazione e la risposta dello strumento. La dipendenza lineare è infatti indispensabile per ottenere risultati significativi in una curva di calibrazione.
- Detta x la concentrazione dell'analita e della y la risposta dello strumento è necessario ottenere una retta di equazione $y=mx+c$ essendo m il coefficiente angolare e n l'intercetta.
- A tale scopo si preparano alcune soluzioni (almeno 7 punti a concentrazione crescente) a concentrazione nota dette **standard di lavoro**.



Analisi quantitativa: Validazione

La validazione è il processo mediante il quale si dimostra che un metodo analitico è adatto allo scopo per cui è stato sviluppato. In ambito regolatorio garantisce accuratezza, precisione e riproducibilità.

Per validare un metodo analitico si seguono linee guida specifiche internazionali, ad es.

- **Food and Drug Administration (FDA)** per analisi di composti bioattivi in matrici alimentari
- **SANTE/11312/2021** per analisi di contaminanti (es. Micotossine o pesticidi)
- **European Medicines Agency (EMA)**: per analisi in ambito **farmaceutico** o **bioanalitico**

Alcuni parametri di validazione da soddisfare sono:

- **Recupero**: Misura l'efficienza con cui un analita viene estratto dal campione.
- **Effetto Matrice**: Influenza della composizione del campione sulla misurazione dell'analita, che può alterare il segnale (positivamente o negativamente).
- **Accuratezza**: Quanto il risultato medio di un metodo si avvicina al valore vero o teorico.
- **Precisione**: Quanto i risultati di un metodo sono coerenti tra loro, cioè la loro ripetibilità.
- **LOD (Limite di Rilevamento)**: Minima concentrazione di analita che può essere rilevata, ma non necessariamente quantificata.
- **LOQ (Limite di Quantificazione)**: Minima concentrazione di analita che può essere misurata con precisione e accuratezza.
- **Linearità**: Capacità di un metodo di fornire risultati proporzionali alla concentrazione dell'analita in un intervallo definito.

Caso studio: Validazione di un metodo analitico mediante UHPLC-MS/MS



- 1) Linearità: viene costruita una curva di calibrazione a circa 9 punti (0.1-100 ng/mL)** usando gli standard di riferimento + solvente (Es. Metanolo). Analisi in triplicata + calcolo del coefficiente di determinazione (R^2)
- 2) Recupero (Rec) ed effetto matrice (ME):** vengono valutati fortificando il campione bianco (QC) a 3 livelli finali diversi: **1, 10, 100 ng/mL**. La fortificazione viene eseguita sia su campioni **prima** della procedura di estrazione (**QC_i**) sia su campioni **alla fine** dell'estrazione, proprio prima dell'analisi strumentale (**QC_f**). **Gli standard di riferimento (QC_r)** vengono preparati nello stesso solvente di estrazione del campione. Ogni QC viene preparato in **quintuplicato (n=5)**.

Recupero ed Effetto matrice **vengono** calcolati con le seguenti formule:

$$Rec = \frac{QC_i}{QC_f} \times 100$$

$$ME = \frac{QC_f}{QC_r} \times 100$$

- 3) LOD (limite di rilevabilità) e LOQ (limite di quantificazione)** vengono calcolati tramite il rapporto segnale/rumore (S/N) su campioni aggiunti; **S/N=10 viene** considerato per il LOQ, mentre il LOD **viene** calcolato considerando **S/N=3**.

Per valutare la **precisione e l'accuratezza** del metodo, vengono testati diversi campioni (QC), fortificandoli a tre livelli di concentrazione (1, 10 e 100 ng/mL) con standard di riferimento, analizzati in duplicata in 3 diversi giorni.

4) L'accuratezza viene calcolata come **% di errore (bias%)**, secondo la seguente formula:
$$Bias\% = \frac{\bar{x}_i - \mu}{\mu} \times 100$$

\bar{x}_i è la media della concentrazione misurata nei campioni (sperimentale).

μ corrisponde alla concentrazione teorica del campione (in questo caso: 1, 10 e 100 ng/mL)

5) La precisione viene calcolata come deviazione standard relativa (RSD) con la seguente formula:
$$RSD = \frac{\sigma}{\bar{x}_i} \times 100$$

σ è la deviazione standard dei valori misurati.

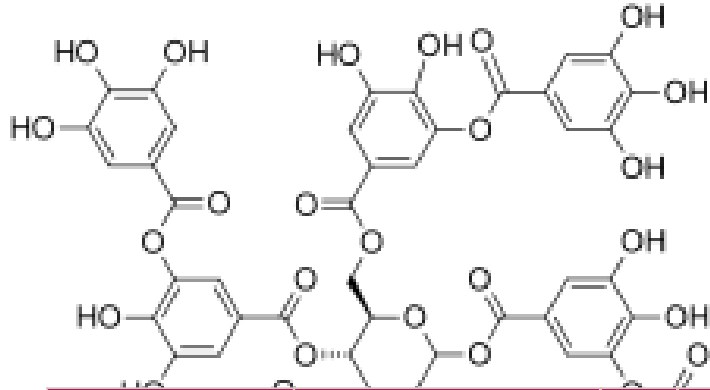
\bar{x}_i è la media della concentrazione misurata nei campioni (sperimentale).

- Per migliorare l'accuratezza e la precisione dei risultati, nella validazione dei metodi analitici, si usa anche lo **standard interno (IS)**, compensando errori come perdite durante l'estrazione, fluttuazioni strumentali e altri errori sistematici.
- L'IS è una sostanza sintetica, non esistente in natura, chimicamente simile all'analita di interesse, spesso marcata isotopicamente (solitamente con 3 deuteri al posto di 3 H).
- Lo standard interno viene aggiunto in quantità nota ai campioni di analisi, così come agli standard di riferimento, **prima dell'estrazione**, in modo che possieda lo stesso trattamento e le stesse condizioni di analisi degli analiti.

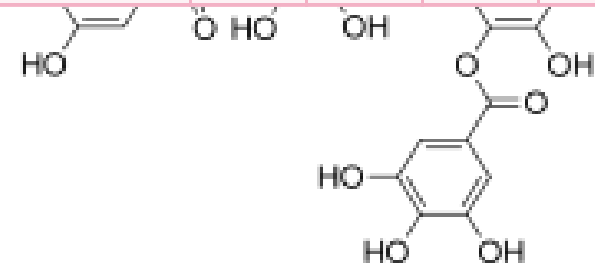
Dati di validazione



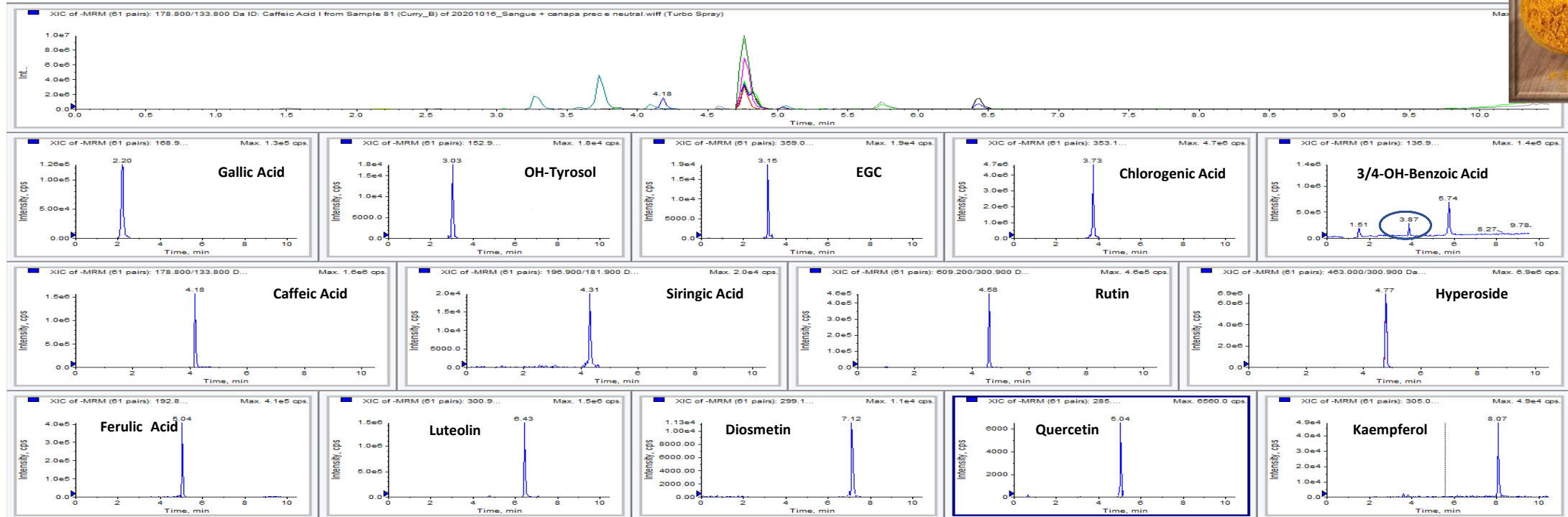
Determinazione e quantificazione di polifenoli da matrici vegetali mediante UHPLC-MS/MS



ANALYTE	EQUATION	R ²	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Recovery	Matrix effect	ANALYTE	EQUATION	R ²	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Recovery	Matrix effect
Gallic Acid	$y=33173,6x+1020,749$	0,996	0,152	0,505	54-89%	(-10) - 13%	Tyrosol	$y=52347,4x+54168$	0,998	0,122	0,407	62-78%	(-14) - (-17)%
OH-Tyrosol	$y=7,2033e5x+(-26722,935)$	0,999	0,028	0,080	53-87%	(-15) - 11%	O-Coumaric Acid	$y=84547,3x+33834$	0,999	0,025	0,083	76-95%	(-12) - 5%
EGC	$y=3560,063x+55,861$	0,999	0,117	0,391	62-75%	(-14) - 19%	Ferulic Acid	$y=21530,109x+8964,522$	0,999	0,018	0,061	72-84%	(-16) - 11%
Chlorogenic Acid	$y=19736,786x+143573$	0,999	0,007	0,023	73-88%	(-14) - 19%	Rosmarinic Acid	$y=7667,519x+(-167,135)$	0,999	0,040	0,133	67-77%	(-6) - 1%
Catechin	$y=1,12834e5x+15559,497$	0,999	0,030	0,099	65-74%	(-14) - 15%	Oleuropein	$y=21890,647x+2235,413$	0,999	0,037	0,124	75-87%	(-17) - 8%
3-OH-Benzoic Acid	$y=50971,3x+8181,320$	0,999	0,109	0,365	76-87%	(-11) - 19%	3-OH-Cinnamic Acid	$y=194640x+21060,674$	0,999	0,023	0,075	79-103%	(-9) - 20%
Epicatechin	$y=12405,638x+3577,657$	0,998	0,109	0,362	65-74%	(-11) - 13%	p-Coumaric Acid	$Y=169145x+46421,9$	0,999	0,027	0,089	85-96%	(-13) - 8%
Caffeic Acid	$y=14330,334x+1714,946$	0,999	0,012	0,041	75-90%	(-14) - 10%	Myricetin	$y=15115,474x+(-57325,5)$	0,995	0,029	0,096	45-65%	(-18) - 3%
Vanillic Acid	$y=16968,775x+75015,2$	0,999	0,018	0,061	72-108%	(-8) - 15%	Luteolin	$y=114859x+36881,7$	0,999	0,006	0,019	63-72%	(-14) - 5%
EGCG	$y=38241,9x+25503,728$	0,999	0,109	0,365	26-58%	(-14) - 7%	Quercetin	$y=68143,8x+(-6078,729)$	0,999	0,009	0,031	55-74%	(-13) - 11%
Syringic Acid	$y=24821,013x+21543,749$	0,999	0,008	0,028	75-98%	(-12) - 16%	Trans Cinnamic Acid	$y=11186,465x+5169,6716$	0,999	0,035	0,117	79-103%	(-13) - 14%
Orientin	$y=22424,120x+(-520,027)$	0,999	0,023	0,076	65-81%	(-13) - 11%	Apigenin	$y=114868x+36880,8$	0,999	0,005	0,015	53-66%	(-15) - 12%
Rutin	$y=16634,461x+17676,918$	0,999	0,025	0,084	65-83%	(-6) - 7%	Diosmetin	$y=41446,3x+24903,63$	0,999	0,003	0,011	57-64%	(-12) - 7%
Hyperoside	$y=124696x+15816,219$	0,998	0,002	0,008	72-82%	(-4) - 13%	Kaempferol	$y=3665,510x+590,554$	0,999	0,060	0,201	55-69%	(-12) - 13%
Isoquercitrin	$y=58308,6x+10945,917$	0,999	0,005	0,016	67-88%	(-12) - 15%							



Targeted: MRM (M. koenigii leaves)

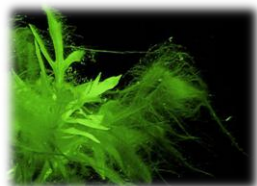


	Gallic Acid	OH-Tyrosol	EGC	Chlorogenic Acid	3/4-OH-Benzoic Acid	Caffeic Acid	Siringic Acid	Rutin	Hyperoside	Isoquercetin	O-Coumaric Acid	Ferulic Acid	Rosmarinic Acid	Luteolin	Quercetin	Diosmetin	Kaempferol	
M. koenigii leaves (A)	17,73	< LOQ	< LOQ	1786	14,22	14,44	0,10	1,50	6,09	3,58	19,6	0,36	26,10	0,18	14,97	0,28	0,34	µg/g (ppm)
M. koenigii leaves (B)	126,20	0,09	0,66	10510	16,31	73,81	0,09	0,77	6,92	3,78	33,14	1,38	< LOQ	0,20	14,20	0,25	0,14	µg/g (ppm)

Targeted: MRM

	Gallic Acid	OH-Tyrosol	Chlorogenic Acid	Catechin	3/4-OH-Benzoic Acid	Tyrosol	Caffeic Acid	Epicatechin	Siringic Acid	Rutin	
Antal	< LOQ	2,31	86,9	51,2	5890	1640	< LOQ	843	0,626	0,719	µg/g
Carmagnola	< LOQ	2,12	< LOQ	< LOQ	5250	1590	7,55	< LOQ	0,448	1,03	µg/g
Kompolti	2120	1,94	< LOQ	< LOQ	3900	1320	3,8	743	1,38	0,839	µg/g
Kc-Virtus	< LOQ	1,82	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1040	5,1	2250	< LOQ	0,669	µg/g
Tiborzallasi	< LOQ	1,68	169	131	< LOQ	795	1,96	2630	1,3	0,543	µg/g
Villanova	< LOQ	1,61	74,5	< LOQ	< LOQ	1820	3,44	< LOQ	0,9	0,651	µg/g
Ferimon	3320	2,02	< LOQ	< LOQ	3300	< LOQ	4,62	< LOQ	0,312	1,91	µg/g
Gran sasso Kush	< LOQ	2,17	54,5	< LOQ	< LOQ	2320	3,88	520	< LOQ	0,75	µg/g
Finola	< LOQ	1,66	47,6	< LOQ	3920	< LOQ	7,27	1310	0,998	0,81	µg/g
Carmagnola Lemon	2310	1,39	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1,33	< LOQ	1,13	0,877	µg/g
Pineapple	< LOQ	2,1	56,1	0,822	1960	< LOQ	4,78	1070	< LOQ	0,895	µg/g
Futura 75	< LOQ	< LOQ	62,1	23,2	< LOQ	< LOQ	3,49	1140	< LOQ	0,593	µg/g
	Hyperoside	Isoquercetin	Ferulic Acid	Rosmarinic Acid	Luteolin	Quercetin	Vanillic Acid	Apigenin	Diosmetin		
Antal	0,654	0,728	1,87	262	9,82	27,2	< LOQ	0,795	17,2		µg/g
Carmagnola	0,501	0,471	1,63	421	18,9	< LOQ	137	0,785	9,03		µg/g
Kompolti	0,612	0,684	1,46	270	5,88	0,848	217	0,764	10,1		µg/g
Kc-Virtus	0,6	0,653	2,01	434	< LOQ	1,1	39,9	0,681	12		µg/g
Tiborzallasi	0,717	0,804	2,53	491	1,15	5,27	125	0,744	8,21		µg/g
Villanova	0,452	0,571	1,58	957	< LOQ	14,5	51,9	0,725	6,99		µg/g
Ferimon	0,684	0,73	1,43	1030	< LOQ	15,2	105	0,766	16,4		µg/g
Gran sasso Kush	0,469	0,494	1,02	193	7,09	9,64	< LOQ	0,767	20,2		µg/g
Finola	0,481	0,528	1,27	402	16,8	< LOQ	< LOQ	0,728	4,6		µg/g
Carmagnola Lemon	0,861	0,883	1,26	486	11,4	28,6	401	0,751	14,9		µg/g
Pineapple	0,559	0,546	1,19	182	13,5	17,4	59,8	0,726	11,5		µg/g
Futura 75	0,524	0,591	1,58	344	22,4	29,7	107	0,802	28,2		µg/g

C. sativa L.



Seaweeds

	Chlorogenic Acid	Tyrosol	3/4-OH-Benzoic Acid	Caffeic Acid	Vanillic Acid	Siringic Acid	Rutin	3-OH-Cinnamin Acid	p-Coumaric Acid	
Alge Rosse	0,1823	167,7	30,57	0,1002	5,276	0,001641	0,000872	2,556	0,2235	µg/g
Alge Verdi	<LOQ	13,71	2,425	<LOQ	1,549	0,01237	0,001056	0,2633	0,0272	µg/g



Analisi “semi-untargeted”

Combinazione di un’analisi mirata (targeted) con una non mirata (untargeted) nello stesso esperimento.

