

# LC-MS/MS: Analisi Target



# Campione incognito

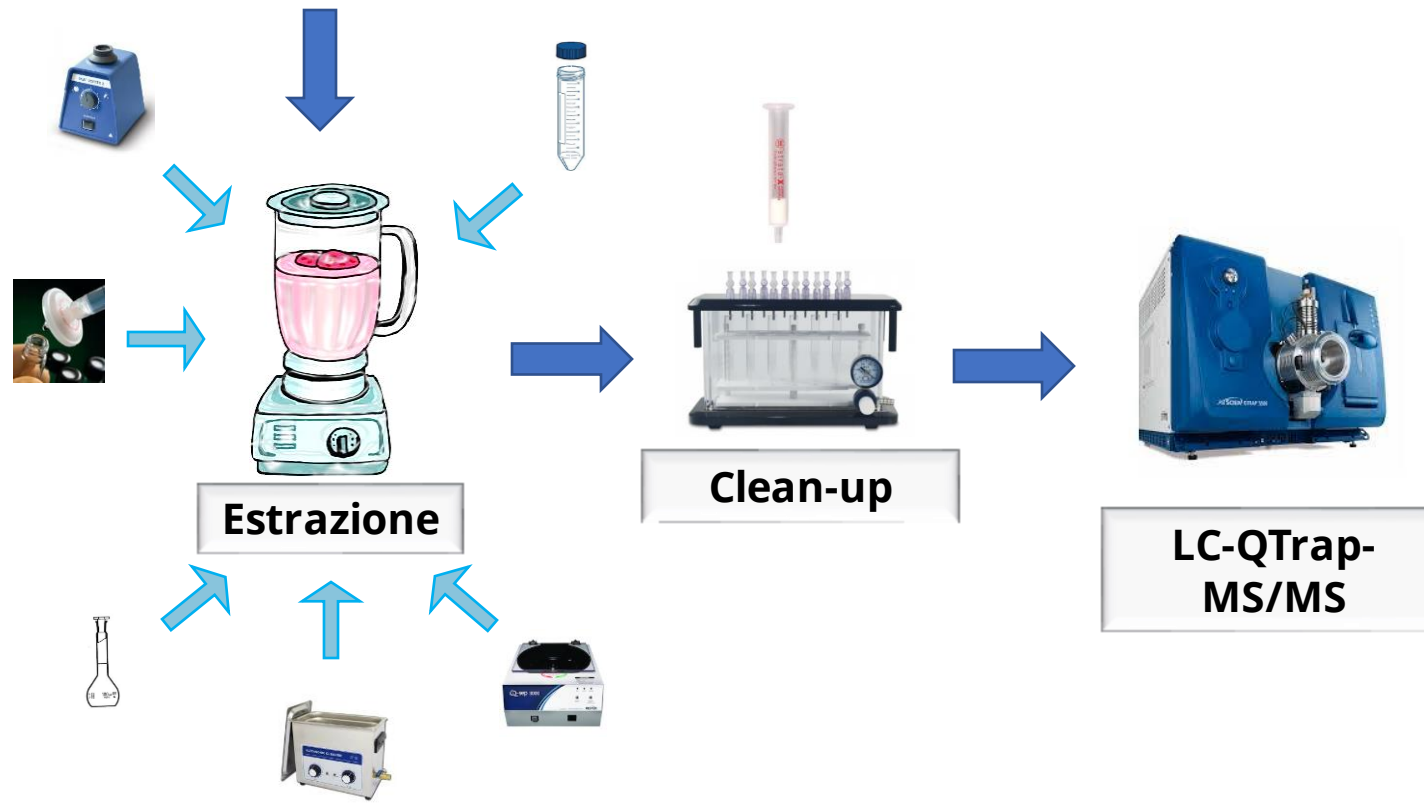


- Che campione è?
- Che tipo di pretrattamenti sono stati fatti?
- In che solvente si trova?
- Quali molecole devono essere rilevate?
- Quali informazioni devono essere ottenute?

# Scopo del lavoro



Matrici alimentari

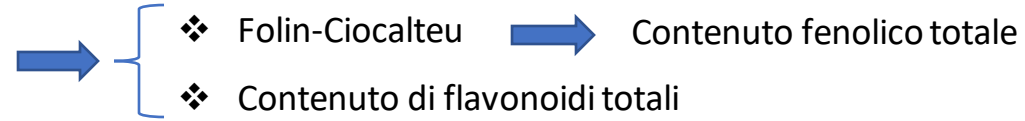


# Analisi

Approcci aspecifici



Spettrofotometro



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

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

TOF

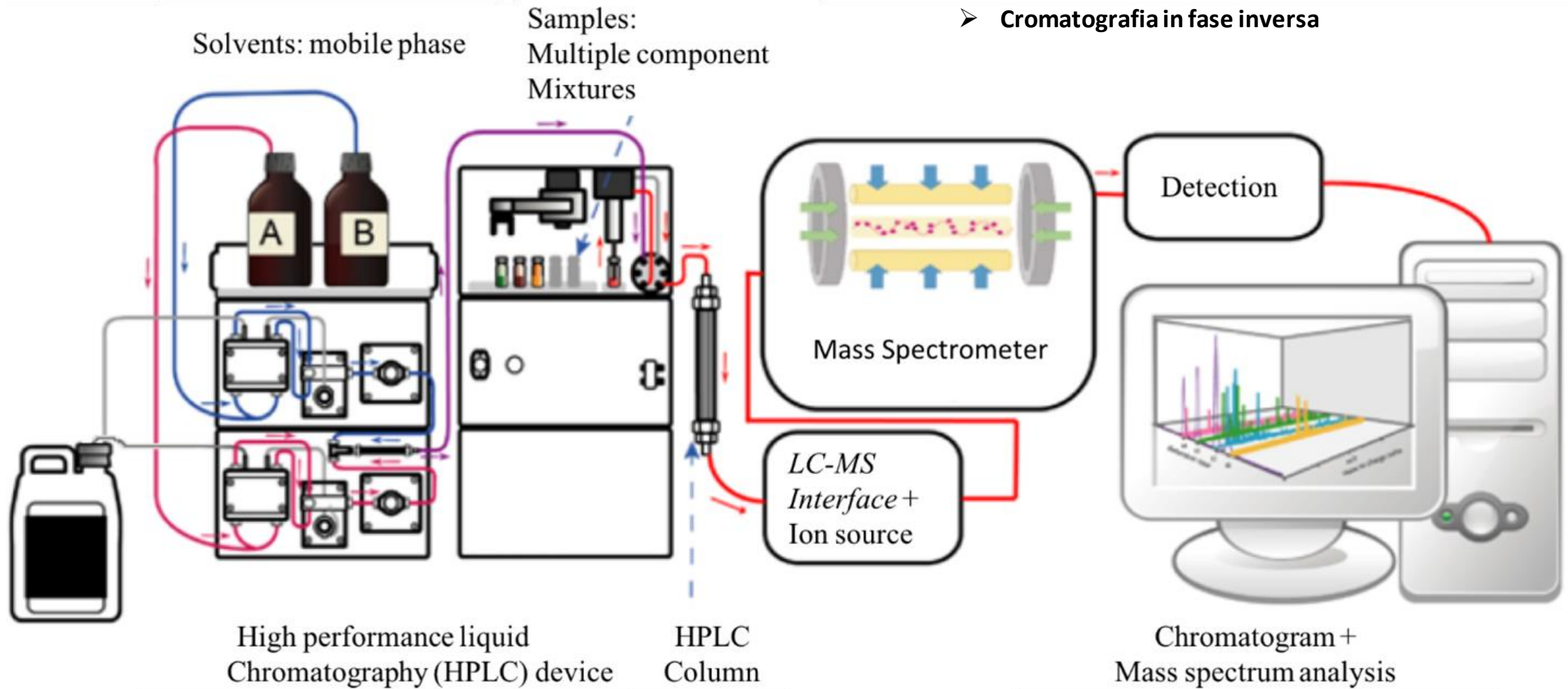
Orbitrap

→ HRMS →

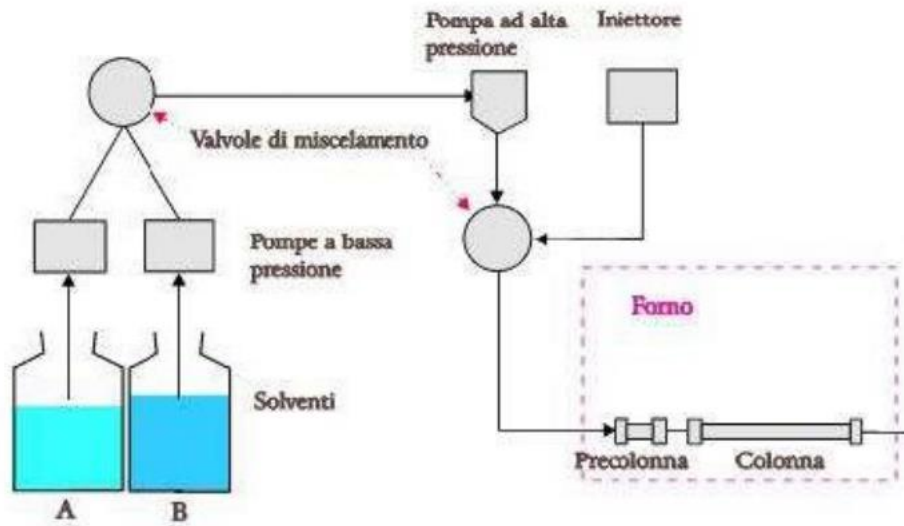
→ Analisi Untargeted

# HPLC-MS/MS

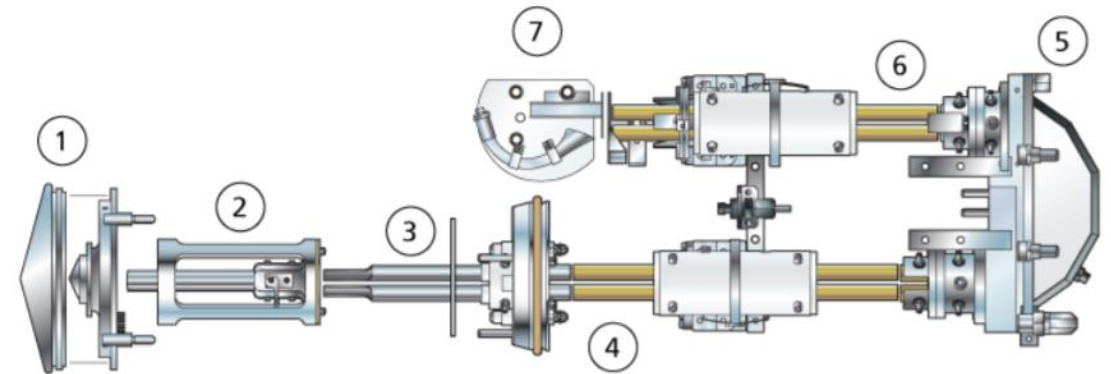
- **Cromatografia in fase diretta**
- **Cromatografia in fase inversa**