Si può effettuare mediante spettrometria di massa a **bassa risoluzione** (ad es. mediante l’uso di uhplc accoppiato ad un triplo quadrupolo ibrido con trappola ionica lineare).

- **Quando effettuare un’analisi semi-untargeted?**

Quando si vuole analizzare un campione che contiene analiti di cui non abbiamo gli standard analitici.

OBIETTIVO:

Essere in grado di identificare in un campione tutti gli analiti appartenenti ad una specifica classe (es. Polifenoli) a livello **PUTATIVO**, quando non si è a disposizione di:

- **standard analitici** (non tutti sono in commercio)
- **spettrometria ad alta risoluzione** (in grado di identificare analiti senza usare standard grazie alla massa accurata = Modalità untargeted).

N.B. l’identificazione si può definire sicura solo quando si usa uno standard di riferimento.

Sviluppo di un metodo “semi-untargeted”

QqQ

Confronto tra diverse modalità di acquisizione:

Es.

- Precursor Ion + Neutral loss scan
- MRM + Precursor Ion Scan
- Etc.



Doppia acquisizione dello stesso campione

Ibrido QqQ-LIT

1) Survey scan:

Ad es. MRM o NL o PI (si sceglie a seconda del tipo di analita che abbiamo, es. Se è coniugato con uno zucchero). Si usa come trigger per selezionare l'analita di interesse.

2) Information Dependent acquisition (IDA): seleziona in tempo reale i segnali rilevanti in survey scan e attiva acquisizioni aggiuntive, determinando lo switch del Q3 in LIT.

3) Enhanced Product Ion (EPI): I frammenti che arrivano nella LIT vengono **raccolti e analizzati**. La LIT esegue una scansione degli ioni, generando uno **spettro di frammentazione dettagliato** (EPI).



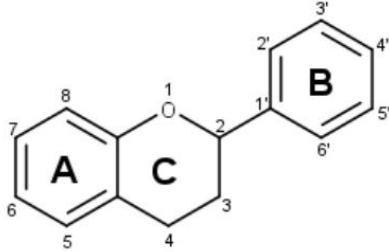
Unica acquisizione dello stesso campione



Metodo + sensibile e rapido

Experimental work : Glycoside derivatives

Aglycone (non sugar part)

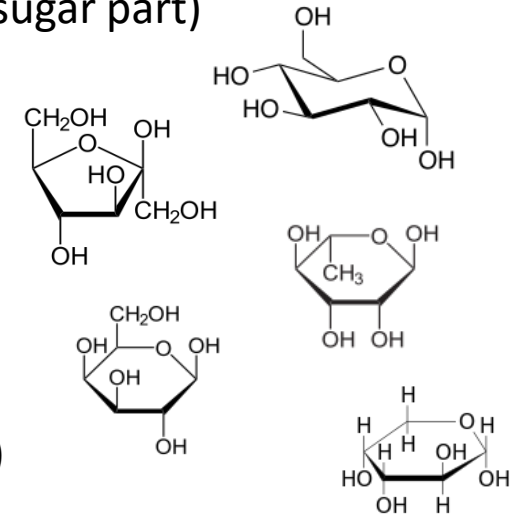


Benzene ring (A) condensed with six membered ring (C) pyran ring, which in the 2-position carries a phenyl ring (B) as a substituent



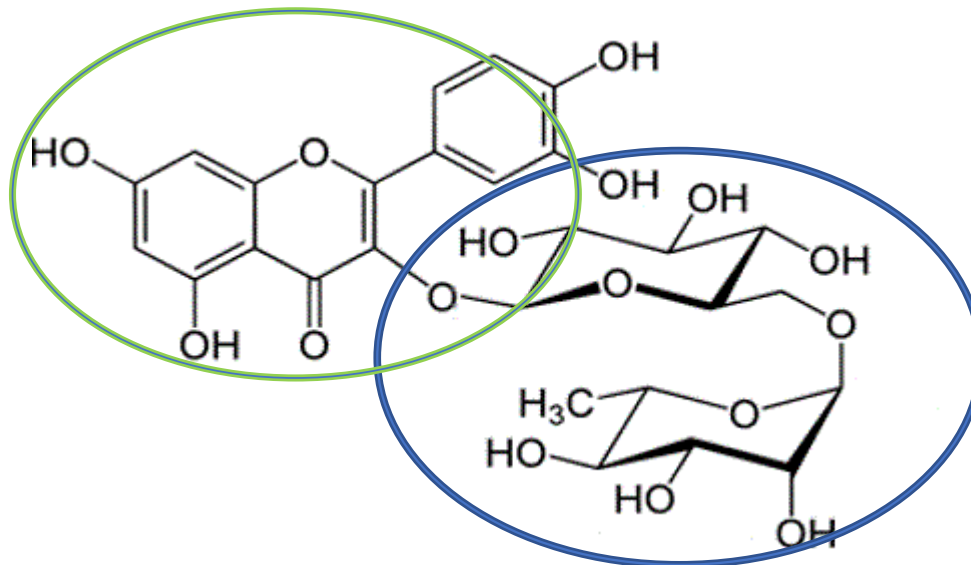
- **glucosides** (glycone = glucose)
- **fructosides** (glycone = fructose)
- **ramnosides** (glycone = rhamnose)
- **galactosides** (glycone = galactose)
- **arabinosides** (glycone = arabinose)
-etc

Glycone (sugar part)



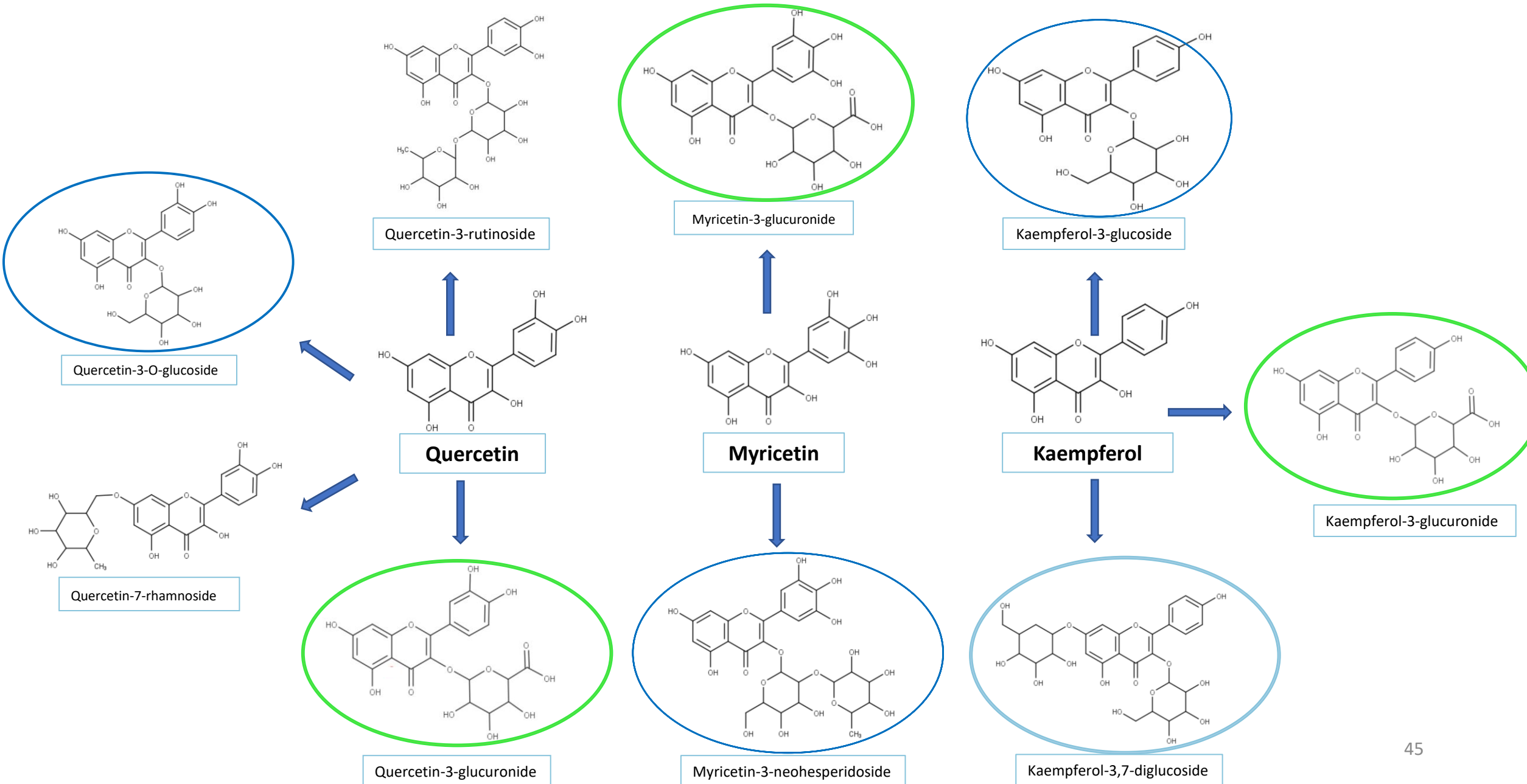
Rutin

Aglycone:
Quercetin

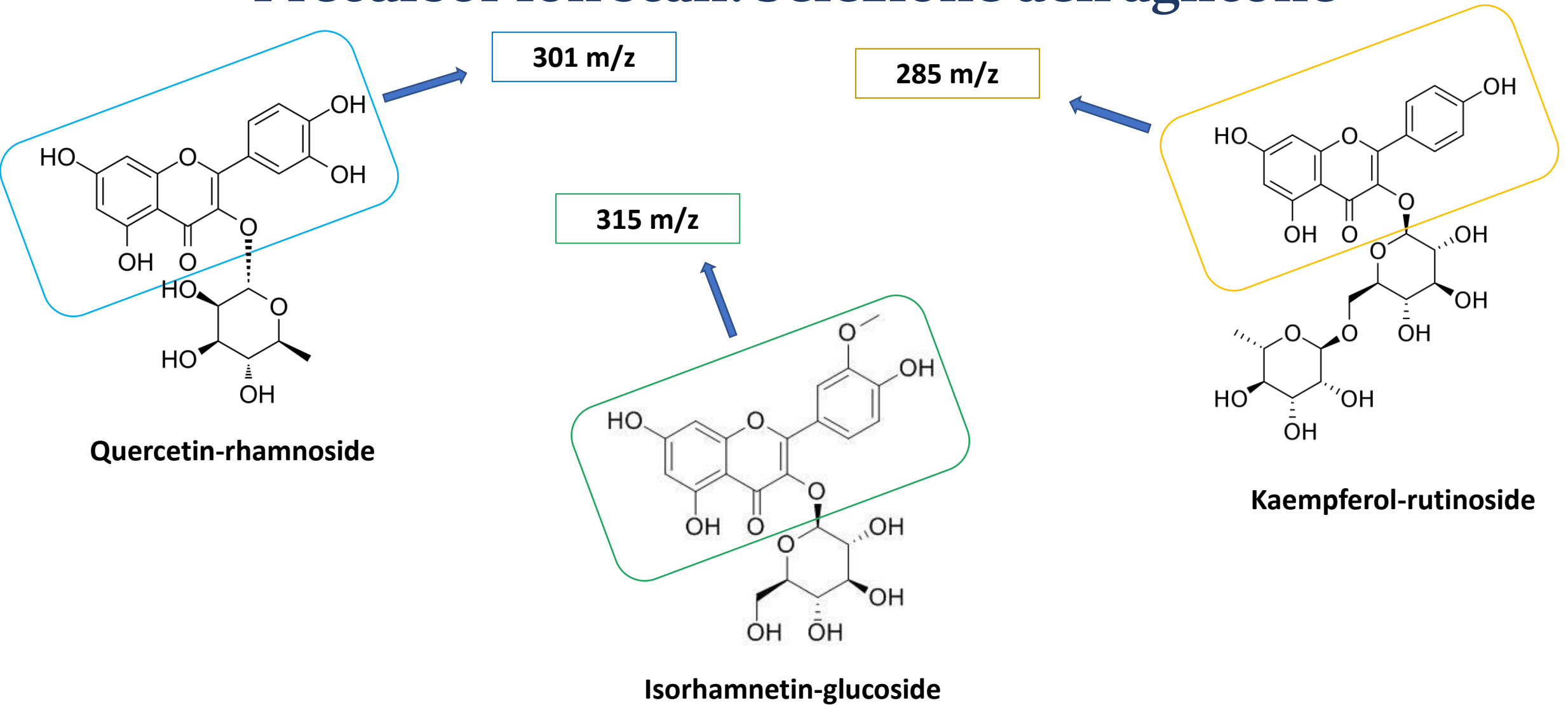


Glycone:
Rutinose

Flavonoids



Precursor Ion scan: Selezione dell'aglicone

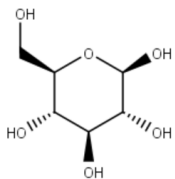


Obiettivo: Rilevare la struttura coniugata, a partire dal solo aglicone

Neutral Loss: Sugar moiety

Obiettivo: Rilevare la struttura coniugata, a partire dallo zucchero perso (molecola neutra)

Glucose and galactose



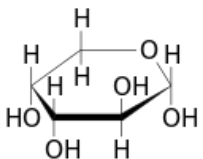
MW= 180,157 g/mol



MW= 18,0153 g/mol

162 Da

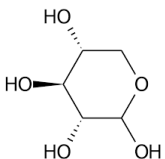
Arabinose



MW= 150,130 g/mol

or

Xylose



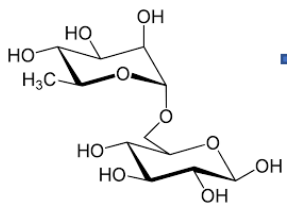
MW= 150,130 g/mol



MW= 18,0153 g/mol

132 Da

Rutinose



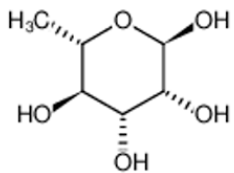
MW= 326,297 g/mol



MW= 18,0153 g/mol

308 Da

Rhamnose



MW= 164,160 g/mol

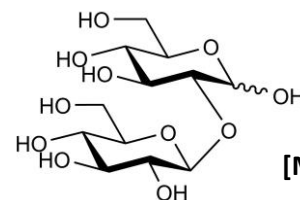


MW= 18,0153 g/mol

146 Da

Sophorose

[beta-D-gluco-hexopyranosyl-(1->2)-alpha-D-gluco-hexopyranose]

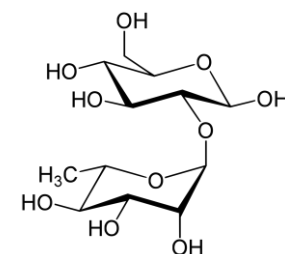


[M-H-162-162]⁻

162 Da

Neohesperidoside

[rhamnopyranosyl-gluco-pyranoside]



[M-H-146-308]⁻

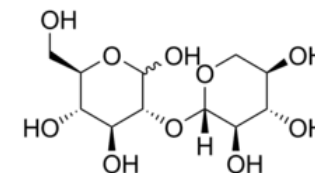
146 Da

or

308 Da

Sambubioside

[β-D-xylosyl-(1->2)-β-D-glucose]



[M-H-132-162]⁻

132 Da

or

162 Da

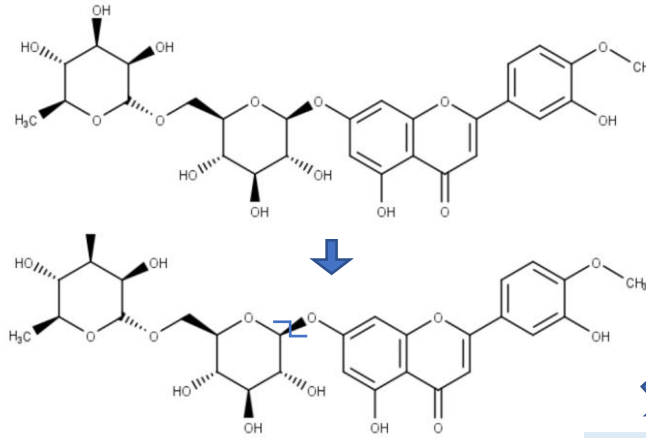
Curry leaves: semi-untargeted by Precursor Ion and Neutral Loss scan (QqQ)

Name:

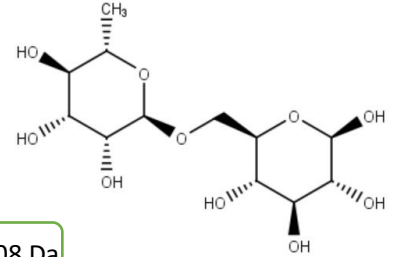
Diosmetin 7-o-rutinoside (Diosmin)

Molecular Weight:
608.5 g/mol

T_R: 4.76



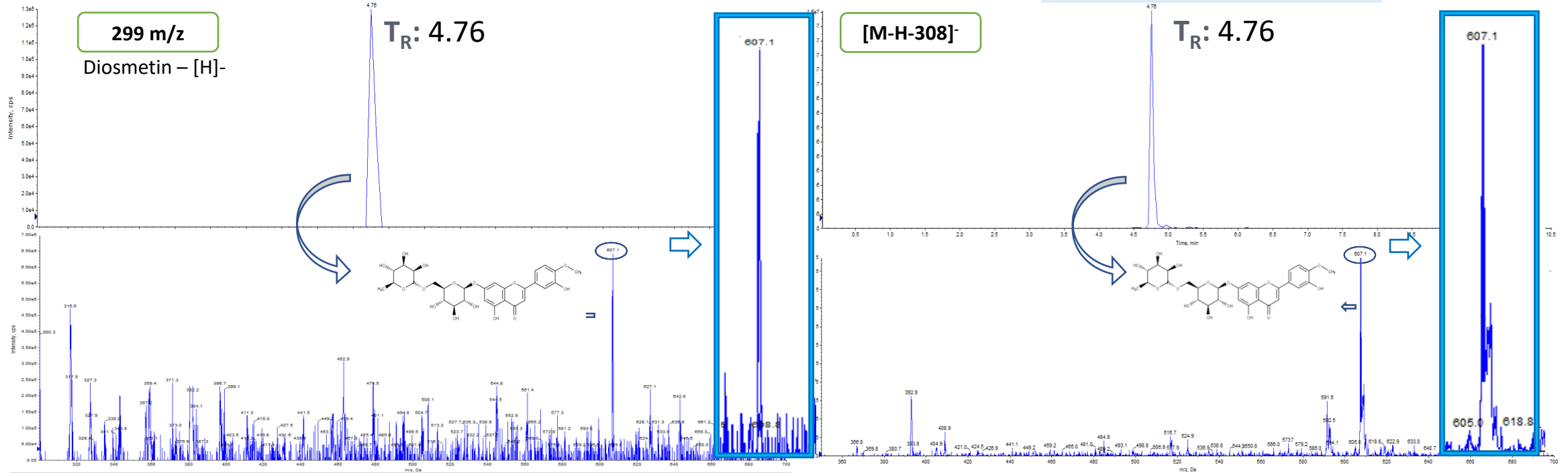
Rutinoside 326.297 g/mol



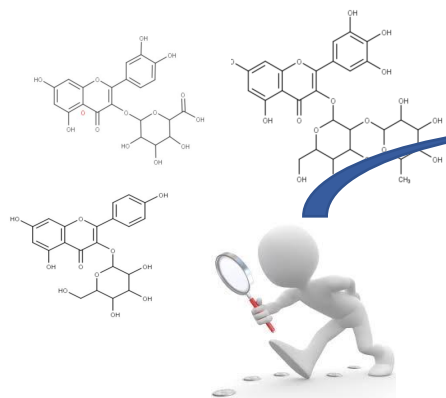
MW-H₂O=308 Da

Precursor Ion Scan

Neutral Loss Scan



Sviluppo di un metodo semi-untargeted mediante: UHPLC-QqQ-LIT-MS/MS

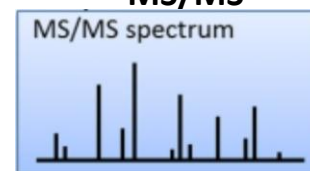


Ricerca in letteratura dei polifenoli non presenti nella target list

Cercare il Canonical SMILES di ogni polifenolo (Pubchem)



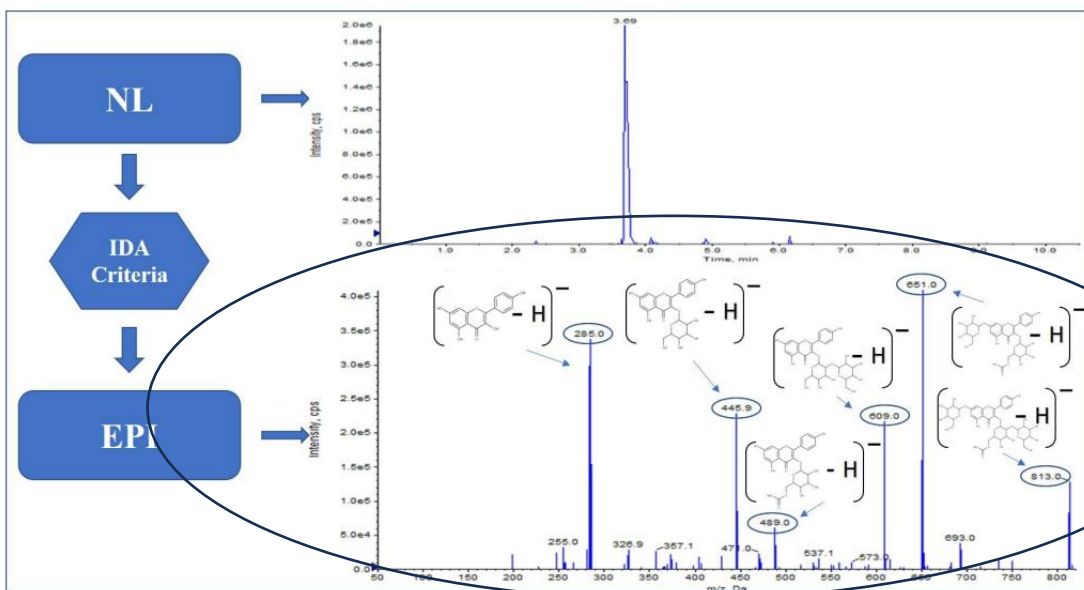
Predizione *in Silico* dello spettro MS/MS



Creazione Database



SEMI-UNTARGETED ANALYSIS by UPLC-QqQ-LIT-MS/MS



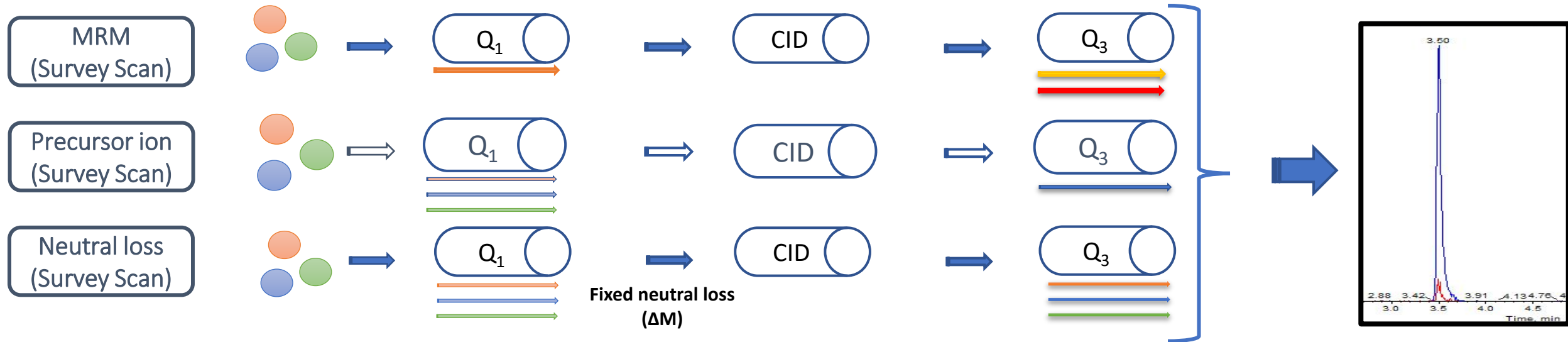
Comparazione del nostro spettro MS/MS con quello ottenuto *in silico* o con quelli trovati in database e letteratura

Se lo spettro è simile e ci sono frammenti in comune:

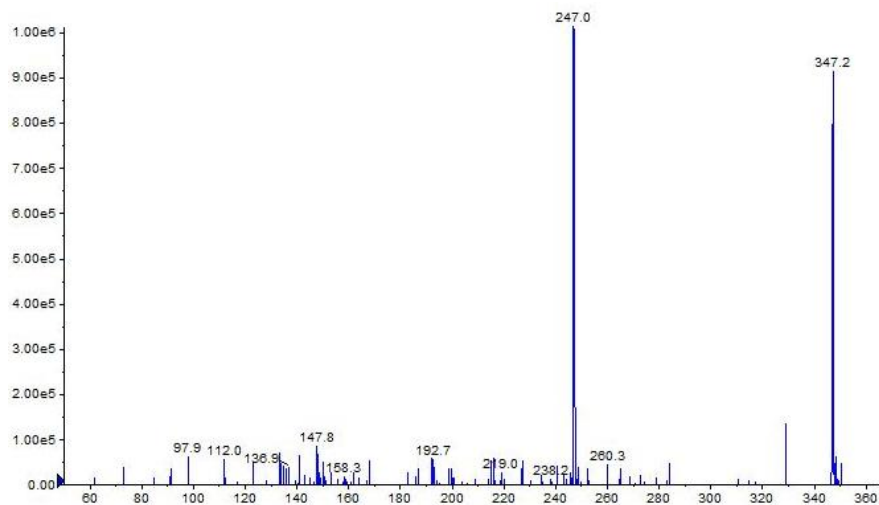
Identificazione putativa dell'analita ✓

SEMI-UNTARGETED ANALYSIS by UPLC-QqQ-LIT-MS/MS

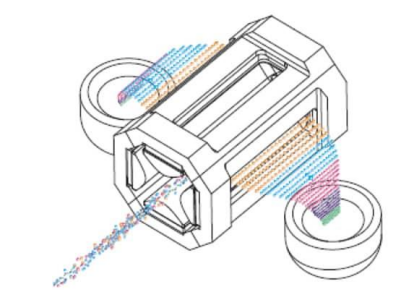
Può essere effettuata andando a sfruttare una tra le diverse modalità di acquisizione del QqQ come **SURVEY SCAN**:



Spettro MS/MS dell'analita rilevato = Informazioni strutturali



Enhanced Product Ion (EPI)

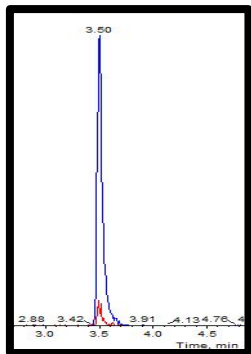


Q3 switching to Linear Ion Trap (LIT)

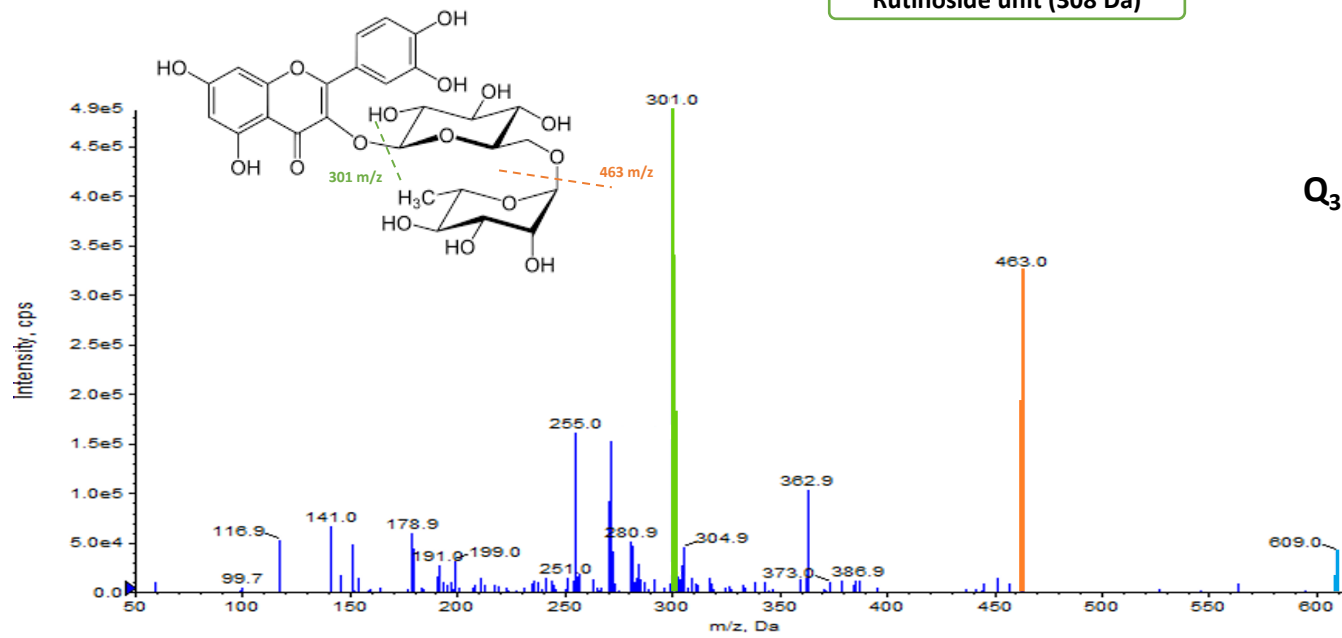
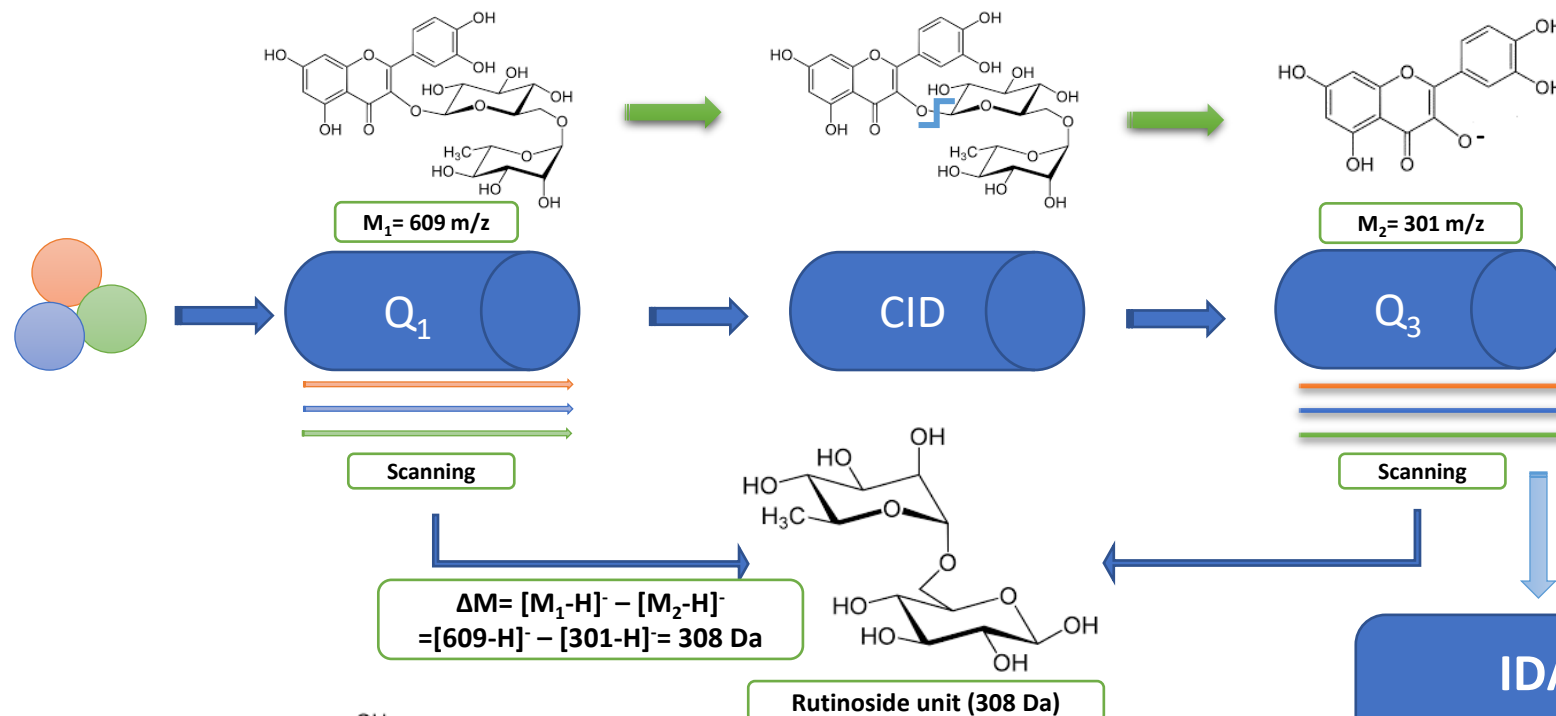
Information Dependent acquisition (IDA)

Semi-untargeted: NL-IDA-EPI

NL
(Survey Scan)

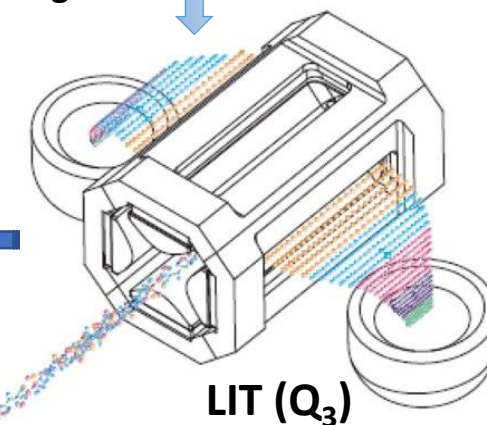


EPI
(Dependent Scan)



IDA
(Criteria)

Q3 switching to LIT



SPETTROMETRIA DI MASSA AD ALTA RISOLUZIONE

Nella spettrometria di massa, molti ioni possono avere valori di m/z molto simili.