# Interfaccia HPLC-MS



Lavora a pressione atmosferica  
Elevata quantità di solvente in uscita



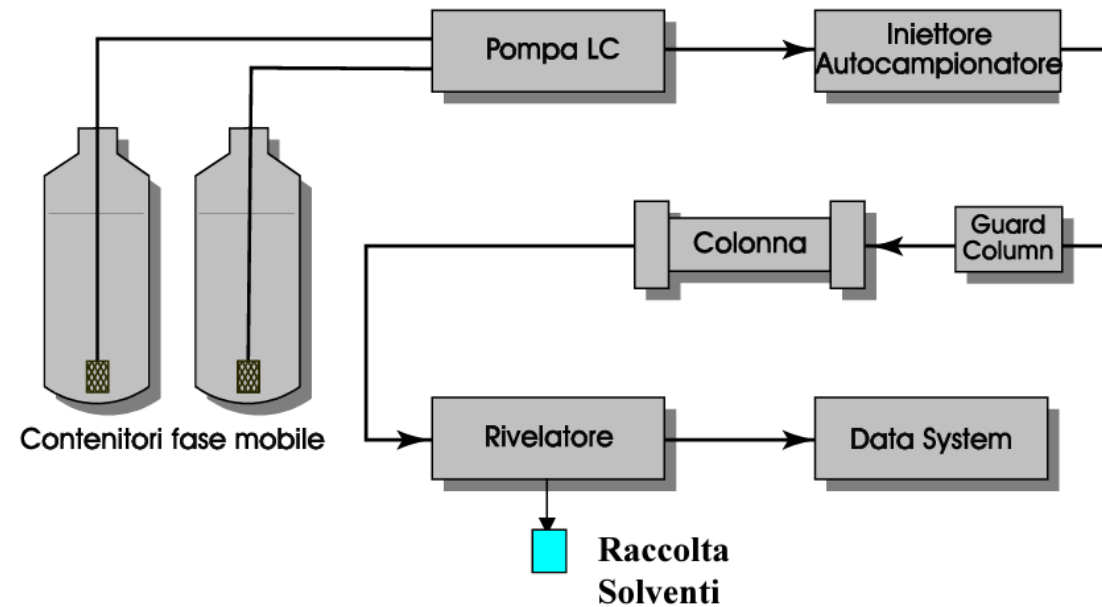
Lavora in condizioni di alto vuoto ( $10^{-5}$ - $10^{-7}$  torr)  
Lavora con ioni

Camera di ionizzazione

Sorgente

# HPLC – High Performance Liquid Chromatography

- Contenitori per la fase mobile
- Pompe
- Sistemi di introduzione del campione
- Colonna
- Riempimento della colonna
- Rivelatori



I moderni strumenti per HPLC sono equipaggiati con diversi contenitori per i solventi che verranno impiegati come fase mobile.

I solventi devono necessariamente essere privi di impurità, compresi gas disciolti e particolato, per non inficiare la bontà dell'analisi; per questo motivo i contenitori integrano spesso degasatori, distillatori e sistemi di filtraggio. Nella maggior parte dei casi i solventi vengono lasciati nei contenitori originali, fatti da materiale inerte (vetro o acciaio inox).

Le separazioni con HPLC possono essere eseguite con eluizione **isocratica**, ossia usando un eluente la cui composizione non varia durante l'analisi, oppure con eluizione a **gradiente**, in cui la natura dell'eluente varia durante l'analisi in maniera continua o a gradini.

# Fasi mobili

Le fasi mobili in HPLC sono usualmente una miscela di uno o più solventi con queste caratteristiche:

- ❖ Proprietà fisiche
  - Elevata purezza, basso costo, trasparenza UV, non corrosive, bassa viscosità, bassa tossicità, non infiammabili, solventi il campione
- ❖ Forza
  - La forza è correlata alla polarità del solvente; l'acqua è un solvente forte in fase normale ma debole in fase inversa
- ❖ Selettività
  - Dipende da interazioni tipo: momento dipolare, dipolo indotto, legame ad H, etc.
  - I solventi dovrebbero essere filtrati e degasati prima dell'uso



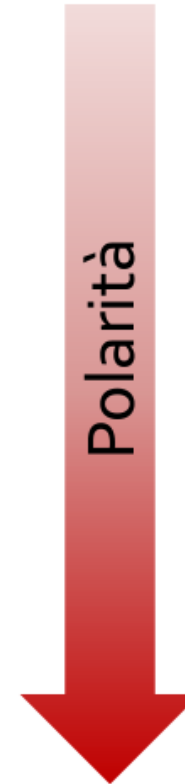


# Solventi utilizzati come fase mobile in HPLC

I solventi si classificano in base alla loro **forza eluente** ( $\epsilon_0$ ), la quale misura l'energia di adsorbimento di vari solventi su una determinata fase stazionaria (ad esempio silice).

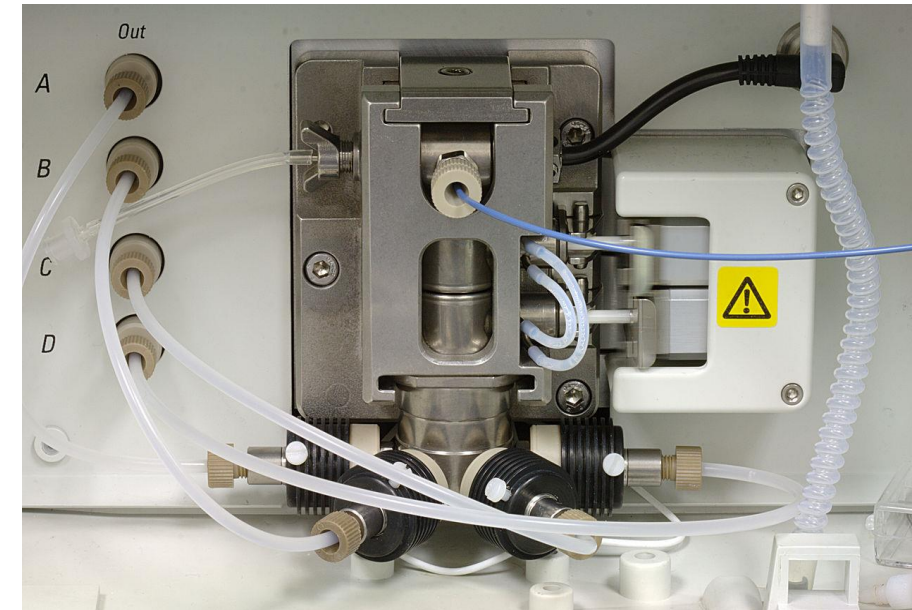
La lista dei solventi così classificati prende il nome di **serie eluotropica**

Solvente	$\epsilon_0$
Pentano	0.00
Esano	0.01
Diclorometano	0.42
Acetato di etile	0.48
Metil tert-butil etere	0.48
Acetonitrile	0.52
Acetone	0.53
Tetraidrofurano	0.53
2-propanolo	0.60
Metanolo	0.70
Acqua	elevata



# Pompe HPLC: Requisiti

- ❖ Fornire elevate pressioni d'ingresso, fino a 5800 psi (circa 400 atm)
- ❖ Fornire flusso di solvente preciso e privo di pulsazioni
  - Flussi di 0.1 mL-5 mL/min per colonne analitiche e 0.01-0.2 mL/min per microbore e fino a 30 mL/min per colonne semi-preparative
- ❖ Essere compatibili con i normali eluenti
  - Le parti bagnabili fatte di materiale inerte (acciaio inossidabile, PEEK, teflon, titanio, etc.)
- ❖ Per pompe a gradiente
  - Pompe da 2 a 4 solventi con programmi a gradiente precisi ed accurati
- ☐ Le più utilizzate: **Pompe alternative a pistone**



# Cromatografia liquida (LC)

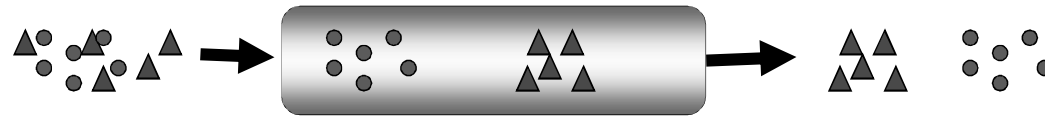
La cromatografia liquida (LC) è una **tecnica di separazione** condotta fra due fasi - una fase solida (Fase stazionaria) e una fase liquida (Fase mobile).

Un campione viene separato nelle sue componenti (o analiti) costituenti distribuendo (via divisione, adsorbimento, o altre interazioni) fra la **fase mobile** (solvente o miscela di solventi) e una **fase stazionaria solida** (particelle sorbenti di silice o silice funzionalizzata impaccate all'interno di una colonna). Per esempio, il liquido che scorre può essere un solvente organico quale l'esano e la fase stazionaria può essere le particelle porose della silice imballate in una colonna.

## ➤ HPLC:

- Cromatografia di ripartizione in **fase diretta** (NPC) – la fase stazionaria è polare mentre quella mobile è apolare.
- Cromatografia di ripartizione in **fase inversa** (RPC) – la fase stazionaria è apolare mentre quella mobile è polare (di solito acqua modificata con un solvente come metanolo o acetonitrile).

# Cromatografia



- Cromatografia di Assorbimento
- Cromatografia di esclusione dimensionale
  - Cromatografia a scambio ionico
  - Cromatografia di ripartizione
- Cromatografia su strato sottile (TLC)

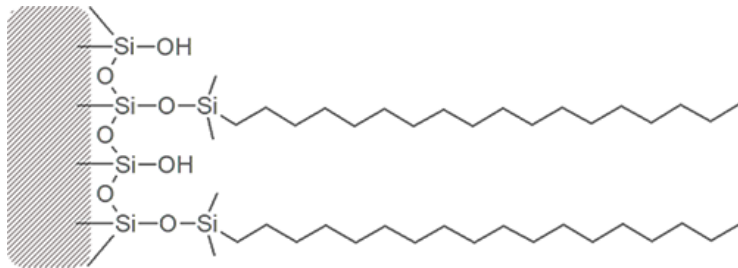
# Colonna cromatografica

- È il mezzo in cui il materiale è separato, ed a seconda dei solventi, gli analiti possono raggiungere diverse velocità di eluizione, in base anche alla loro composizione.
- Il **materiale** più impiegato per la costruzione delle colonne per HPLC è l'acciaio inossidabile levigato, se si opera a pressioni inferiori a 10 atm si usano anche colonne in vetro spesso.
- La **lunghezza** delle colonne è di solito compresa tra 10 e 30 cm, ma è possibile disporre di colonne più lunghe per particolari esigenze.
- Il **diametro interno** è compreso tra 2 e 4,6 mm e il **diametro delle particelle** del riempimento tra 3,5 e 10  $\mu\text{m}$ .
- Esistono anche modelli di colonne, di recente progettazione, più corte e sottili che permettono tempi di analisi inferiori e minor consumo di solvente.
- **Pre-colonne**: colonne di protezione che funge da filtro (più corte delle colonne analitiche) in cui la fase mobile viene fatta passare prima di accedere alla colonna analitica. Aumentando così la vita media della colonna. Inoltre serve anche per saturare la fase mobile con la fase stazionaria, minimizzando quindi le perdite di fase stazionaria nella colonna analitica.

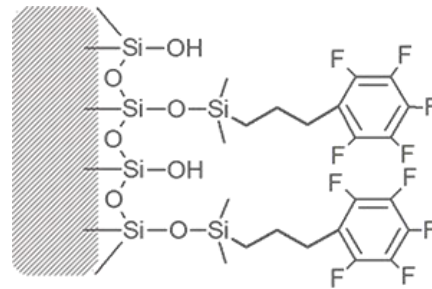
# Colonne per HPLC

- Ciascun analita si ripartisce fra la fase mobile e la fase stazionaria.
- Il tempo di ritenzione ( $t_R$ ) sarà determinato dalla competizione fra le affinità di ciascun analita per la fase mobile (FM) e per la fase stazionaria (FS)

**C18**



**Pentafluorophenyl (PFP)**



**C18-PFP**



# UHPLC – Ultra High Performance Liquid Chromatography

La **cromatografia liquida a ultra alta prestazione** (UHPLC, Ultra High Performance Liquid Chromatography) è una recente implementazione che sfrutta l'avanzamento tecnologico nella costruzione dei componenti strumentali tipici della classica HPLC, come la possibilità di produrre colonne contenenti una fase stazionaria con diametro delle particelle molto minore oltre a pompe e parti meccaniche in grado di operare a pressioni di esercizio ancora più elevate.