Uno strumento a bassa risoluzione potrebbe mostrarli come un unico segnale ampio.

La **spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS)** può separare questi picchi e misurare le loro masse più precisamente.

Questo è essenziale per l'**assegnazione della formula**, la distinzione degli **isobari**, il rilevamento di composti in traccia e il miglioramento della fiducia nell'identificazione in miscele complesse.

Gli **isobari** sono ioni, atomi o molecole che possiedono la stessa massa nominale (stesso numero di massa intero) ma diverse masse esatte o strutture chimiche.

1. Massa Nominale

È l'approssimazione più semplice, utilizzata per calcoli rapidi e strumenti a bassa risoluzione (come i singoli quadrupoli).

•**Definizione:** Somma dei numeri di massa (protoni + neutroni) degli isotopi più abbondanti degli elementi che compongono la molecola.

•**Caratteristica:** È sempre un numero **intero**.

$$\text{Esempio } (C_{10}H_{20}O): (12 \times 10) + (1 \times 20) + (16 \times 1) = 156 \text{ Da}$$

2. Massa Esatta

È un valore **teorico** calcolato matematicamente con estrema precisione.

•**Definizione:** Somma delle masse isotopiche degli isotopi più abbondanti di ogni elemento (es. H = 1.007825, C = 12.00000).

•**Caratteristica:** È un valore calcolato, non misurato. Serve come riferimento standard.

$$\text{Esempio } (C_{10}H_{20}O): \text{Il calcolo preciso dà } 156.1514 \text{ Da.}$$

3. Massa Accurata

È il valore **sperimentale** che otteniamo effettivamente dallo strumento.

•**Definizione:** La massa misurata dallo spettrometro durante l'analisi.

•**Caratteristica:** La sua vicinanza alla "Massa Esatta" dipende dalla qualità (risoluzione) dello strumento.

•**Importanza:** La differenza tra massa accurata e massa esatta si chiama **Errore di Massa** (espresso spesso in ppm - parti per milione).

Senza un'alta risoluzione, lo strumento vedrebbe solo la **massa nominale**.

Con un'alta risoluzione (es. Orbitrap), otteniamo la **massa accurata**, che ci permette di risalire alla formula bruta esatta e distinguere molecole che pesano quasi uguale (es. Composti che differiscono solo per 0.001 Da).

Risoluzione, Potere Risolutivo e accuratezza di massa

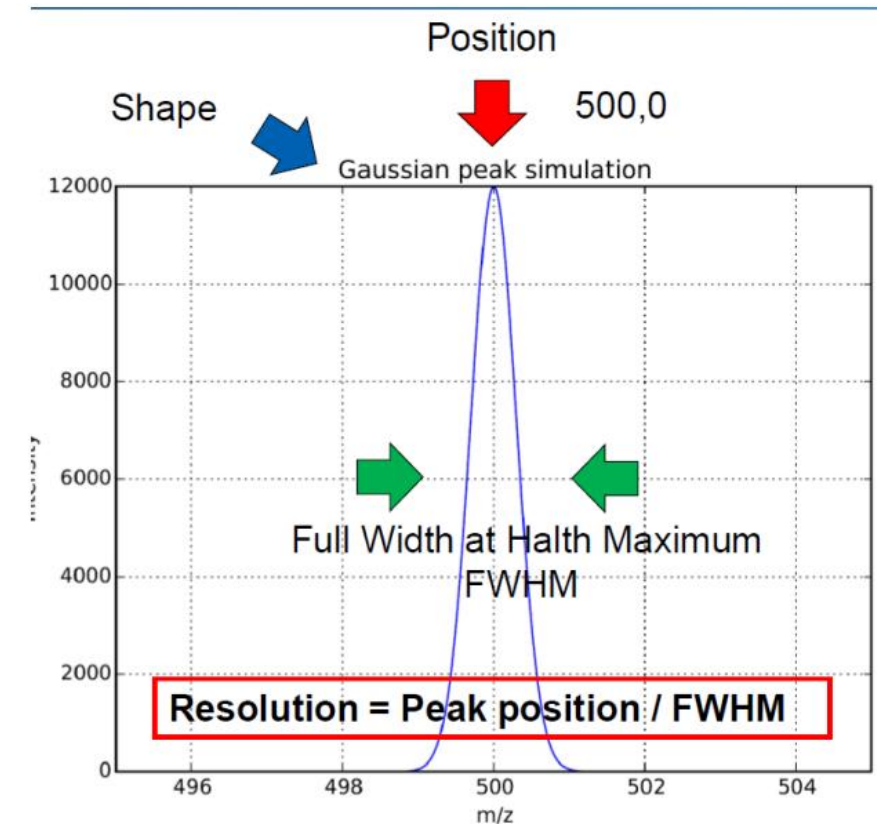
Risoluzione: è la misura della **larghezza di un picco** a una determinata altezza.

Rappresenta la minima distanza in massa necessaria affinché due segnali adiacenti siano distinti.

- **Parametro Standard:** Si misura comunemente come **FWHM** (*Full Width at Half Maximum*), ovvero la larghezza del picco al **50%** della sua altezza massima.
- **Unità di misura:** Dalton (Da) o unità di massa atomica (u).
- **Concetto chiave:** Più il valore è **piccolo**, più il picco è "stretto" e lo strumento è preciso.

Perché è importante: permette di vedere specie che altrimenti si confonderebbero, come **isobari**.

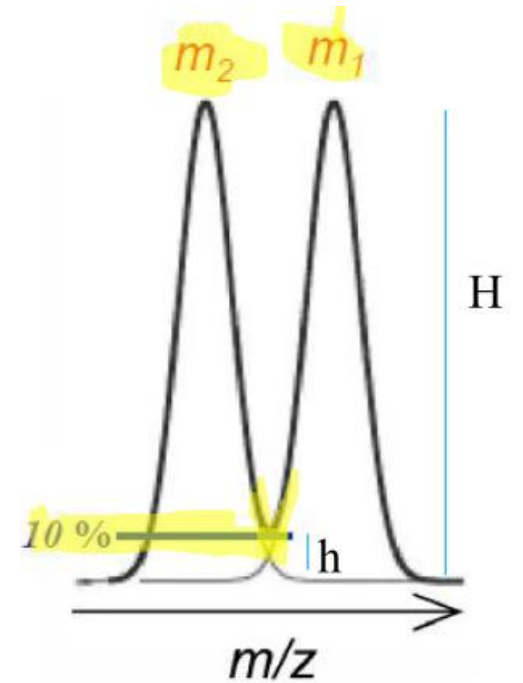
Esempio: due specie a **m/z 500.0000** e **m/z 500.0100** hanno una differenza di **0.0100 Da**. Se il picco strumentale ha una larghezza a metà altezza (FWHM) di **0.020 Da**, lo strumento può avere difficoltà a separarli; se invece la FWHM scende a **0,005 Da**, i due segnali risultano chiaramente distinti.



Potere risolutivo: è l'espressione numerica della capacità di separazione dello strumento, ovvero di distinguere 2 picchi adiacenti con uguale intensità, con masse m_1 e m_2 .

Comunemente e accettabilmente definito in termini di sovrapposizione (o 'valle') tra due picchi. Pertanto, per **due picchi di uguale altezza**, con masse m_1 e m_2 , quando vi è una **sovrapposizione** tra i due picchi fino a una **percentuale** dichiarata dell'altezza di ciascun picco H (si raccomanda il 10%), allora il **potere risolutivo** è definito come:

$$\text{Potere Risolutivo} = \frac{m_1}{m_1 - m_2}$$

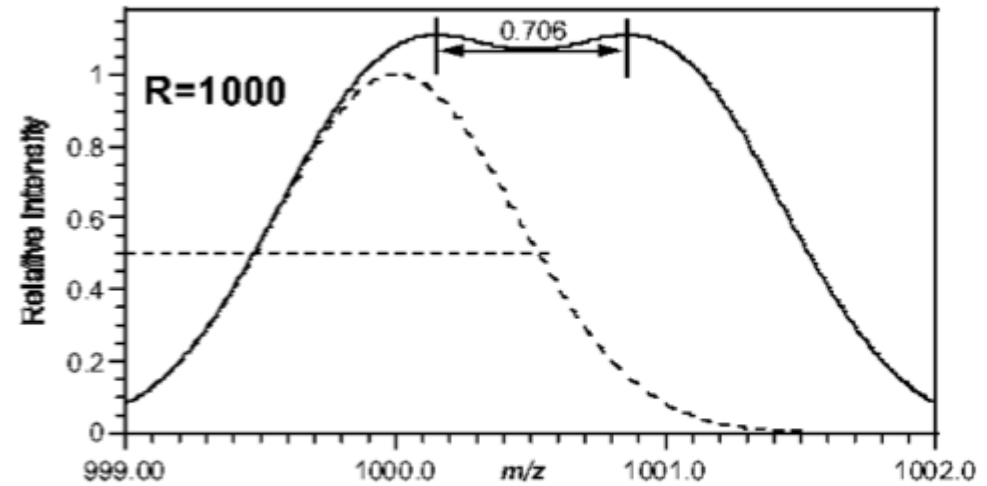
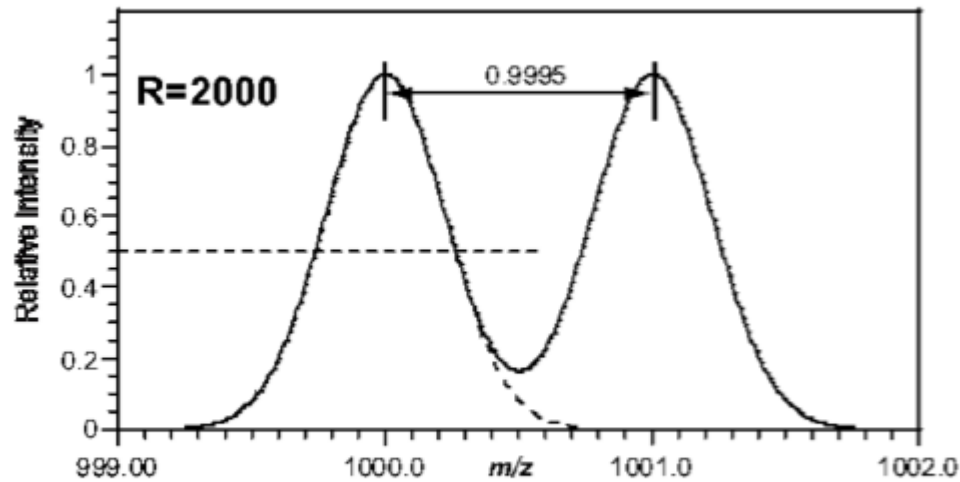
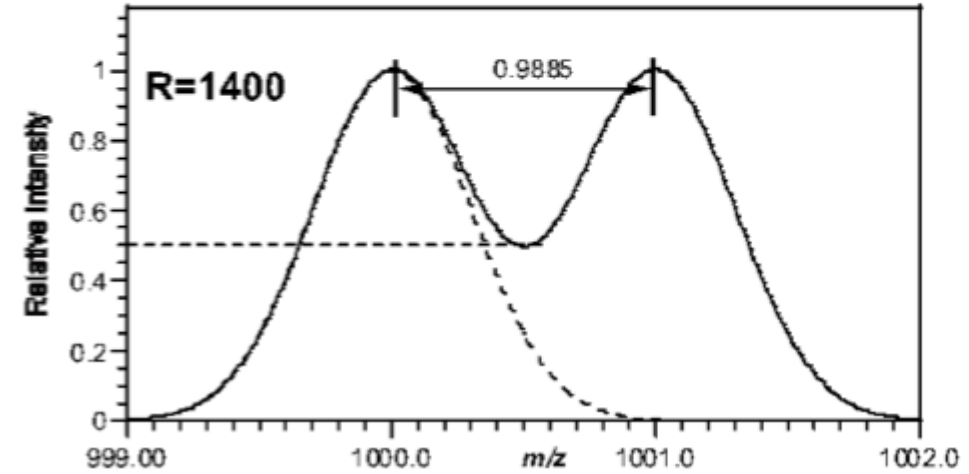
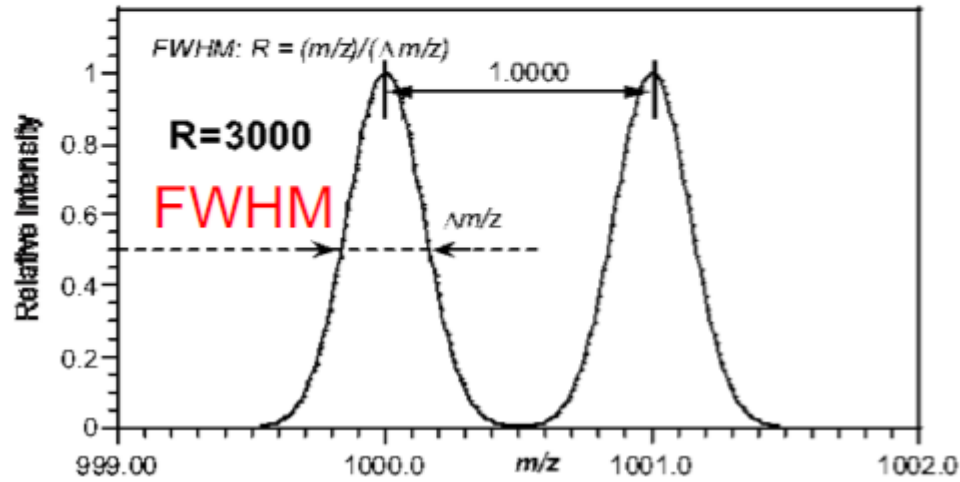


Se la "valle" tra i due picchi scende sotto il 10% dell'altezza massima, i picchi sono considerati ben risolti (separati).

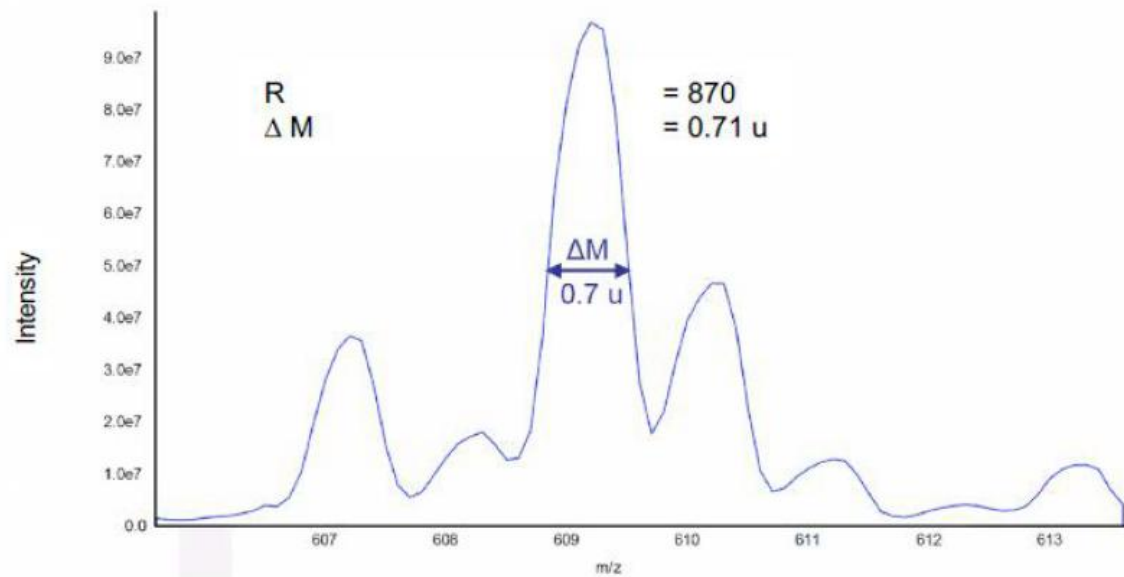
Perché è importante: Maggiore è il potere risolutivo, maggiore è la precisione con cui possiamo identificare la composizione elementare di una molecola.

$$R = (m/z)_0 / \text{FWHM}(m/z)$$

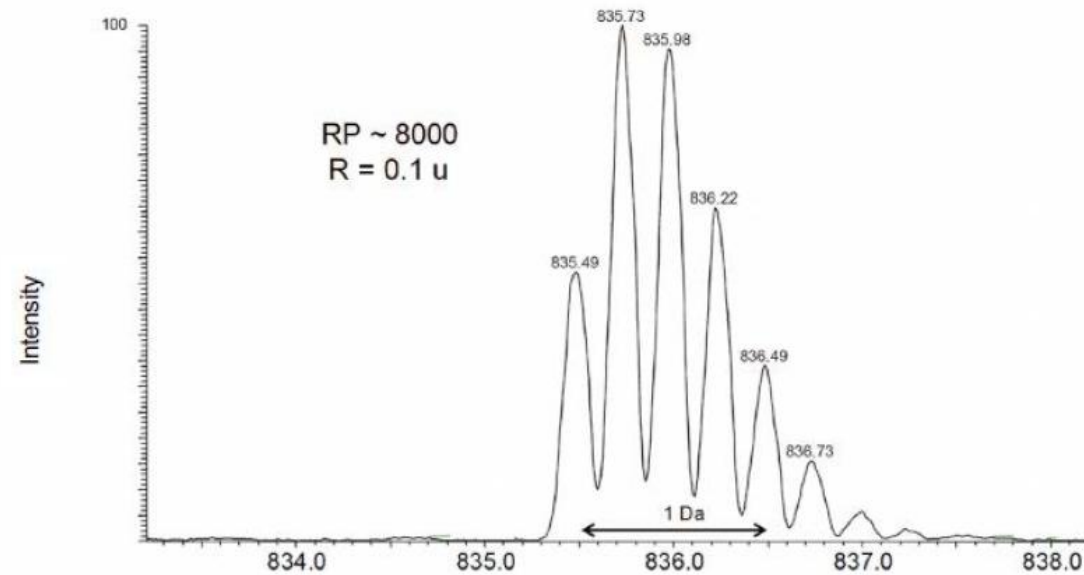
FWHM: full width at half maximum



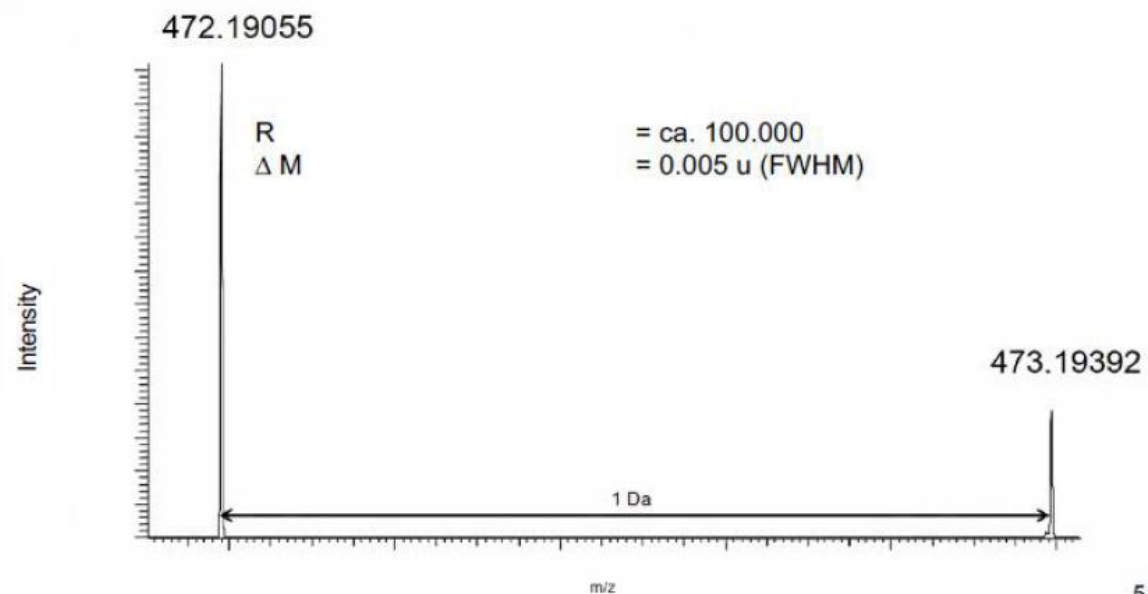
low resolution



moderate resolution



high resolution



Accuratezza di massa

L'**accuratezza di massa** descrive quanto il valore di massa misurato sia vicino alla massa vera o teorica dello ione. Non dice se il picco è ben separato dagli altri, ma quanto la posizione del suo massimo o del suo centroide corrisponda al valore atteso.

$$\text{Accuratezza} = \frac{m_1 - m_2}{m_2} = \frac{\Delta m}{m_2}$$

m_1 il valore di massa misurata

m_2 il valore di massa esatta

Come si misura o si calcola: si confronta la massa osservata con quella teorica usando errore assoluto o errore relativo: **errore in ppm = ((massa misurata - massa teorica) / massa teorica) × 10⁶**. Si valuta anche la stabilità della calibrazione interna o esterna dello strumento.

Esempio: una molecola con massa esatta (teorica) **500.0000 Da** misurata a **500.0025 Da** ha un errore assoluto di **0.0025 Da**, cioè **5 ppm** a m/z 500. Un altro segnale misurato a **500,0500 Da** avrebbe invece un errore di **100 ppm**, molto meno affidabile per l'assegnazione della formula.

Perché è importante: un'elevata accuratezza di massa consente di restringere drasticamente le formule possibili, distinguere composti isomerici o quasi isobarici e aumentare la fiducia nell'identificazione. In HRMS, spesso pochi ppm fanno la differenza tra una formula corretta e una sbagliata.

- Mass error in millimass units (mmu)

$$[\text{measured mass (u)} - \text{theoretical mass (u)}] \times 1000$$
- Mass error in parts per million (ppm)

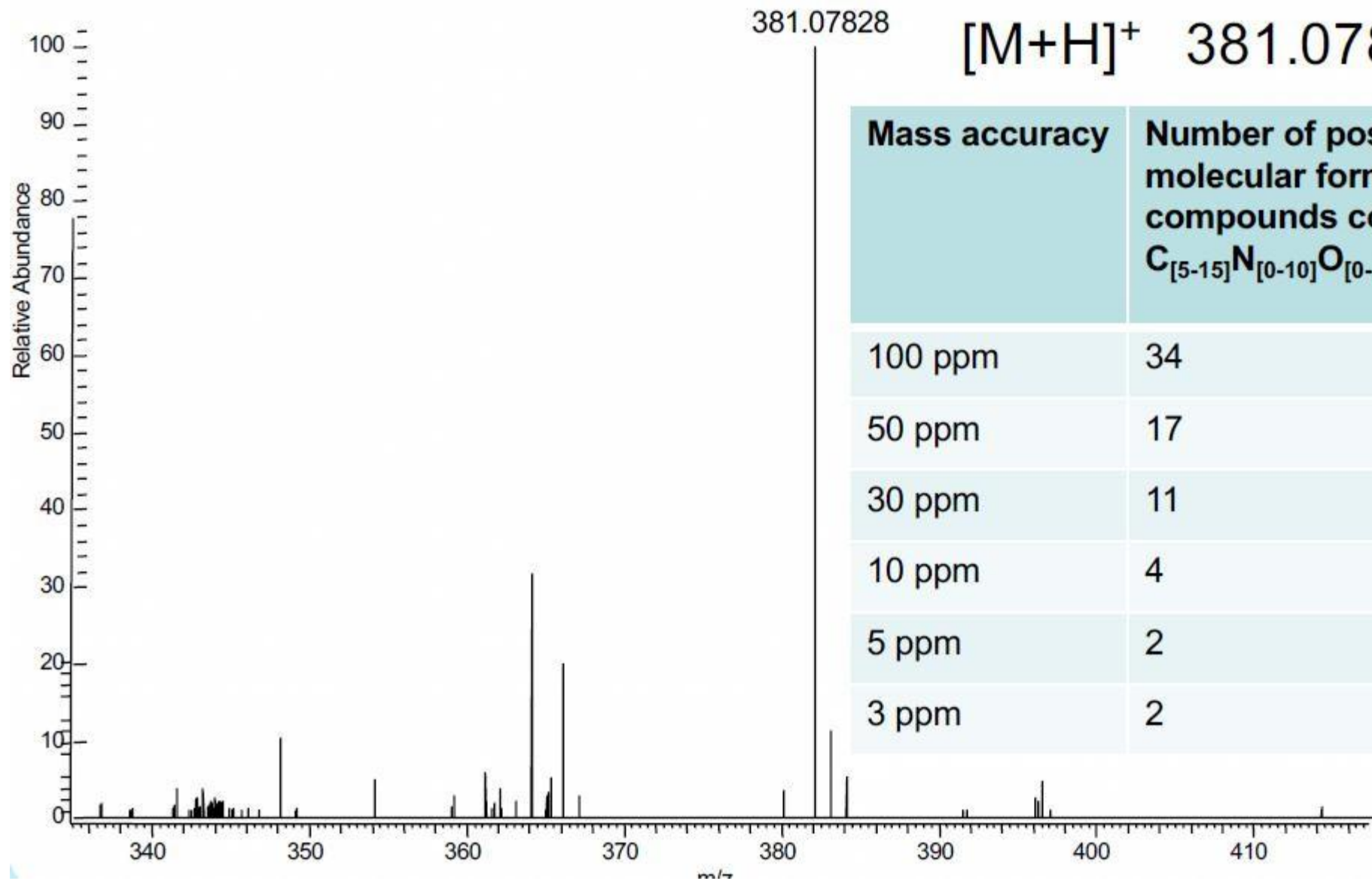
$$\frac{[\text{measured mass (u)} - \text{theoretical mass (u)}] \times 1000000}{\text{theoretical mass (u)}}$$

Measured Mass	Theoretical Mass	Mass Difference (u)	ppm error
200.0020	200.0000	0.002	$(0.002/200)1e^6 = 10 \text{ ppm}$
400.0020	400.0000	0.002	$(0.002/400)1e^6 = 5 \text{ ppm}$
800.0020	800.0000	0.002	$(0.002/800)1e^6 = 2.5 \text{ ppm}$
1000.0020	1000.0000	0.002	$(0.002/1000)1e^6 = 2 \text{ ppm}$
		Constant with mass	Varies with mass

SPETTROMETRIA DI MASSA

Potere Risolutivo, Risoluzione e accuratezza di massa

Mass Analyzer	Mass Range (u)	Mass Resolution	Mass Accuracy (ppm)
Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT ICR)	30.000	1.000.000+	< 1 (@ 400 u)
Orbitrap	50.000	500.000	< 2 (@ 100-2000)
Magnetic Sector (BE)	20.000	100.000	< 10
Time-of-Flight (TOF, RTOF)	> 1.000.000	5.000-20.000	200; 5-10
Quadrupole (Q)	4.000	2.000	100
Iontrap (IT)	6.000	4.000	100



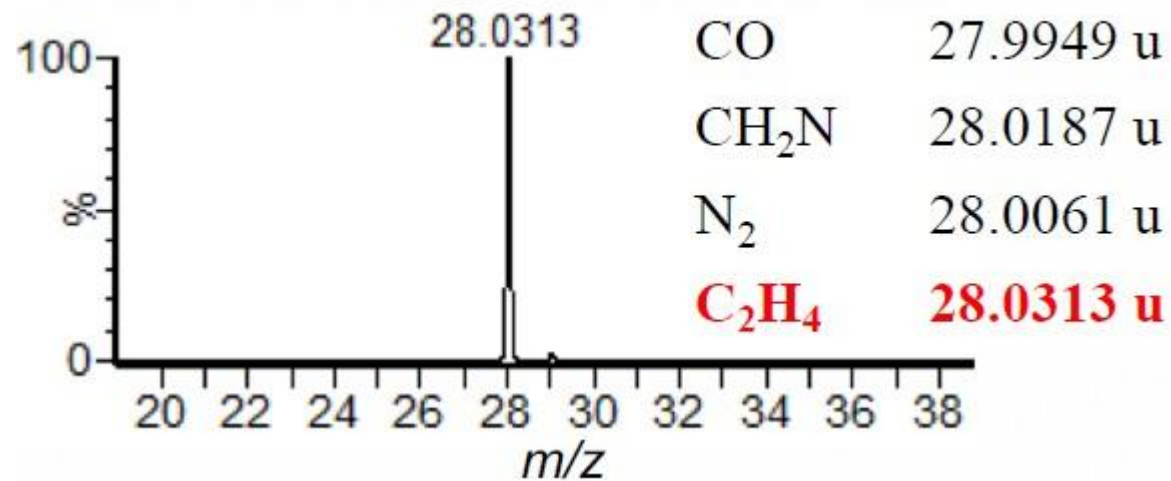
381.07828

$[M+H]^+$ 381.07828

Mass accuracy	Number of possible molecular formulae for compounds containing $C_{[5-15]}N_{[0-10]}O_{[0-15]}H_{[0-40]}$
100 ppm	34
50 ppm	17
30 ppm	11
10 ppm	4
5 ppm	2
3 ppm	2

e.g. m/z 28 can have 4 different elemental compositions with different exact mass values.