La tecnica UHPLC permette di ottenere una separazione delle sostanze eluite caratterizzata da una maggiore efficienza e in tempi notevolmente ridotti, utilizzando come fase stazionaria particelle dal diametro solitamente **<3 µm** e pressioni che possono superare i **1000 bar**. Altra caratteristica corollaria di non secondaria importanza è il ridotto volume di campione iniettato (la sensibilità è nettamente maggiore) e il risparmio di eluente che si ottiene con questa tecnica. L'unico difetto è che la vita delle colonne si abbassa nettamente.



# HPLC vs UHPLC

## HPLC

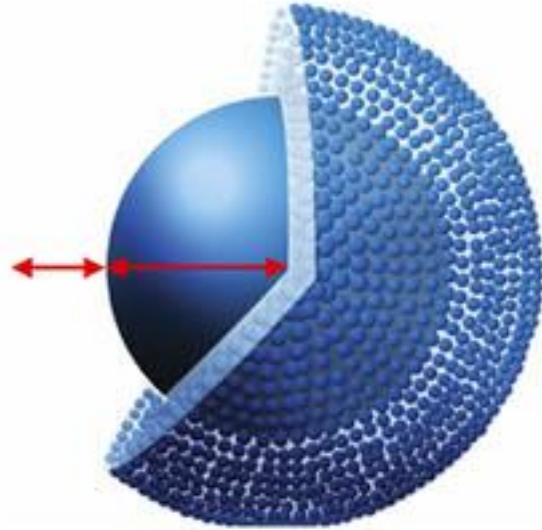
- Impiego di colonne con fase stazionaria con diametro delle particelle tra i 3 e i 10  $\mu\text{m}$
- Massima pressione di esercizio 300-400 bar
- Contropressione: pressioni massime di 400-600 bar (HPLC)
- Maggiore volume di campione iniettato (sensibilità minore) e aumento eluente necessario.
- Portata di flusso: 0.01-5 mL/min
- Volume di iniezione: 5  $\mu\text{L}$
- Minor efficienza

## UHPLC

- Impiego di colonne con fase stazionaria con diametro delle particelle  $<3 \mu\text{m}$
- Massima pressione di esercizio  $>1000$  bar
- Contropressione: pressioni massime fino a 1500 bar (UHPLC)
- Ridotto volume di campione iniettato (maggiore sensibilità) e il risparmio di eluente necessario.
- Portata di flusso maggiore
- Volume di iniezione: 2  $\mu\text{L}$
- Elevata efficienza

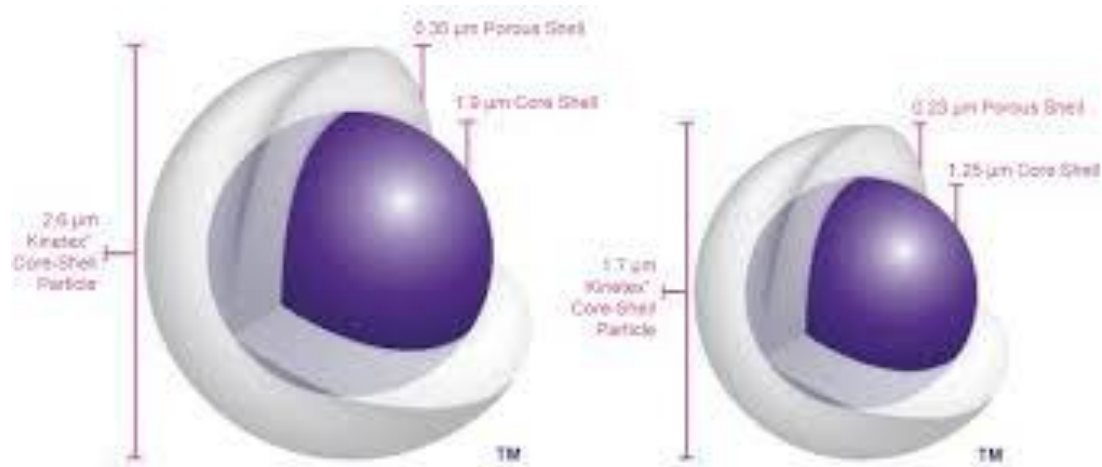


# Particelle Core-Shell



Fully Porous	vs	Kinetex Core-Shell	Average Efficiency Gain with Kinetex*
5 $\mu\text{m}$	vs	5 $\mu\text{m}$	90% Higher
3 $\mu\text{m}$	vs	2.6 $\mu\text{m}$	85% Higher
1.7 $\mu\text{m}$	vs	1.7 $\mu\text{m}$	20% Higher
1.7 $\mu\text{m}$	vs	1.3 $\mu\text{m}$	50% Higher

\*May not be representative of all separations.

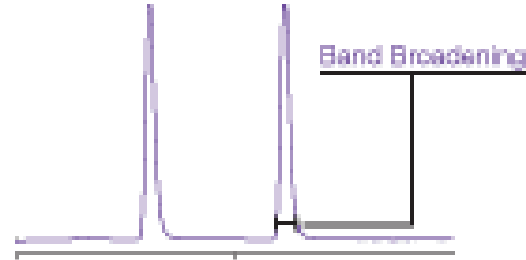
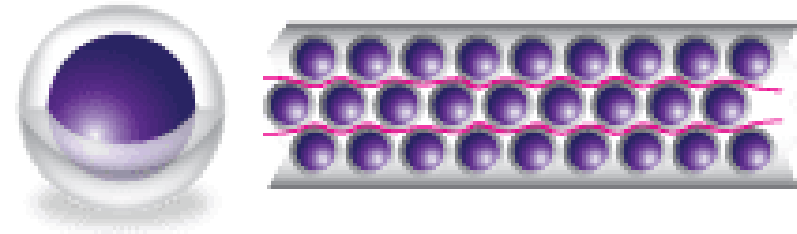


Le particelle core-shell hanno un nucleo di silice non porosa circondato da un sottile strato di silice porosa.

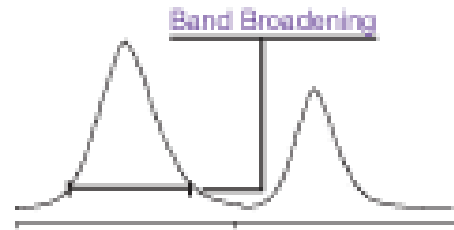
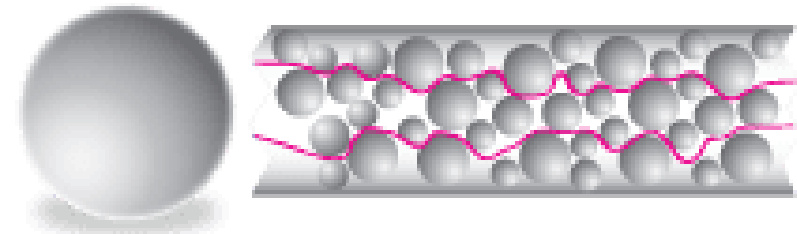
La diminuzione della superficie interfacciale fra fase stazionaria e mobile, rispetto alle particelle porose, è compensata dalla diminuzione del contributo del termine CM nell'equazione di Van Deemter, con conseguente incremento dell'efficienza.

# HIGH EFFICIENCY HPLC

## Kinetex Core-Shell

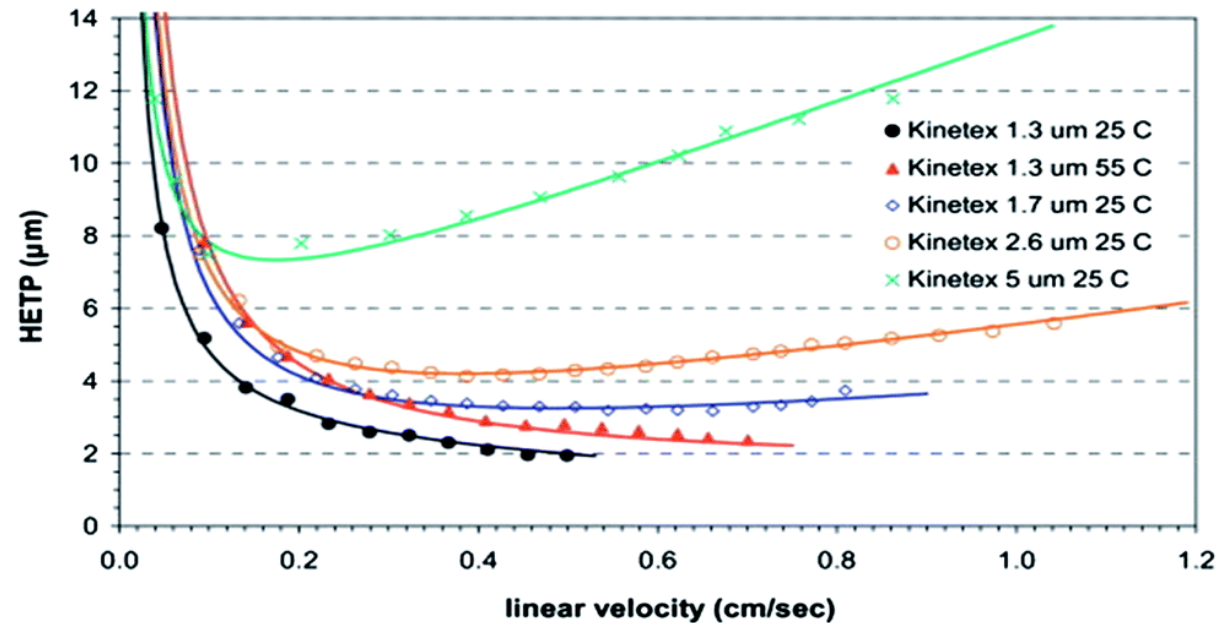


## Fully Porous



- Il core solido riduce tutti i contributi all'allargamento di banda in cromatografia liquida a fase inversa (diffusione molecolare longitudinale, resistenza al trasferimento di massa e percorsi multipli)
- Maggiore efficienza
- Per UHPLC

- Particelle di silice totalmente porose
- Basse contropressioni
- Favorisce allargamento della banda in cromatografia liquida a fase inversa
- Minore efficienza
- Per HPLC



# Teoria dell'allargamento della banda: equazione di Van Deemter

## Percorsi multipli (eddy diffusion)

• Le molecole eluiscono in t diversi ed è indipendente da u

• Dipende da:

- Granulometria e dall'impaccamento della FS
- Diametro medio delle particelle del riempimento

## Diffusione longitudinale:

• Indipendente dalle dimensioni delle particelle

• Dipende da:

- Formazione gradienti di concentrazione nella FM
- L'analita diffonde da zone a concentrazione maggiore (al centro) a zone a concentrazione minore

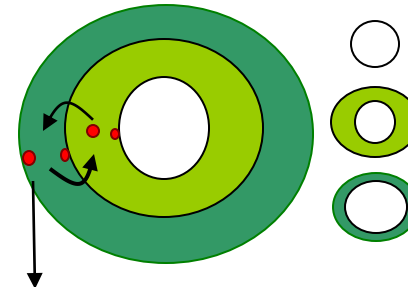
Direttamente proporzionale al coefficiente di diffusione più importante in GC che in LC

$$H = A + B/u + C_S u + C_M u$$

Coefficiente di **trasferimento di massa** nella fase stazionaria (cinetica di adsorbimento/desorbimento):  
 Film di liquido su particella solida - direttamente proporzionale a (spessore)<sup>2</sup>, inversamente proporzionale a  $D_S$  nel film  
 Fase stazionaria solida - direttamente proporzionale al tempo adsorbimento/desorbimento

• Dipende da:

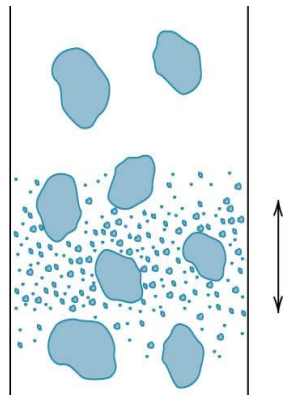
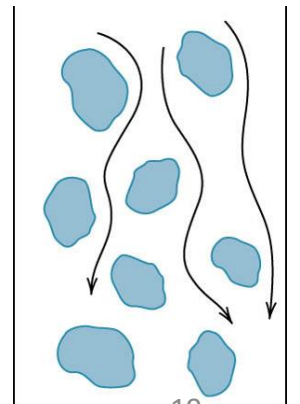
- Tempo di assorbimento e desorbimento dell'analita dalla FS



Coefficiente di **trasferimento di massa** nella fase mobile:  
 inv. prop. a  $D_M$ , funzione di (diametro particelle)<sup>2</sup> (diametro colonna)<sup>2</sup> e u

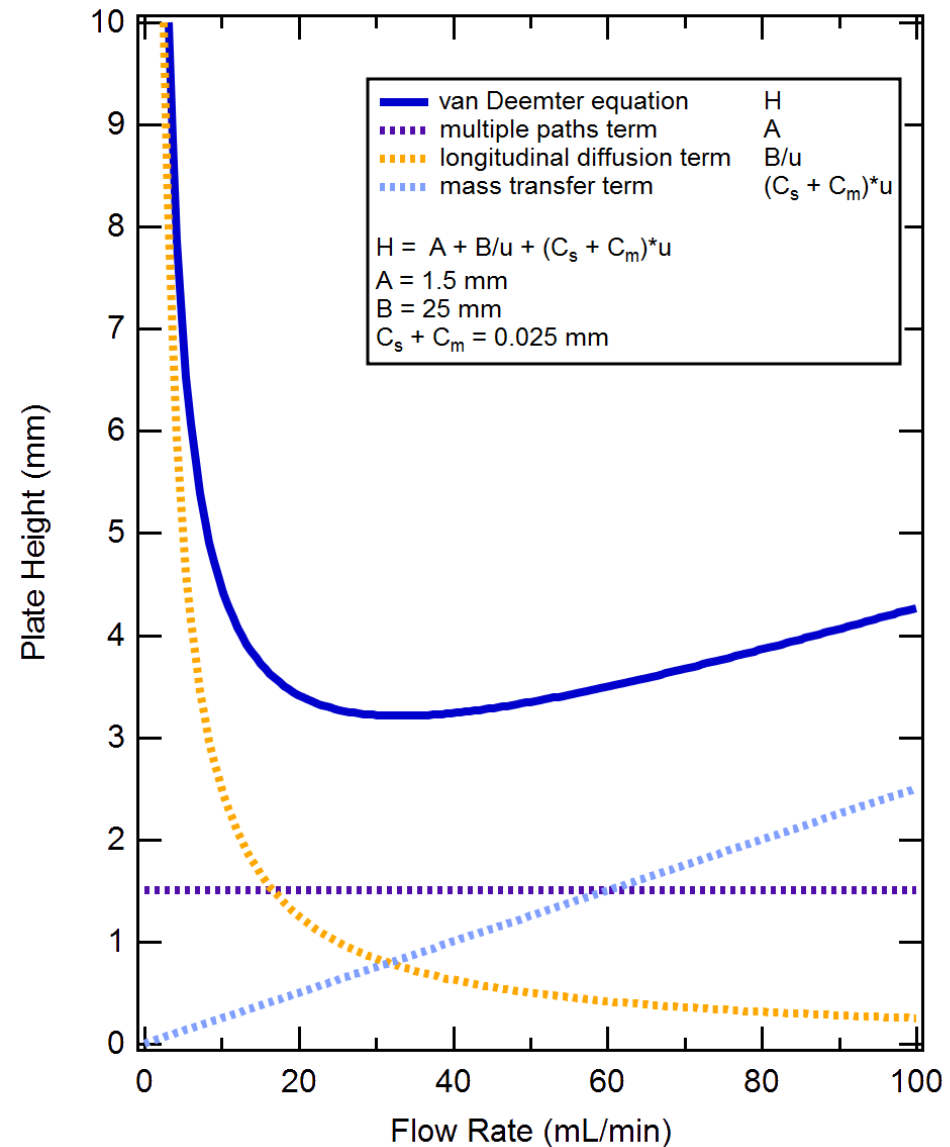
La diffusione turbolenta diminuisce a flussi bassi di fase mobile  
 L'allargamento di banda può essere minimizzato dall'utilizzo di particelle piccole e regolari (p.es. sfere)

## Diffusione turbolenta

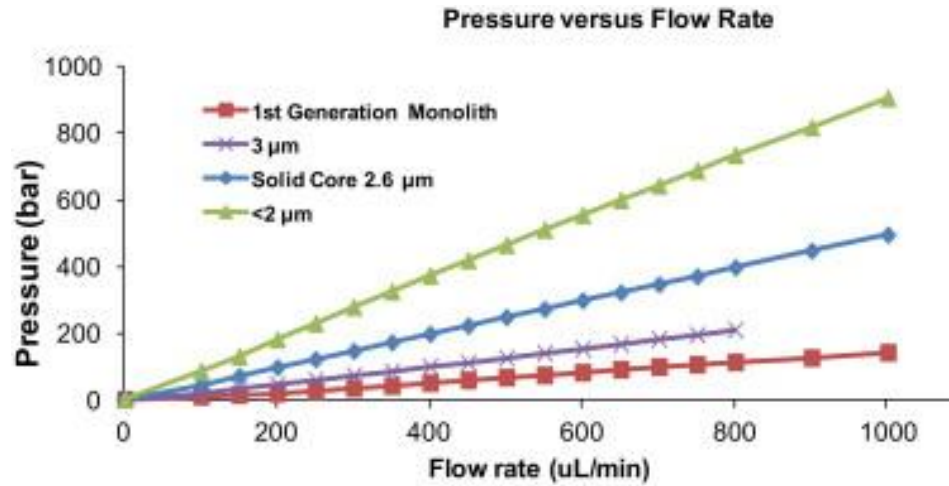


Molecular diffusion

Eddy diffusion



$$H = A + B/u + C_s u + C_M u$$



- Piccole  $d_p$  danno HETP più bassi
- Il flusso ottimale è maggiore con  $d_p$  più piccolo
- Colonne con particelle piccole hanno minor perdita di efficienza a flussi alti

Quando il flusso dell'eluente è forzato in colonna, esso genera una contropressione.

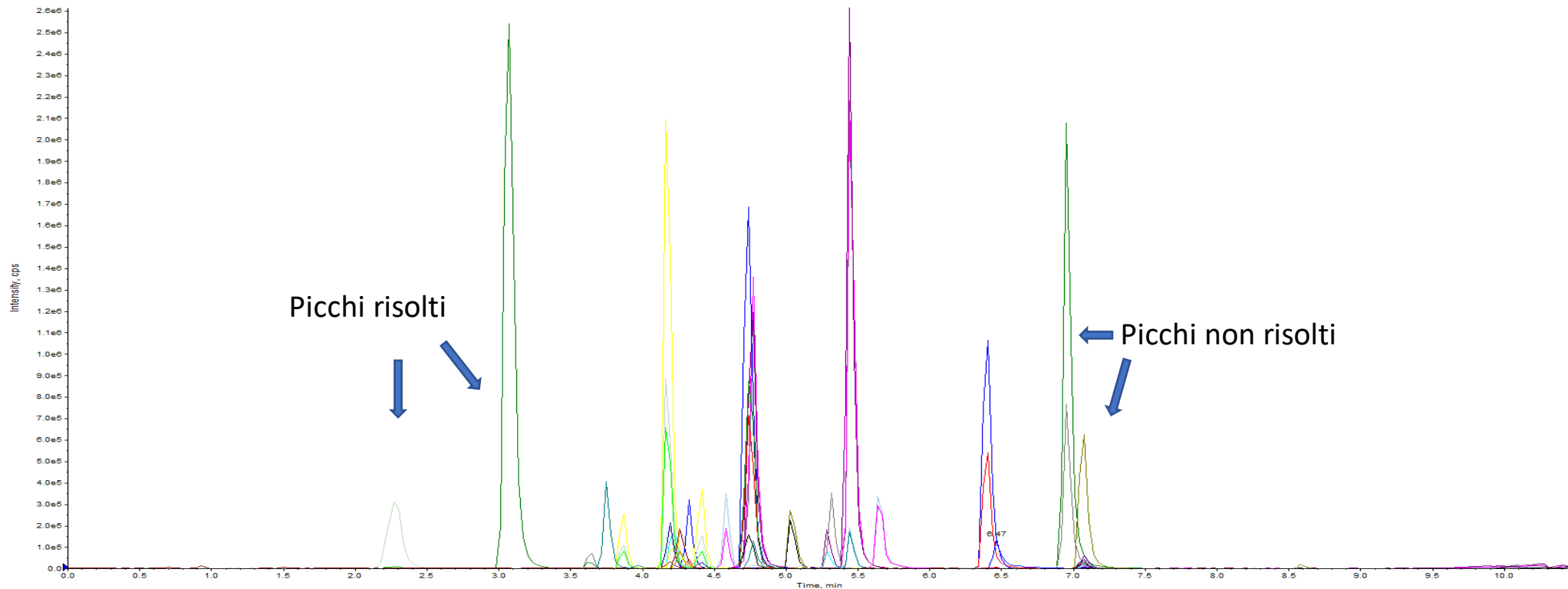
La relazione tra questa contropressione  $\Delta P$  e le altre variabili cromatografiche è data da:

$$\Delta P = \frac{\eta L v}{\Theta d_p^2}$$

Dove:  $\eta$  = viscosità della fase mobile  
 $v$  = velocità lineare della fase mobile  
 $L$  = lunghezza della colonna  
 $d_p$  = diametro medio delle particelle  
 $\Theta$  = costante

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



# Spettrometria di massa: Cos'è?

- La spettrometria di massa è una metodica che consente **l'identificazione** e la **quantitativa** di una molecola dalla sua massa.
- 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, in genere con carica positiva;
2. accelerazione degli ioni per immissione in un campo elettrico;
3. separazione degli ioni con massa diversa;
4. rivelazione dei diversi ioni formati e conseguente determinazione della loro massa.

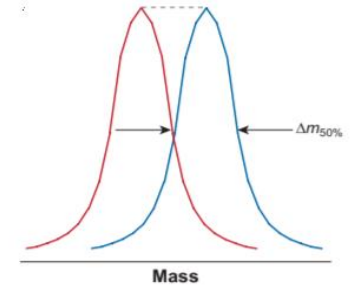
# Risoluzione e Accuratezza

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

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

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

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.