CO	27.9949 u	CH ₂ N	28.0187 u
N ₂	28.0061 u	C ₂ H ₄	28.0313 u

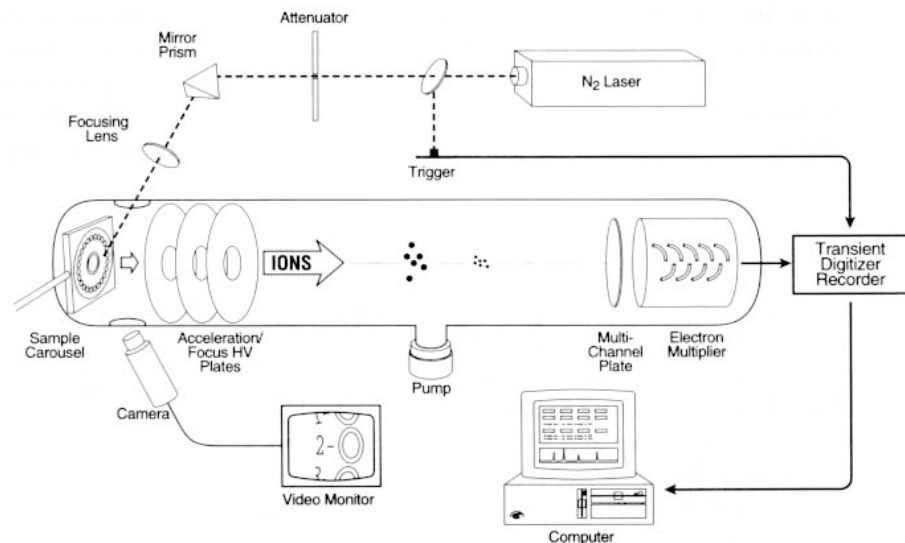


ANALIZZATORI DI MASSA AD ALTA RISOLUZIONE – Tempo di volo (TOF)

Due sono gli stadi in cui si articola il suo funzionamento:

1. accelerazione degli ioni
2. misura del tempo di volo

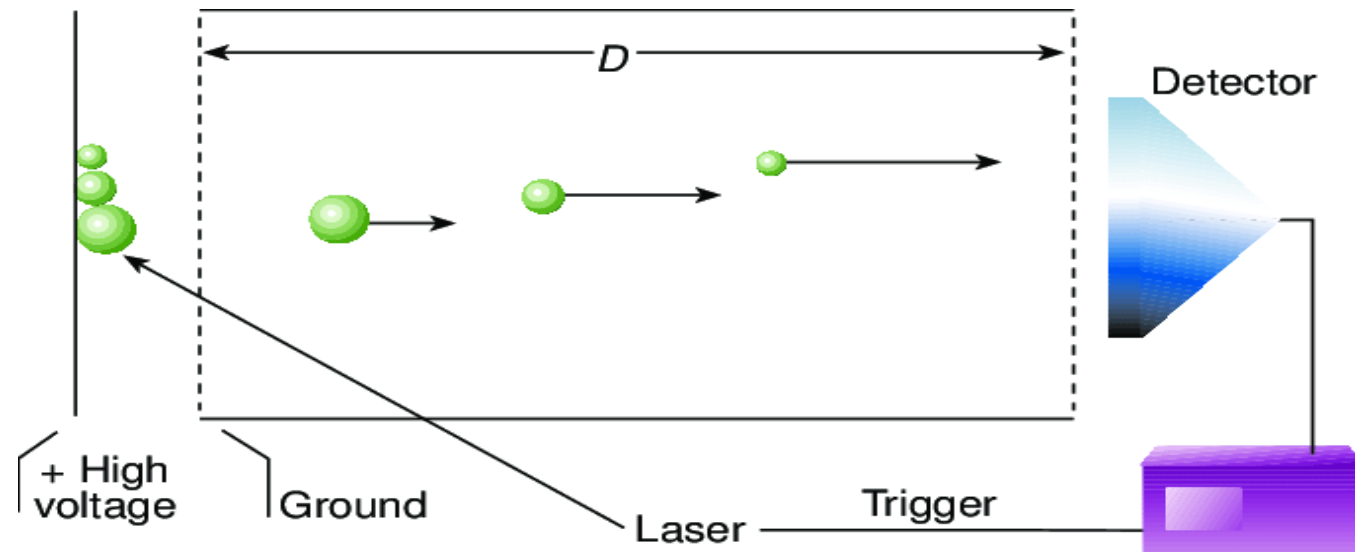
Gli ioni sono formati nella sorgente come pacchetto discreto di ioni, inizialmente consistente di ioni con diversi valori di m/z , che è pulsato (mediante le slitte di accelerazione all'uscita della sorgente) nella regione del tubo di volo (lungo 30-100cm) libera da campi elettrici.



- Il principio essenziale dell'analizzatore a tempo di volo è che se gli ioni con differenti masse sono accelerati alla stessa energia cinetica, ciascuno ione acquista una velocità caratteristica che dipende dal suo valore di m/z .
- Ciascuno ione ha un'energia cinetica zV e poiché tutti gli ioni hanno essenzialmente la stessa energia le loro velocità sono inversamente proporzionali alle radici quadrate delle loro masse.
- Ioni con differenti m/z si separano spazialmente viaggiando lungo il tubo di volo: ioni con bassi rapporti m/z , essendo più veloci viaggiano in testa e colpiscono il detector prima degli ioni con rapporti m/z più alti.

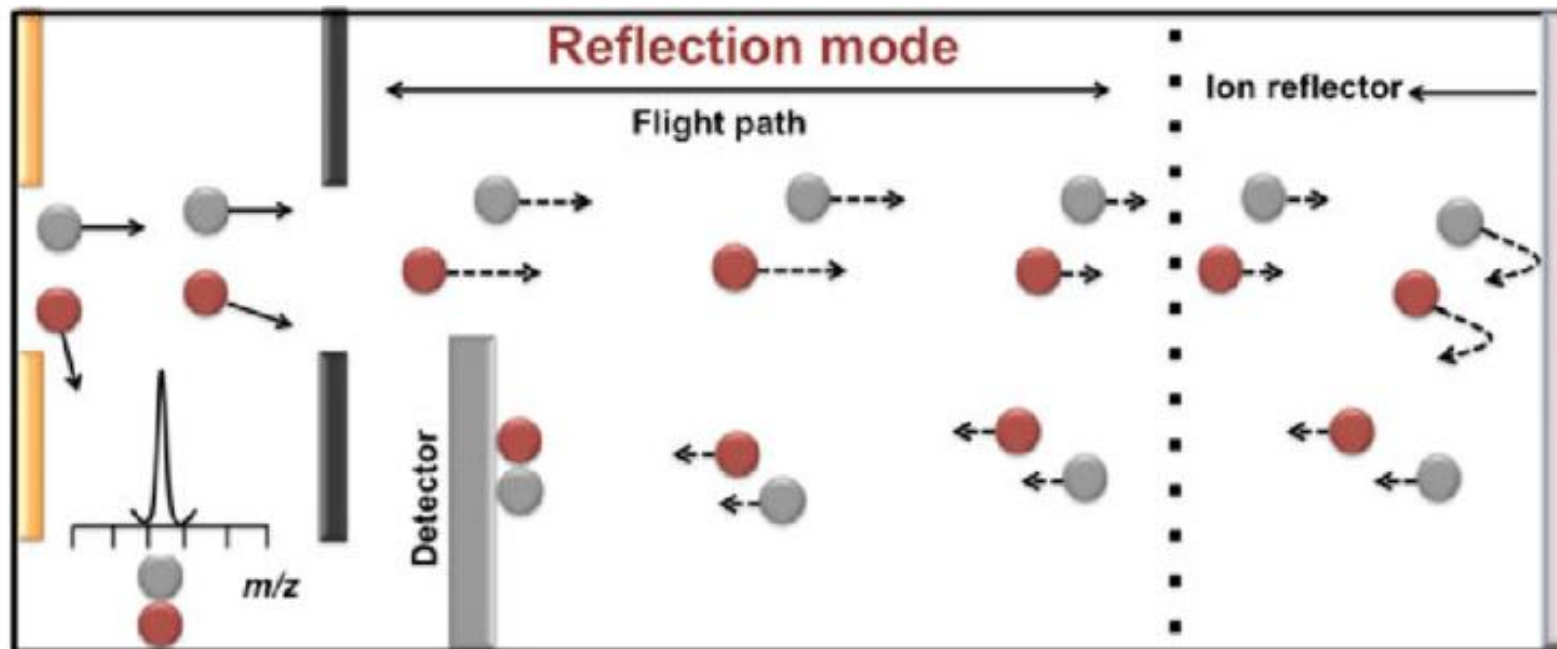
Il tempo di volo presenta altri **vantaggi** oltre alla sua *semplicità e robustezza*:

- *la velocità*: l'intero spettro di massa è ottenuto in ogni singolo ciclo di misura senza necessità di scansione di voltaggi e correnti ed i tempi di volo richiedono da 1 a 30 μs ;
- *la sensibilità*: poiché gli ioni attraversano pochi elementi ottici, la loro trasmissione dal punto di ionizzazione al detector è usualmente più alta di qualsiasi altro analizzatore (si potrebbe arrivare ad analizzare quantità femtomolari);
- *un intervallo di masse da analizzare praticamente illimitato* (potrebbero essere rilevati ioni a singola carica fino a 1Mda).



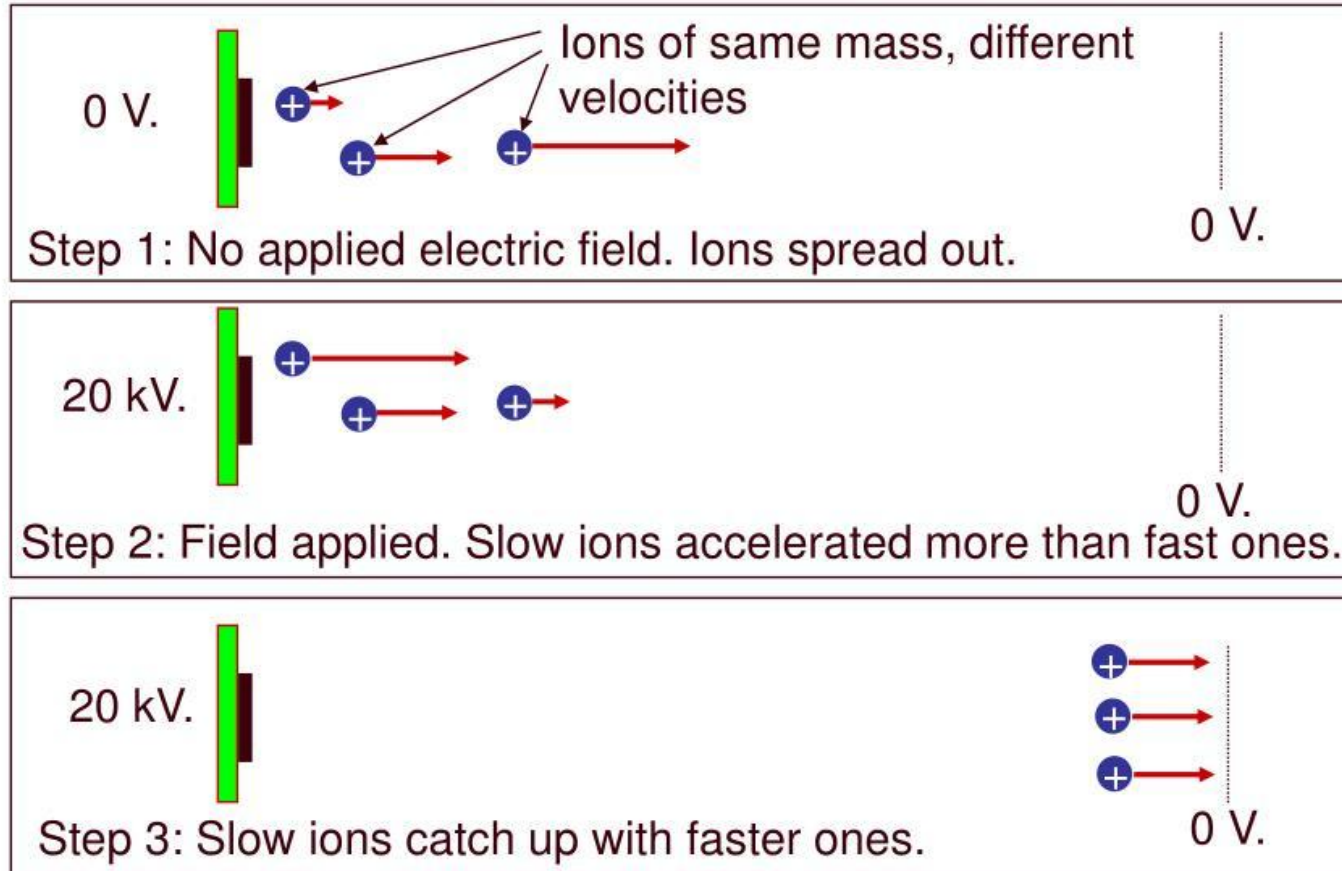
Il Reflectron: TOF a riflessione

Si definisce Reflectron uno spettrometro di massa a tempo di volo in cui la **correzione delle differenze energetiche di un gruppo di ioni con lo stesso valore di m/z** viene realizzato grazie all'uso di un **campo elettrico di decelerazione (Reflector)**: in un tale dispositivo gli ioni con lo stesso m/z ed energie cinetiche differenti sono dapprima **rallentati, poi fermati ed infine respinti** (per azione di un potenziale dello stesso segno della polarità degli ioni) con **un'inversione della loro direzione di volo**. Gli ioni a più alta energia penetrano più profondamente nel campo di riflessione e quindi vi trascorrono più tempo di quelli a bassa energia. Se l'azione ritardante del campo del reflector è adeguata, **questo effetto compensa le differenze nel tempo di volo di ioni con lo stesso m/z** ed il pacchetto viene rifocalizzato in uscita.



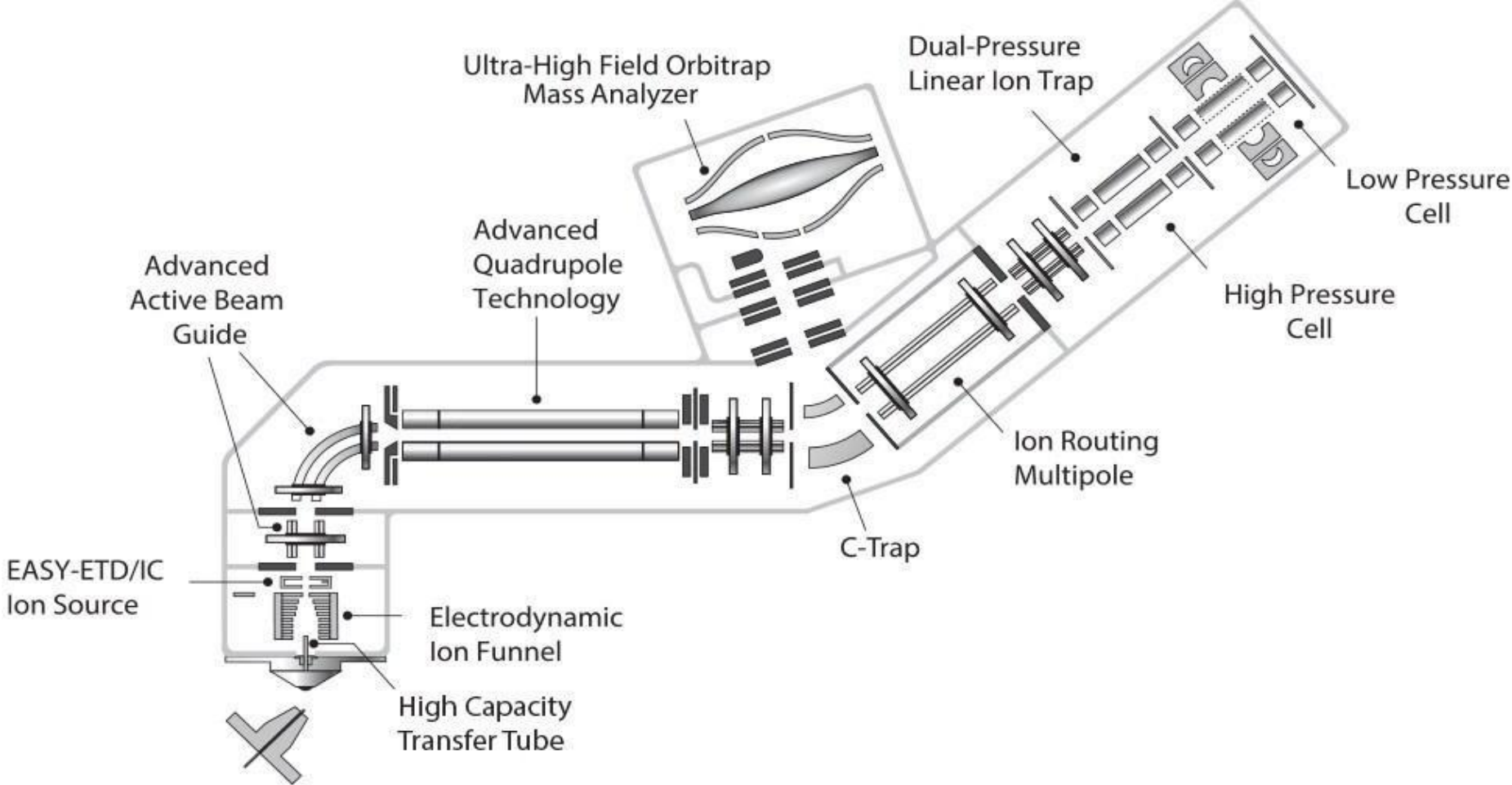
DELAYED EXTRACTION

Delayed Extraction (DE) improves performance



La delayed extraction compensa la diversa velocità iniziale degli ioni.

ANALIZZATORI DI MASSA AD ALTA RISOLUZIONE - Orbitrap



L'Orbitrap è composto da tre elettrodi principali che creano un campo elettrostatico:

- **Elettrodo Centrale:** A forma di fuso
- **Elettrodi Esterni:** Due elettrodi a forma di coppa che racchiudono quello centrale.

2. Il Movimento degli Ioni (Orbital Trapping)

Quando gli ioni vengono iniettati tangenzialmente nell'Orbitrap, rimangono "intrappolati" grazie all'equilibrio tra:

1. **Attrazione elettrostatica** verso l'elettrodo centrale.
2. **Forza centrifuga** dovuta alla loro velocità iniziale.

Gli ioni iniziano quindi a compiere delle **orbite complesse** attorno all'elettrodo centrale, ma il movimento che ci interessa davvero è quello **assiale** (avanti e indietro lungo l'asse del fuso).