# 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)



# Spettrometro di massa

## Componenti fondamentali:

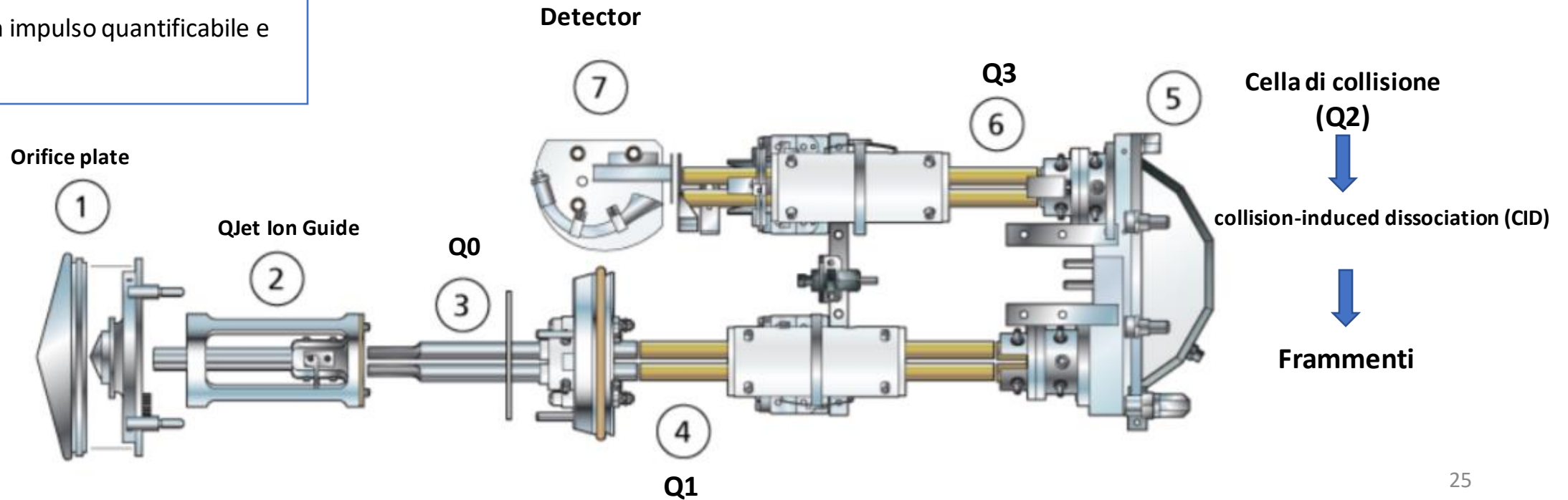
1. camera di ionizzazione per produrre ioni;
2. un campo elettrico per accelerare gli ioni prodotti;
3. un analizzatore di massa, che utilizzando un campo magnetico e/o un campo elettrico, separa gli ioni di massa diversa ( $m/z$ );
4. un rivelatore, che raccoglie gli ioni generando un impulso quantificabile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



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



# Modalità di ionizzazione: GC vs LC

Il pre-requisito fondamentale per l'analisi mediante spettrometria di massa è la formazione di ioni di campione in fase gassosa (ionizzazione).

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).

**LC**

**GC**

Tipologie di ionizzazione (più utilizzate) per HPLC:

➤ **Hard:**

- Atmospheric Pressure chemical Ionization (**APCI**)

➤ **Soft:**

- ElectroSpray Ionization (**ESI**)

VS

Tipologie di ionizzazione (più utilizzata) per GC:

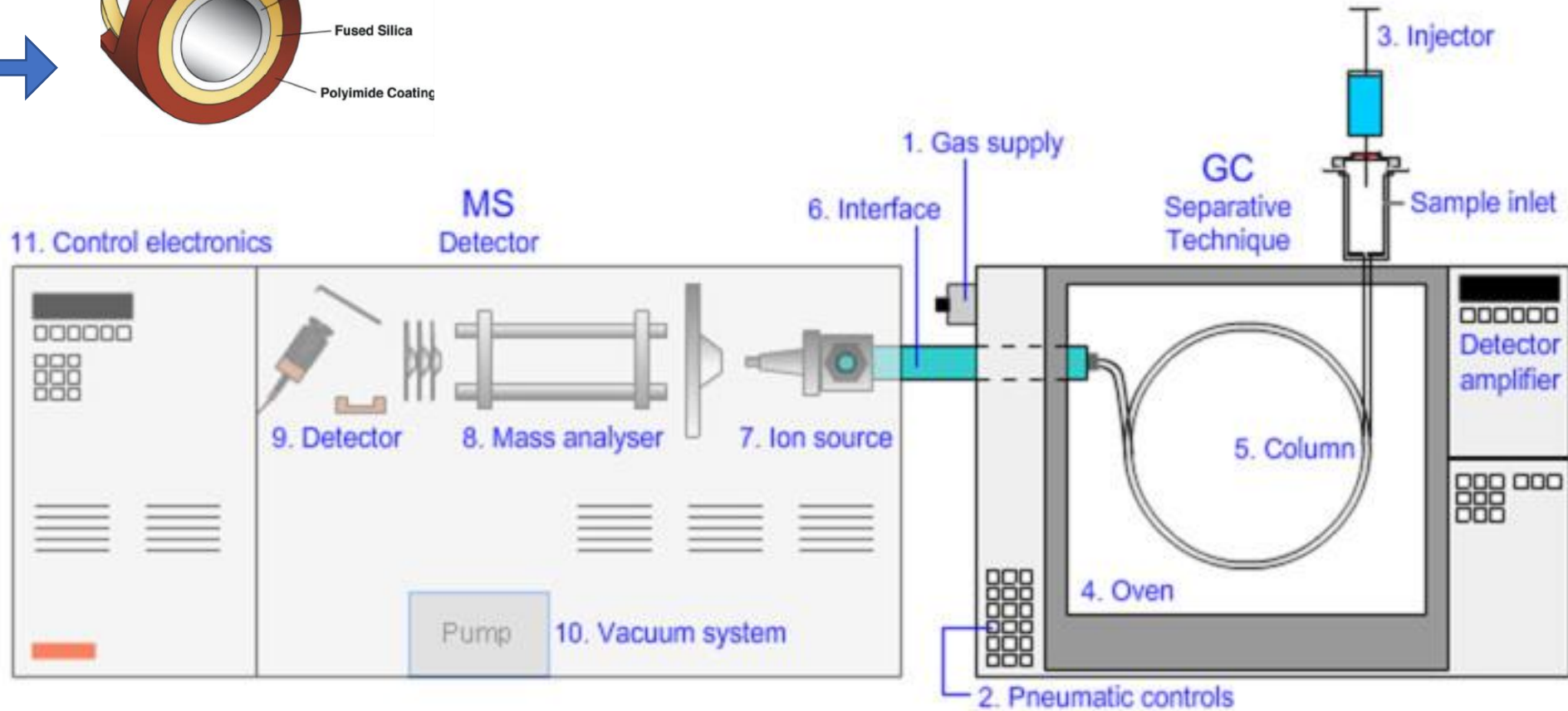
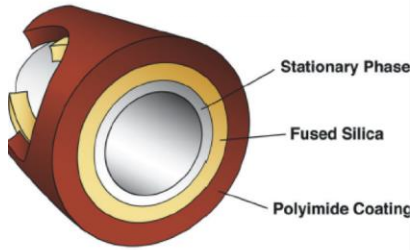
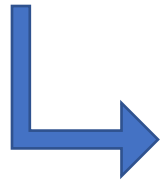
➤ **Hard:**

- Electron Impact ionization (EI)

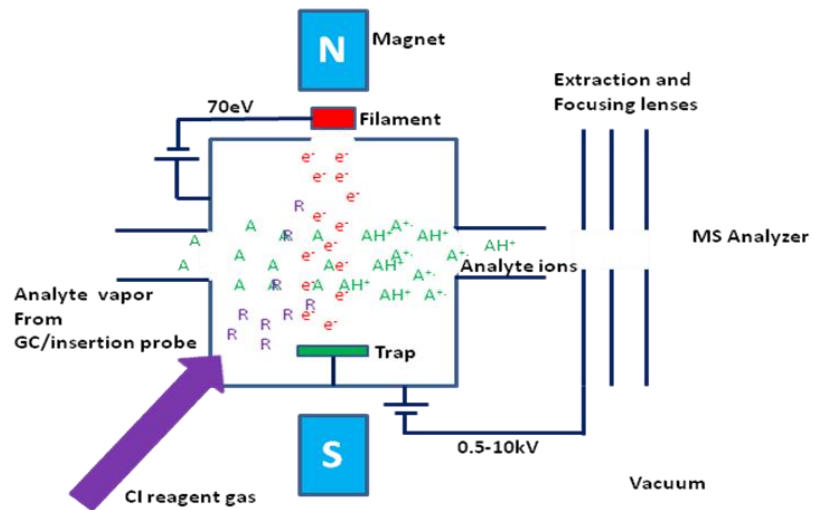
# GC-MS



Column GC

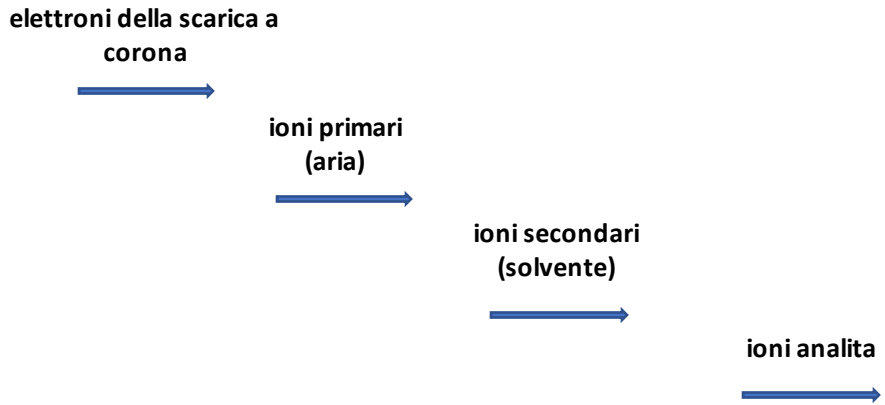
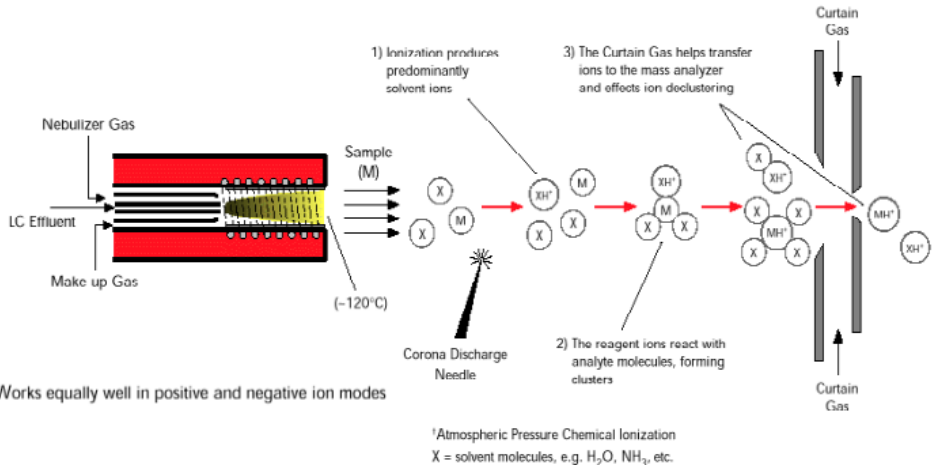