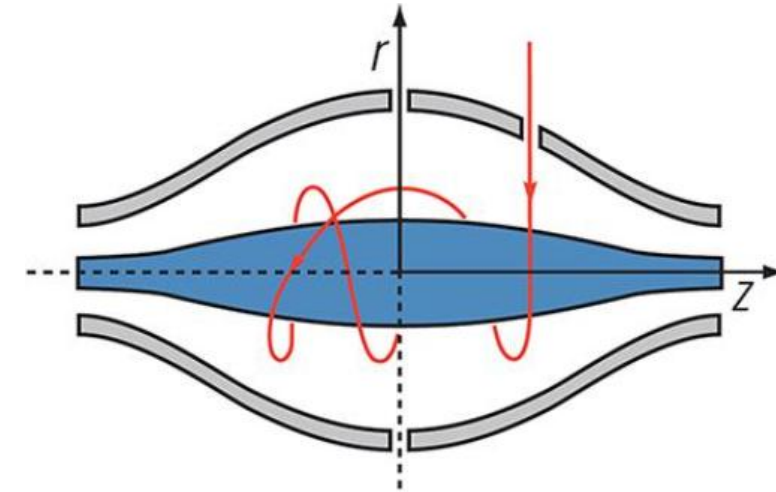
3. La Trasformata di Fourier (FT)

A differenza di altri strumenti, l'Orbitrap non colpisce un detector fisico.

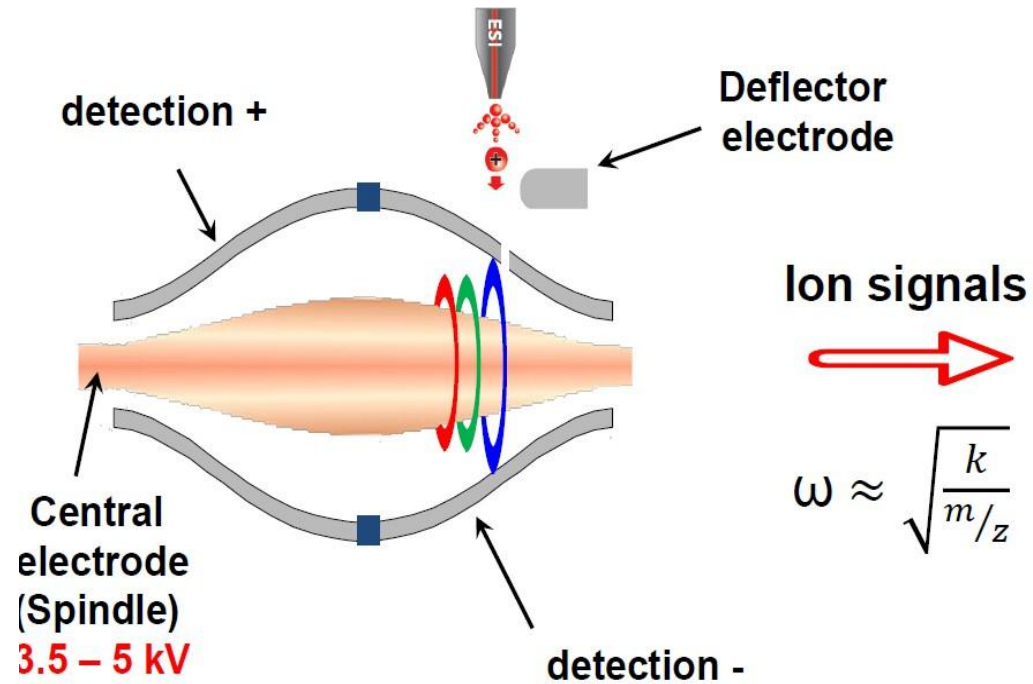
- **Rilevazione:** Gli ioni che oscillano avanti e indietro inducono una **corrente d'immagine** (*Image Current*) sugli elettrodi esterni.
- **Frequenza:** La frequenza di questa oscillazione (ω) dipende esclusivamente dal rapporto massa/carica (m/z):

$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$$

- **Conversione:** Lo strumento registra un segnale nel tempo (un groviglio di frequenze). Attraverso la **Trasformata di Fourier**, questo segnale viene convertito in uno spettro di massa ad altissima precisione.



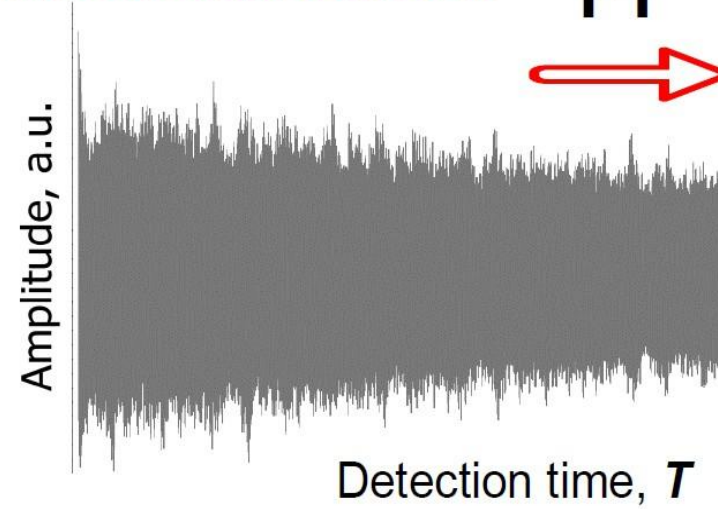
ANALIZZATORI DI MASSA AD ALTA RISOLUZIONE - Orbitrap



$$\omega \approx \sqrt{\frac{k}{m/z}}$$

Time-domain transient

FT



Induced ion current
(signal difference between
1st & 2nd detection electrodes)

2. Mass Spectrun



SPETTROMETRIA DI MASSA E SCIENZE OMICHE – APPLICAZIONI UNTARGETED

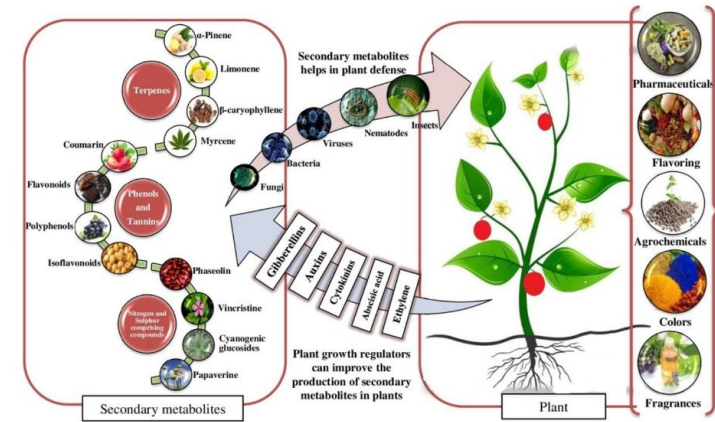
Metabolomica

Si tratta della scienza delle "piccole molecole", principalmente riferita a prodotti naturali e metaboliti secondari.

Approccio metabolomico non mirato basato su UHPLC-HRMS fingerprinting

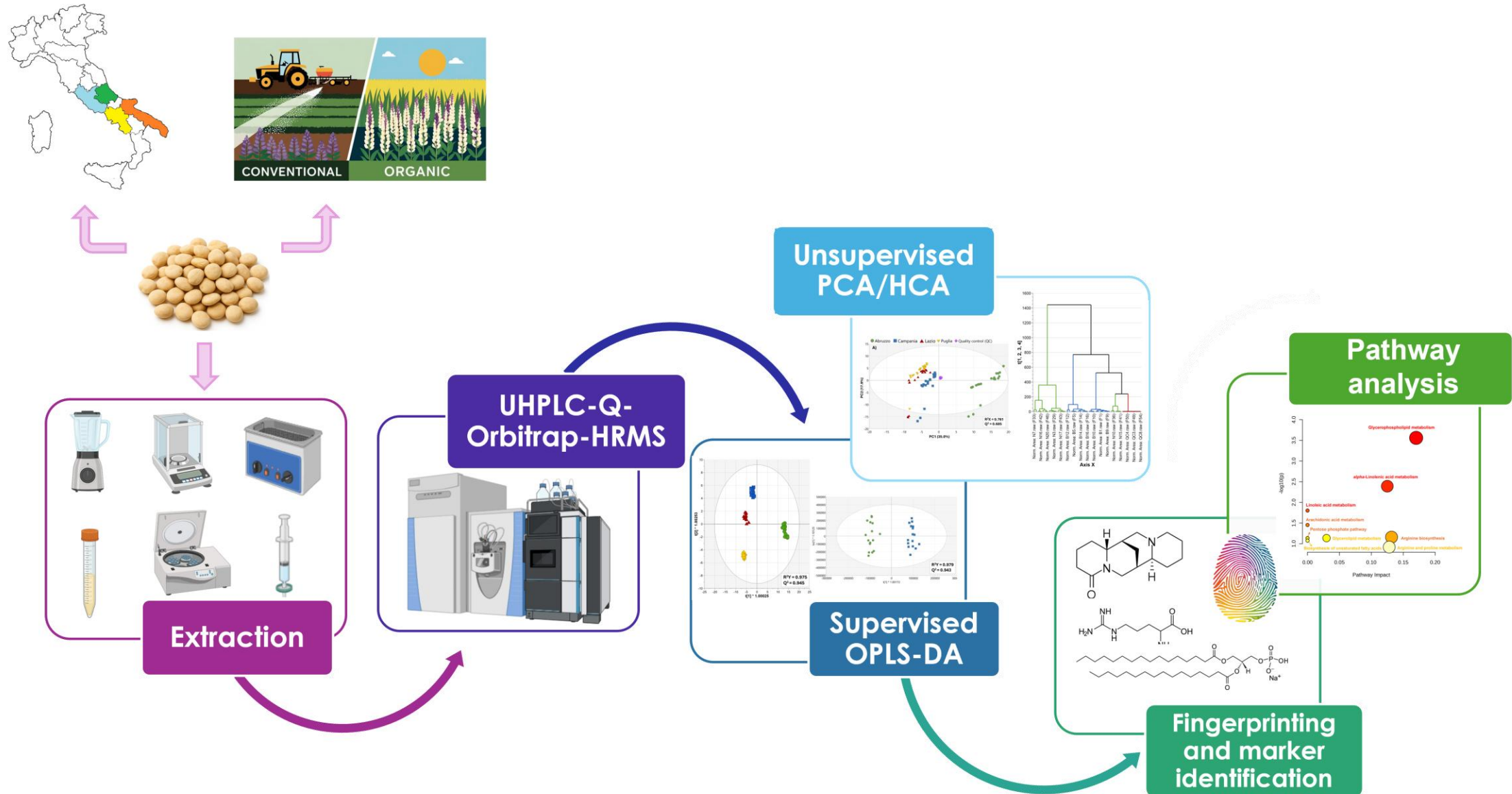


Ha fornito nuove prospettive applicative e di ricerca in aree quali la scoperta di biomarcatori, lo sviluppo di farmaci, la nutrizione e la scienza delle piante.

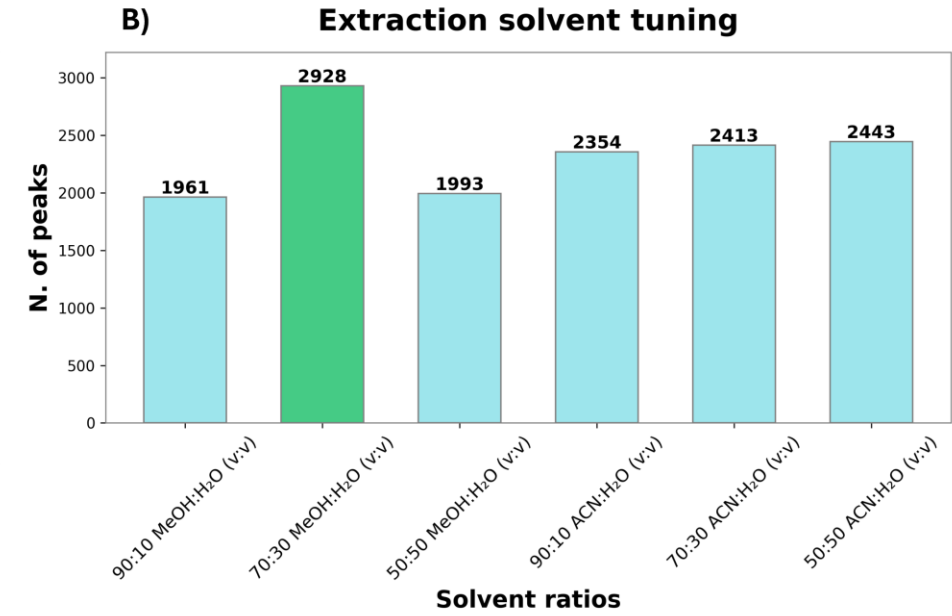
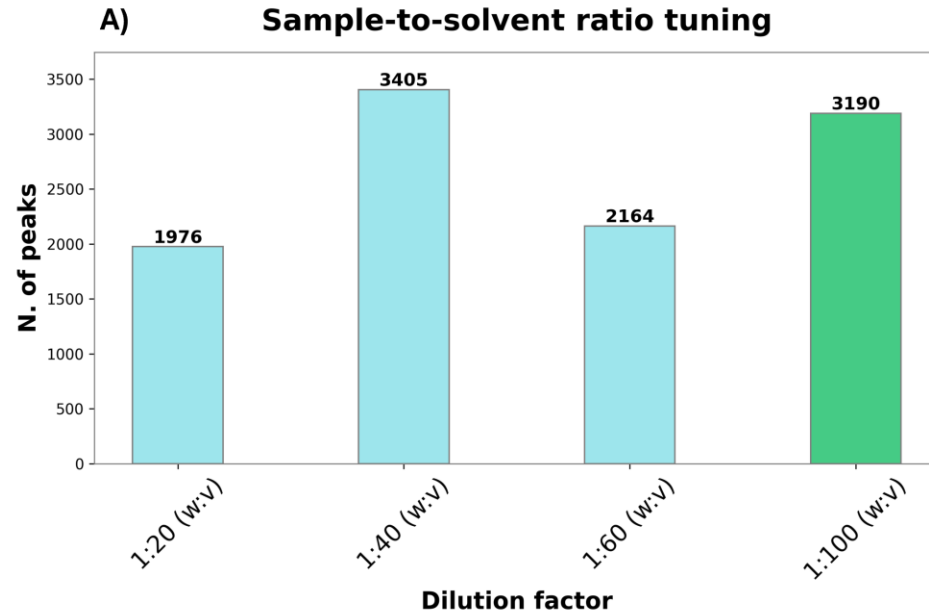


- La preparazione, l'estrazione e l'analisi del campione seguono protocolli semplificati
- Le differenze tra i campioni vengono rilevate tramite analisi multivariata applicata a picchi non ancora identificati
- I metaboliti marcatori vengono identificati successivamente per discriminare diverse categorie di campioni.

Analysis Workflow – Untargeted analysis of lupins metabolome



Extraction tuning:



Extraction procedure:



Homogenization
and sampling

Weighing of
50 mg of
sample

Extraction with 5 mL
of MeOH:H₂O 70:30
(v:v) + UAE for 30 min

Centrifugation
at 5000 RPM
for 10 min

Filtration
with 0.22
µm PTFE

Untargeted fingerprinting by UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS



H₂O 0.1%
HCOOH

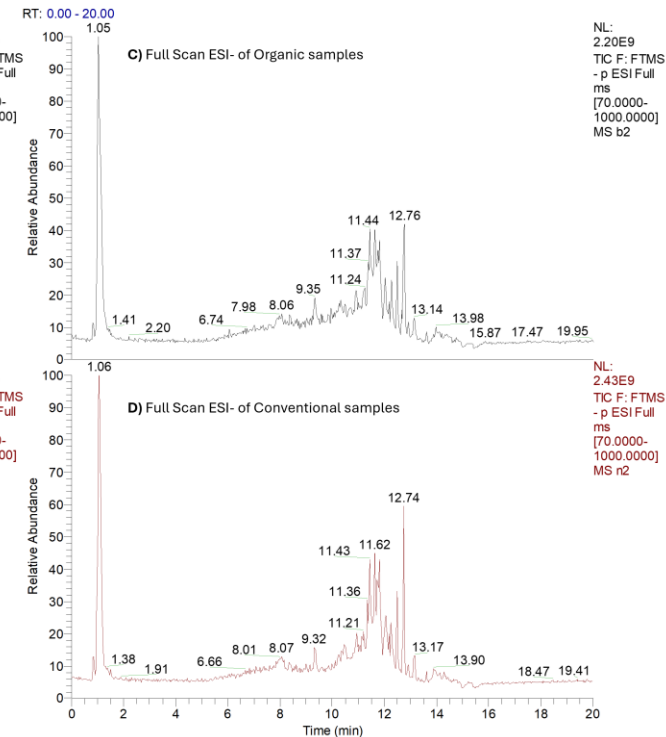
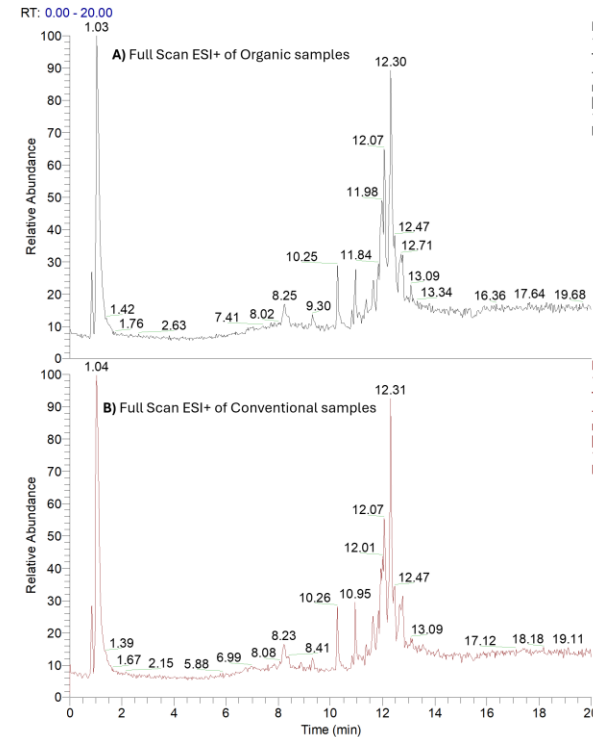
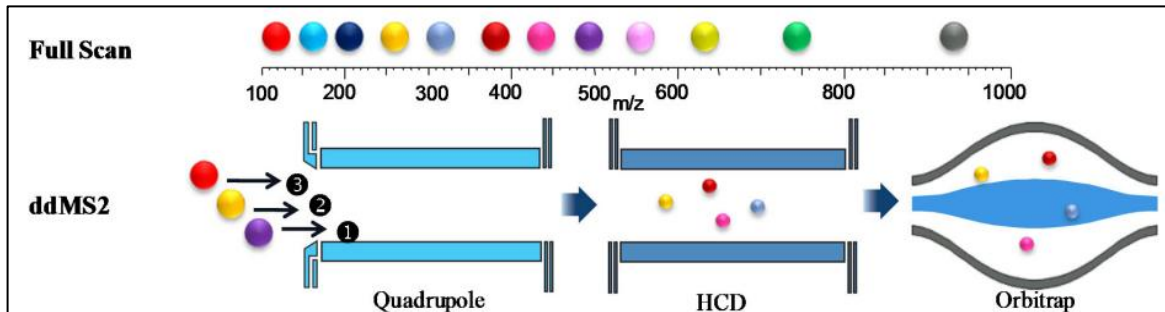


MeOH



ACE Excel 2 C18-PFP, packed with particles of 2 μm.

Flow rate: 250 μL/minute
Time of analysis: 20 min
Injection volume: 5 μL

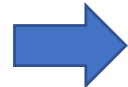
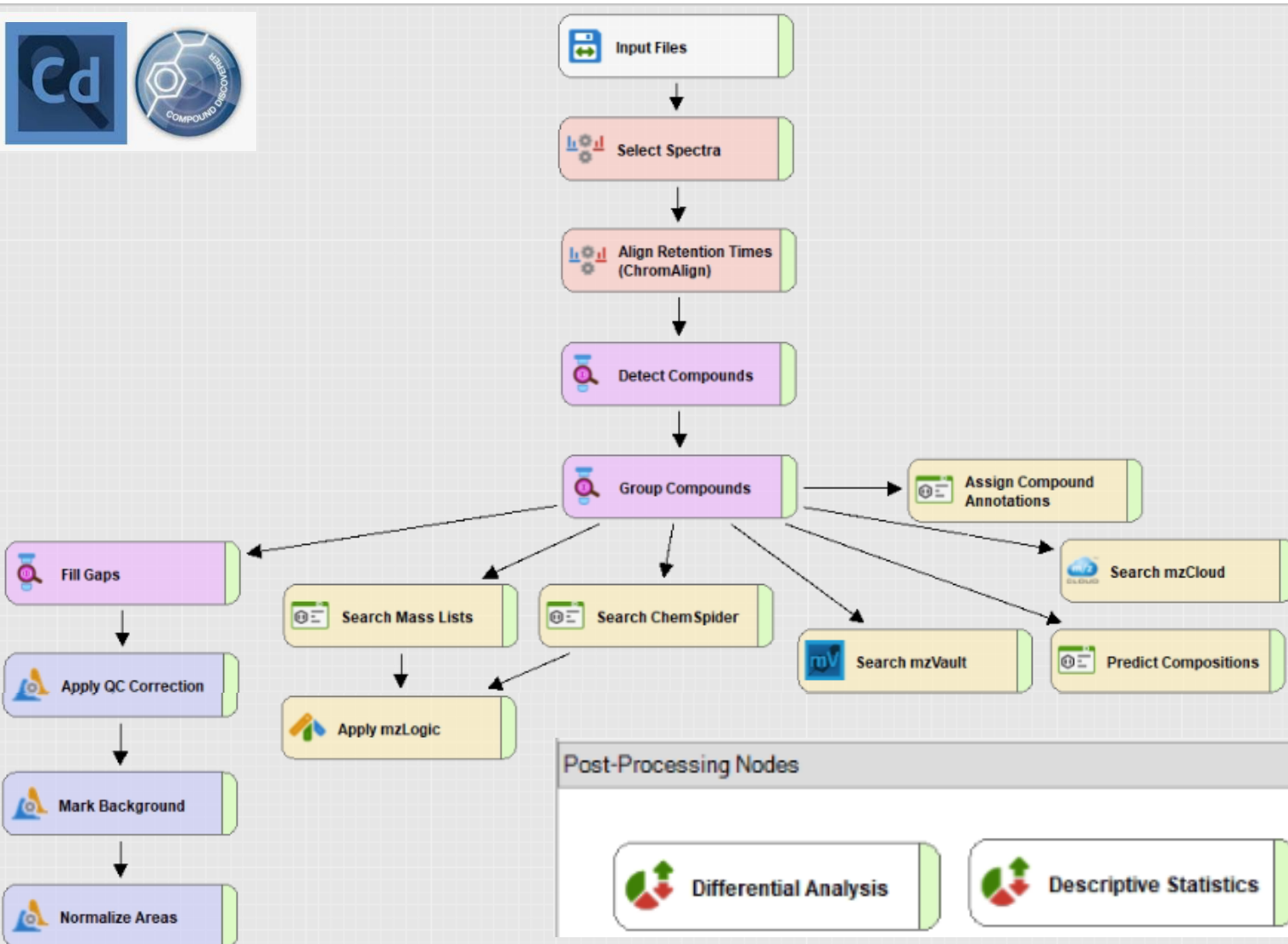


Source: HESI positive and negative

NCEs = 20, 35, and 55 eV

Resolution power = 70000 FWHM

Processing data on Compound Discoverer software



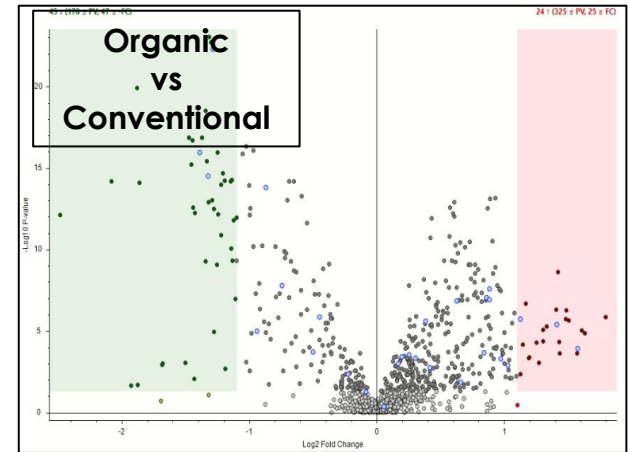
Results:
More than 1000
detected metabolites

- Predicted Compound name
- Chemical formula
- Chemical structure
- Retention Time
- Area
- Molecular weight
- Precursor ion m/z
- ddMS2
- Adjusted p-Value
- Log2(FC)

Univariate analysis results from Compound Discoverer

Geographical Origin

Farming Practices



Two-tailed Student's t-test



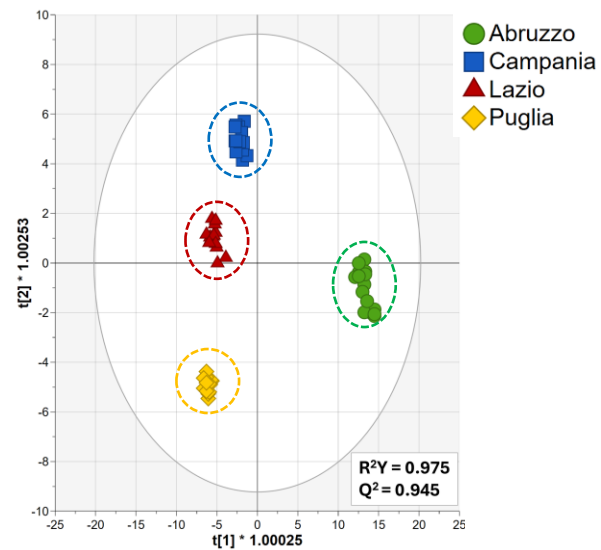
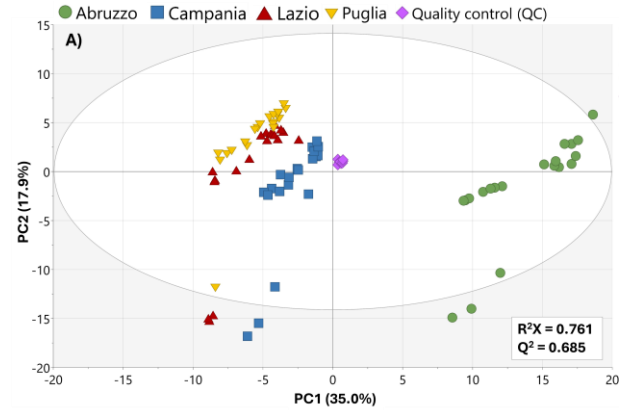
One-way ANOVA with Tukey's post-hoc test

Results:
Log₂ (FC) and adjusted p-value



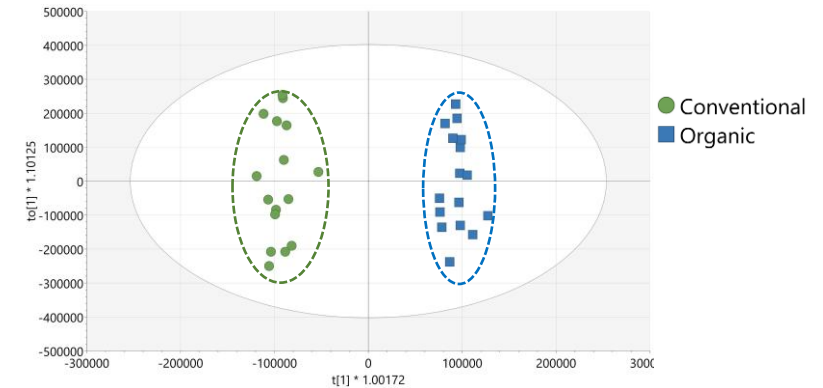
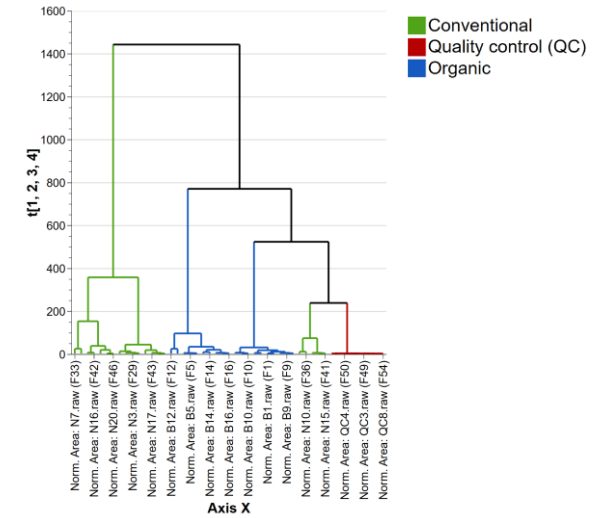
Multivariate analysis

Geographical origin



Variable importance in projection (VIP)

Farming practices



Unsupervised approach:
Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA)

Supervised approach:
Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA)
CV seven-fold

Workflow for marker discovery



Variable importance in projection (VIP) > 1.5

Benjamini-Hochberg adjusted p -values < 0.05

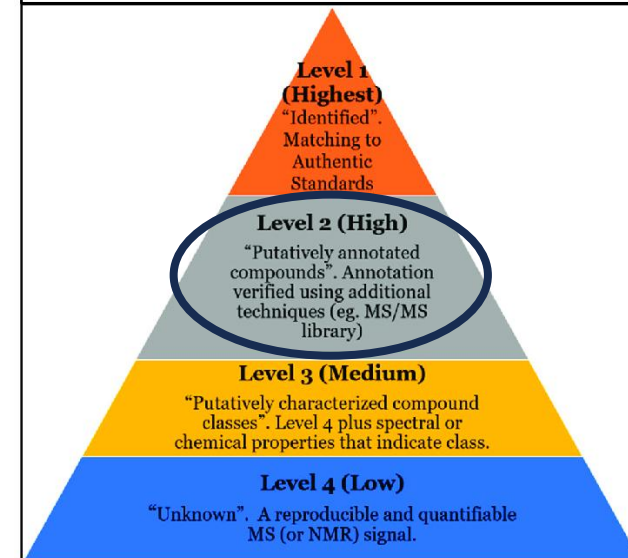
\log_2 Fold Change (FC) cut-off = 0.13

One MS with two MS/MS ions were matched with public databases or *in silico* predictive softwares (mass accuracy < 5 ppm)

Fully overlapping of chromatographic peaks at metabolite retention time ($RT \pm 0.10$ min)

Verification of the potential occurrence of the proposed markers based on literature and specific databases.

Level of confidence for correctly identifying a Metabolite - Metabolomics Standards Initiative (MSI)



MS1

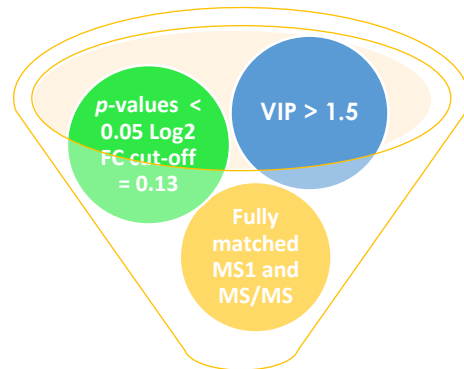
- ChemSpider
- Lipid Maps

MS2

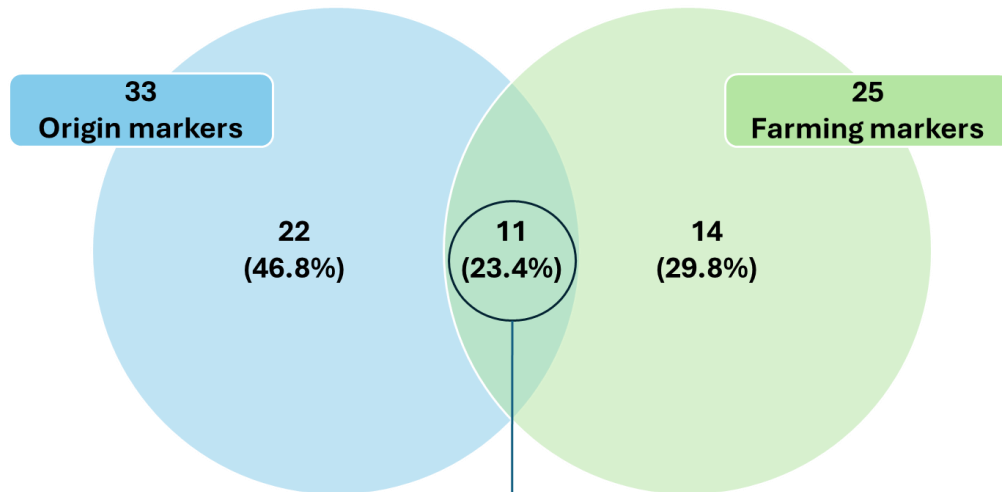
- CFM-ID
- m/z Cloud

- HMDB
- FOODB

Markers Putatively identified through Compound Discoverer and CFM-ID software: LoC=2



Putatively identified markers



- 2 alkaloids
- 1 amino acid
- 1 fatty acid
- 6 glycerophospholipids
- 1 peptide