# Modalità di ionizzazione: EI (Electron Impact ionization)



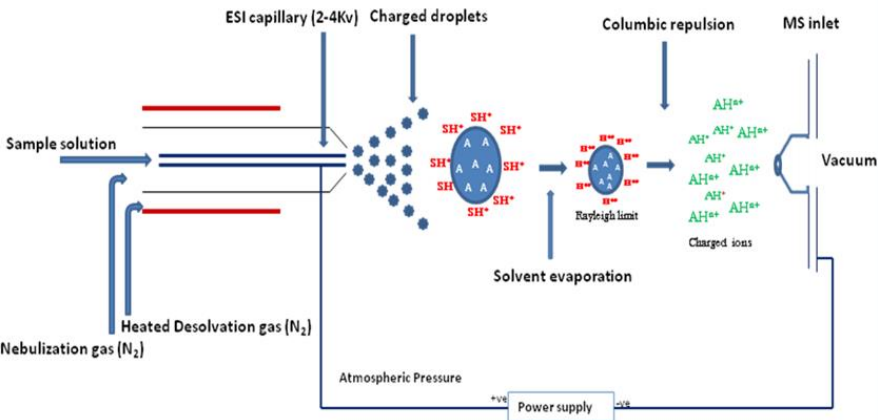
- La ionizzazione avviene è fatta volatilizzando un campione direttamente nella sorgente che si trova in un sistema di vuoto direttamente fissato all'analizzatore.
- La molecola (neutra) è ionizzata per bombardamento con un fascio di elettroni formato riscaldando una polarizzazione del filamento ad una tensione negativa rispetto alla sorgente.
- Un elettrone colpisce una molecola neutra, facendo uscire un elettrone dalla struttura e producendo uno **ione molecolare** che mantiene una addizionale energia residua. Questa energia residua, attraverso vibrazioni, rotazioni e riarrangiamenti molecolari, produce la frammentazione della molecola.
- Lo ione, sotto l'effetto di un potenziale elettrico, raggiunge l'analizzatore.

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



- In APCI il processo di desolvatazione avviene per riscaldamento (500 °C), tuttavia il passaggio nella "cartuccia riscaldata" è veloce, quindi le molecole non riescono a raggiungere l'equilibrio termico, pertanto anche molecole termicamente labili possono essere analizzate con questa tecnica.
- APCI è utile perché, al contrario di ESI, è in grado di generare attivamente ioni primari da molecole neutre. Tipicamente la scarica elettrica per effetto corona genera ioni  $N_2^{•+}$  o  $O_2^{•+}$ , generata da un ago settato ad un voltaggio (3-6kV).
- Questi reagiscono con il solvente allo stato gassoso, il quale forma ioni secondari di gas reagente che ionizzano gli analiti presenti.

# Modalità di ionizzazione: ESI (EctroSpray Ionization)



- Si basa sulla nebulizzazione di un liquido e la successiva generazione di ioni dalle goccioline. **La nebulizzazione avviene a pressione atmosferica**
- Lo spray viene prodotto applicando un **forte campo elettrico** (CE) tra il capillare e il contro-elettrodo, a pressione ambiente, a un liquido che passa attraverso un tubo capillare con un debole flusso (circa 1-10  $\mu\text{l min}^{-1}$ ), inducendo un **accumulo di carica sulla superficie del liquido** che si trova sulla punta del capillare, che consente la separazione del liquido in **gocce multi-carica**.
- Il CE fa staccare le gocce dalla punta del capillare (**cono di Taylor**), dette di "prima generazione" e causa uno spostamento delle cariche all'interno delle gocce, deformandole, fino a formare un cono di Taylor sulle gocce, da cui si staccano delle "gocce figlie".
- Da qui avviene un processo a cascata di formazione di "gocce figlie" sempre più piccole (contenenti sempre meno solvente), quindi con sempre **maggiore densità di carica** finché il CE alla superficie delle gocce risulta abbastanza elevato da consentire l'espulsione (**esplosione coulombiana**) degli ioni molecolari desolvatati dalla superficie delle gocce.
- Gli ioni così prodotti sono poi spinti attraverso un sistema di fenditure fino ad entrare nella zona a bassa pressione dove sono accelerate verso l'analizzatore.

# Analizzatori

Negli spettrometri di massa la funzione degli analizzatori è quella di **separare gli ioni in base al rapporto carica/massa ( $m/z$ )**. 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:

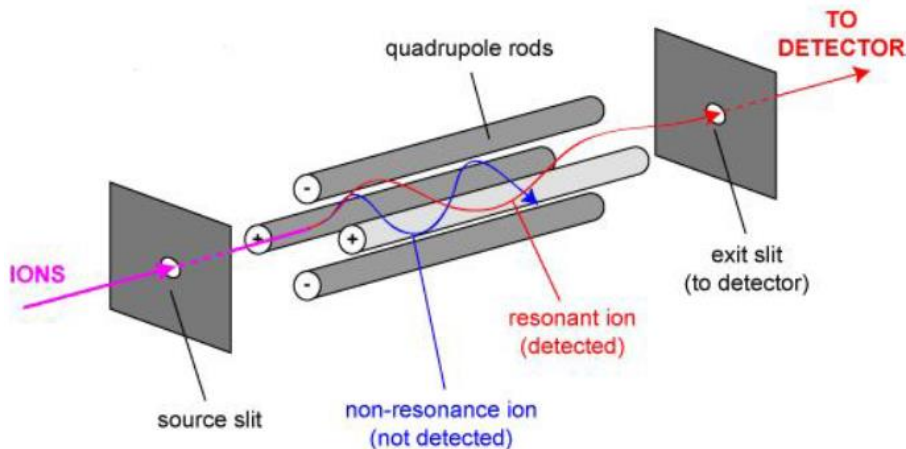
## **Analizzatori statici:**

- 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)

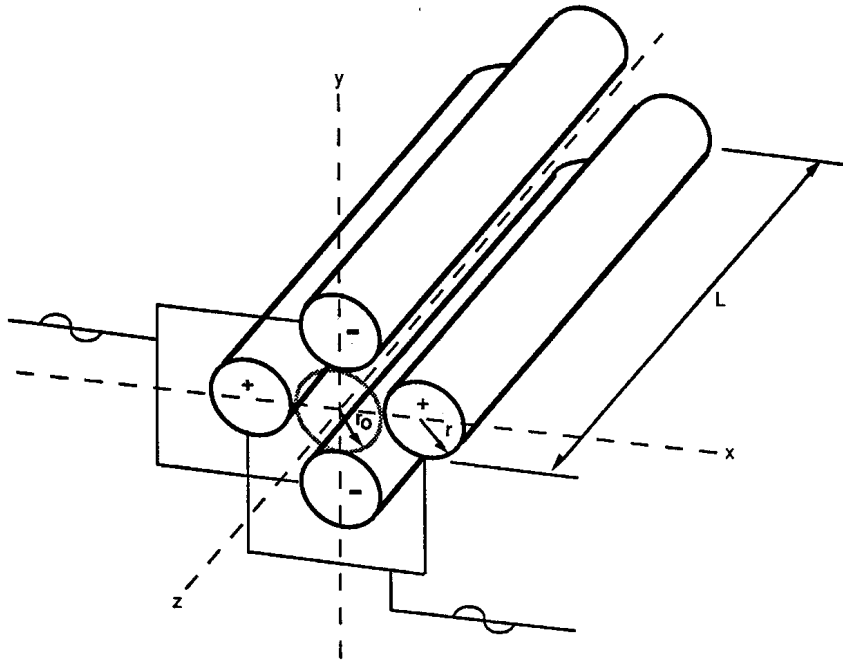
# Analizzatore: Quadrupolo



- L'analizzatore a quadrupolo consiste in un tubo rettilineo (di leghe di Mo) in cui sono presenti quattro barre di metallo parallele (in condizione di alto vuoto  $10^{-6}$ - $10^{-5}$  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 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.

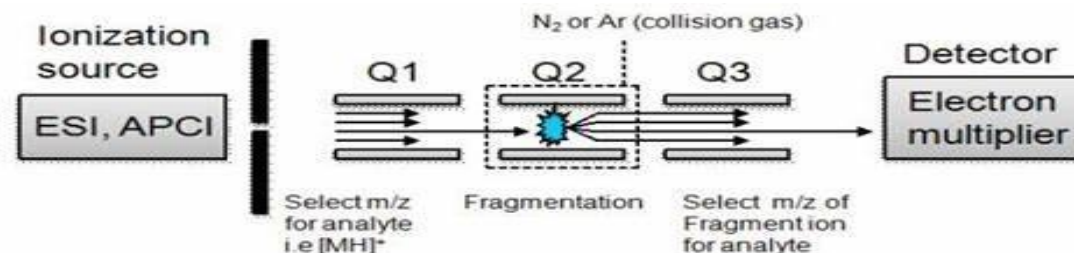
La **spettrometria di massa tandem (MS/MS)** permette di selezionare lo ione d'interesse e generare frammenti caratteristici, mediante una o più collisioni un gas neutro ( $N_2$  o Ar), chiamata **Dissociazione Attivata da Collisione (CAD, Collision-Activated Dissociation)**.

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 successivamente di due quadrupoli, **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 quadrupolare** e la **trappola ionica a risonanza di ciclotrone**. Attualmente lo spettrometro di massa tandem più utilizzato è il **triplo quadrupolo**

Tripla quadrupolo



# Analizzatori a trappola ionica

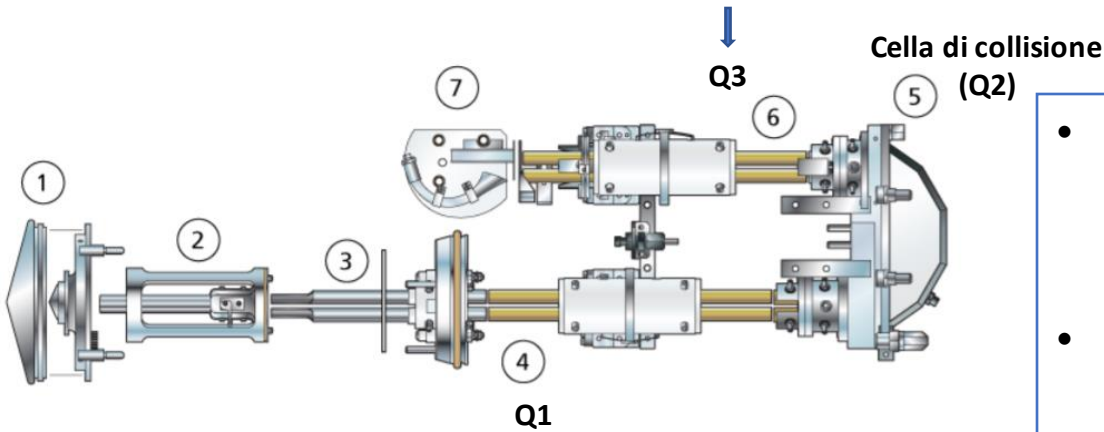
Una trappola ionica è un dispositivo in cui ioni gassosi possono essere trattenuti nel suo interno per prolungati periodi di tempo mediante l'applicazione di campi elettrici e/o magnetici.

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

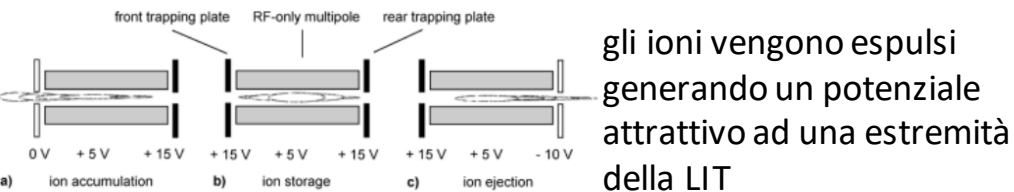
1. trappola ionica quadrupolare (più semplice)
2. trappola ionica a risonanza di ciclotrone (più complessa)
3. Trappola ionica orbitale (Orbitrap)

# Analizzatore a trappola ionica lineare (LIT)

## linear ion trap (LIT)

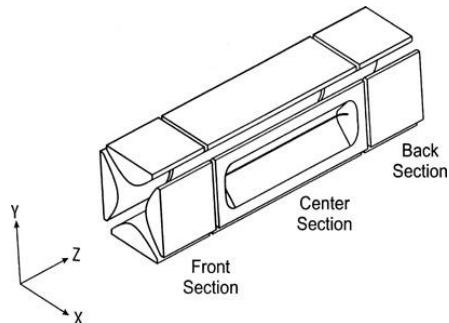


## espulsione assiale



## espulsione radiale

gli ioni vengono espulsi attraverso una fenditura applicando una corrente alternata all'elettrodo



- Una trappola ionica è un dispositivo che utilizza un **campo elettrico oscillante** per immagazzinare ioni in uno spazio confinato detto "trappola".
- Il quadrupolo Q3 termina ad entrambi i lati con delle **lenti** che riflettono gli ioni avanti e indietro mantenendoli al suo e quindi scansionandoli ulteriormente per produrre uno spettro completo dei dati.
- Gli ioni rimangono confinati lungo la dimensione radiale da un campo quadrupolare e lungo la direzione assiale da un campo elettrico alle due estremità della trappola.
- Quando la trappola è "piena", la barriera di tensione CC sulla lente d'ingresso e di uscita e la tensione RF applicata alle barre del quadrupolo confinano gli ioni all'interno del Q3, impedendo l'entrata di ulteriori ioni.
- Applicando diversi campi elettrici alle estremità si può confinare la nube di ioni in un certo spazio ristretto all'interno della LIT, ad es. al centro o verso una delle estremità, a seconda del meccanismo di espulsione previsto in base alla progettazione della LIT: espulsione assiale o radiale.

# 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.

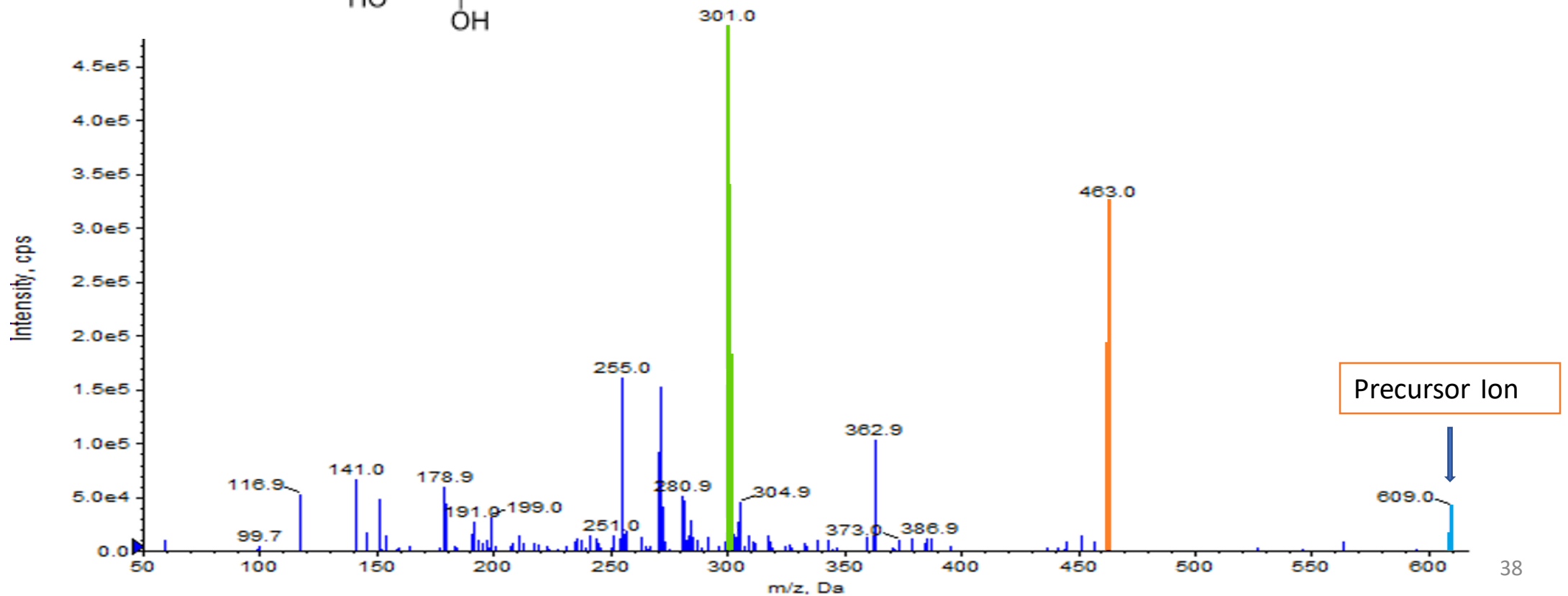
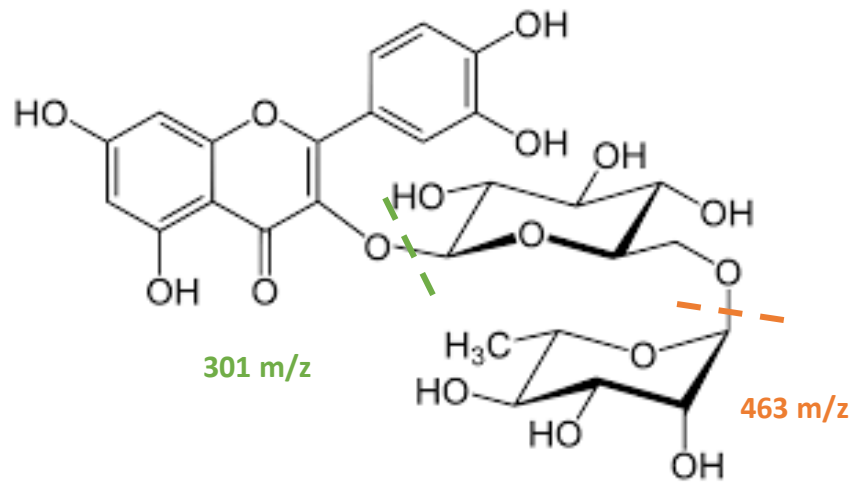
Le caratteristiche di un rivelatore HPLC ideale sono:

- 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 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!**

# Spettro di massa



# Parametri spettrometro di massa

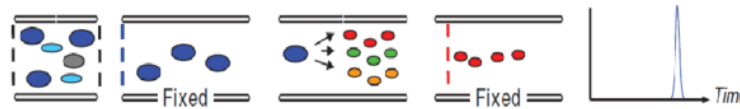
## Infusione dello standard in MS/MS

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					124,9	-40,0	-17,0
Rutin	609,2	-100,0	-6,0	300,9	-45,0	-11,0	Chlorogenic Acid	353,1	-60,0	-7,0	190,9	-25,5	-6,5	OH-Tyrosol	152,9	-75,0	-7,0	122,9	-22,0	-8,0
				254,7	-70,0	-9,0					160,9	-35,0	-6,0					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	255,8	-40,0	-9,0							
				120,9	-22,0	-8,0					150,9	-40,0	-10,0							
							Oleuropein	539,2	-55,0	-10,0	275,0	-32,0	-9,0							

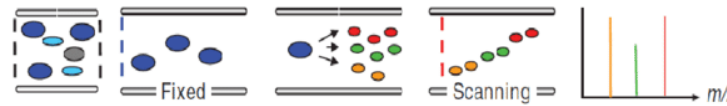
- **Declustering Potential (DP):** Il parametro DP controlla il voltaggio applicato all'orifizio che controlla la capacità di separare i cluster di ioni tra l'orifizio e la guida ionica QJet. È impiegato per ridurre al minimo i cluster di solvente che possono restare sugli ioni campione dopo che questi 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.

# Tipi di scansione in modalità quadrupolo

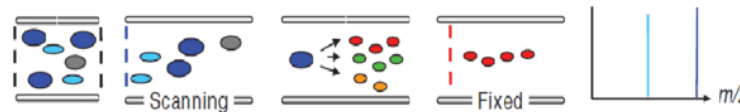
**MRM (MRM):** una scansione MS/MS in cui uno ione selezionato dall'utente passa attraverso il quadrupolo Q1 e viene frammentato nella camera di collisione Q2. Il quadrupolo Q3 quindi seleziona lo ione frammento che entra nel rivelatore. Questa modalità di scansione è usata prevalentemente per la quantificazione.



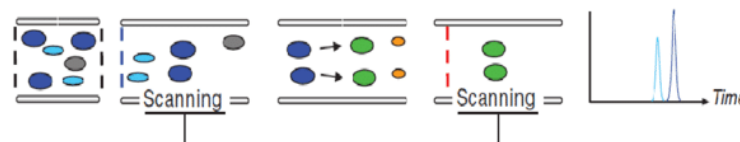
**Product Ion (MS2):** una scansione MS/MS completa dove il quadrupolo Q1 è impostato per trasmettere un determinato ione precursore e il quadrupolo Q3 effettua una scansione su un intervallo di massa definito. È usato per identificare tutti i prodotti di un determinato ione precursore.



**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.

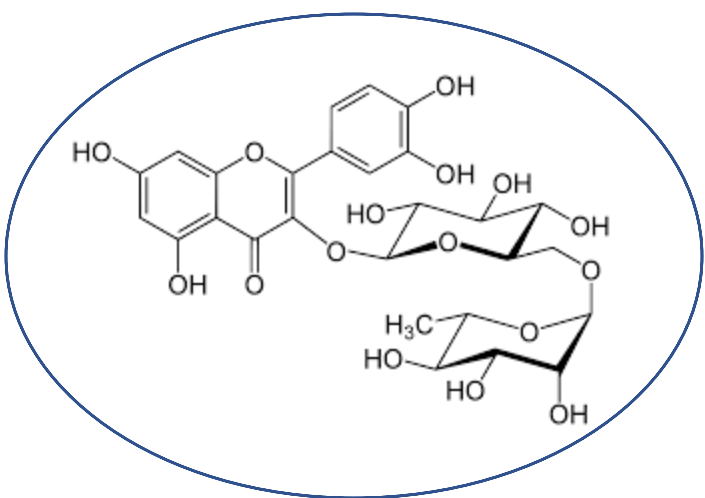
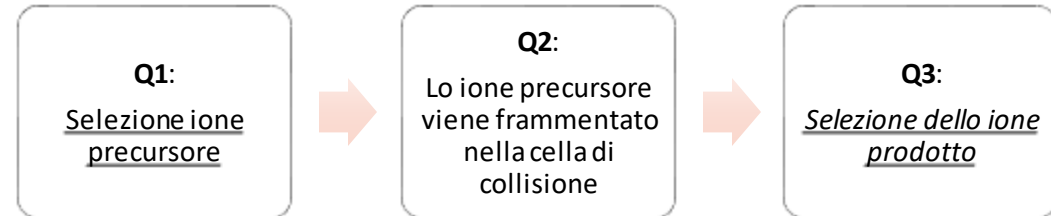
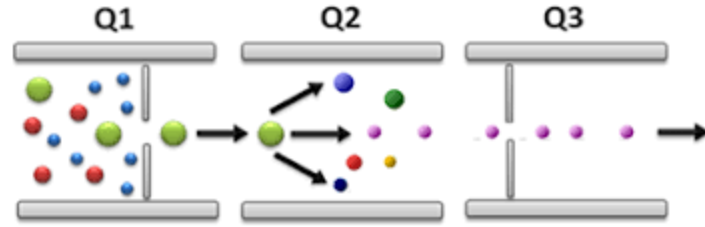


**Neutral Loss (NL):** una scansione MS/MS nella quale sia il quadrupolo Q1 che il quadrupolo Q3 effettuano una scansione su un intervallo di massa, mantenendo una differenza di massa prefissata. Si osserva una risposta se lo ione selezionato dal quadrupolo Q1 si frammenta perdendo il frammento neutro 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.

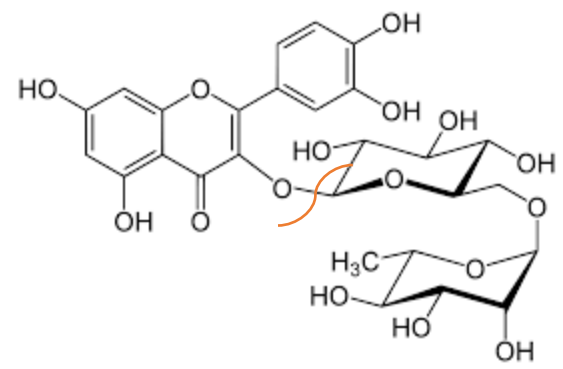




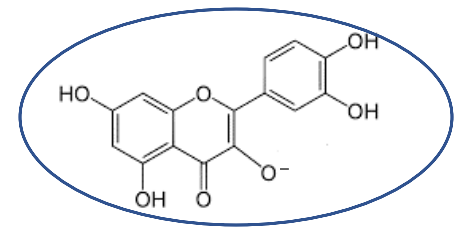
# Multiple Reaction Monitoring (MRM)



**Q1**  
Parent ion

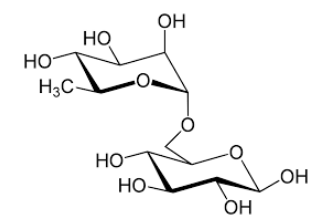


**Q2**



**Aglicone**

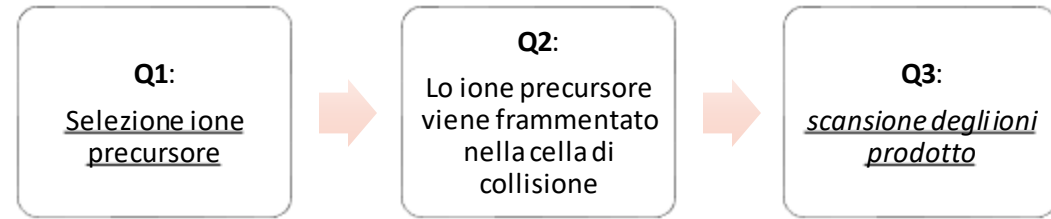
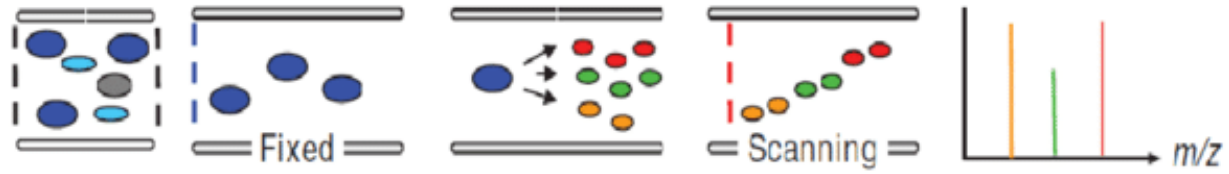
300.9 m/z



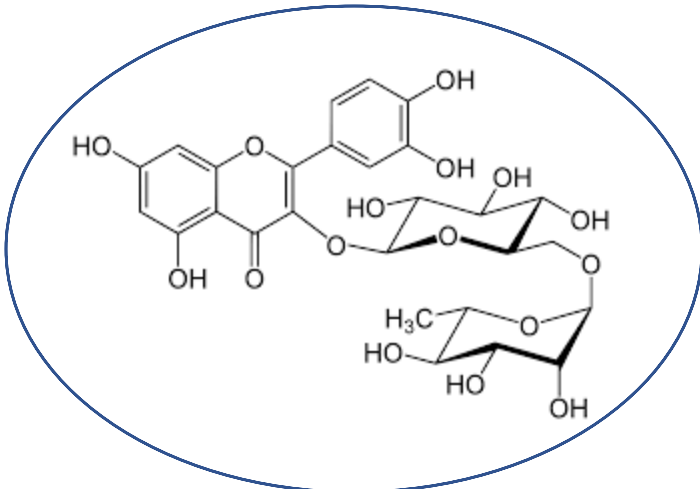
**Glicone**

**Q3**  
daughter ion

# Product Ion Scan (PI)

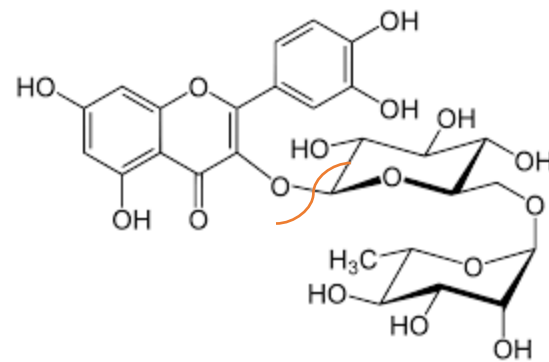


302,2 m/z

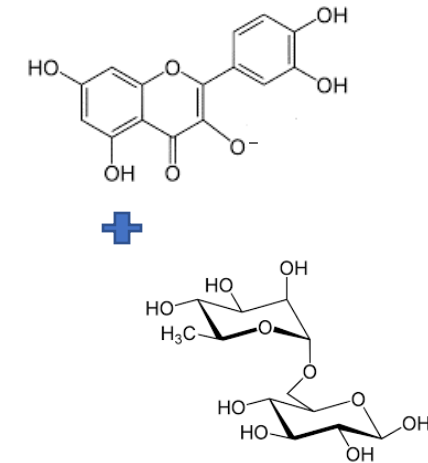


Q1

Parent ion



Q2



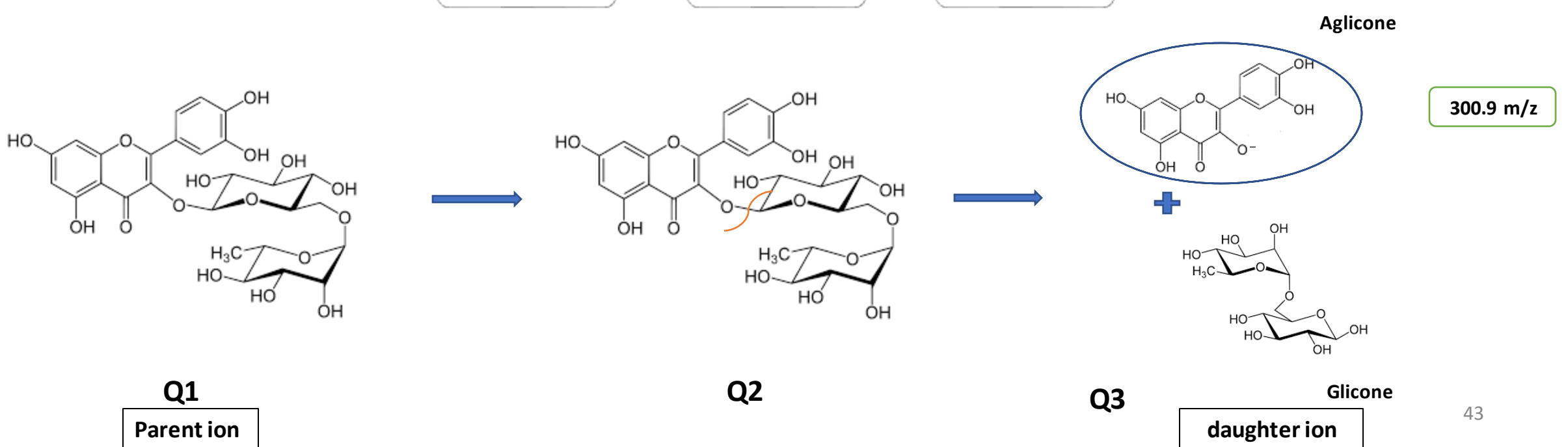
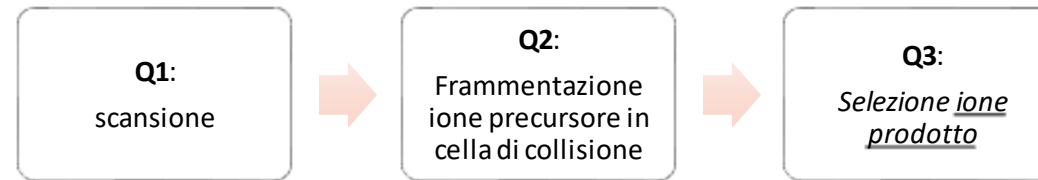
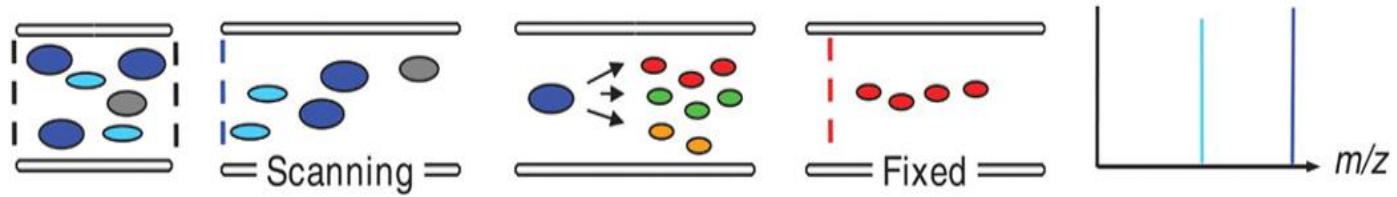
Q3

daughter ion

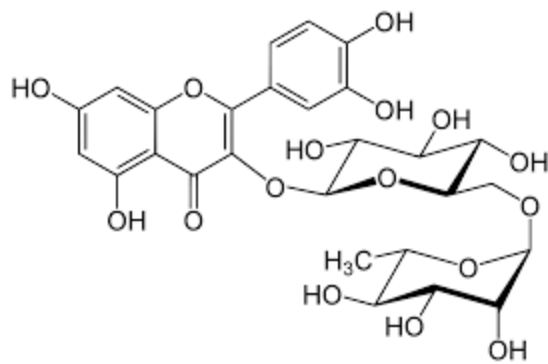
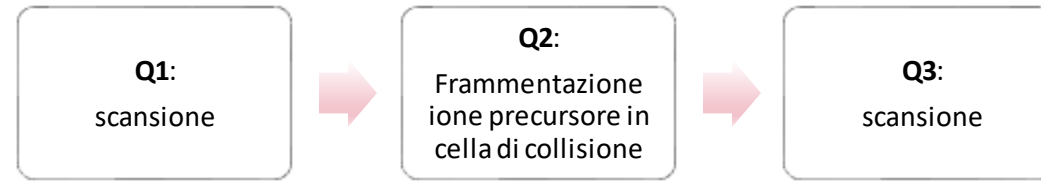
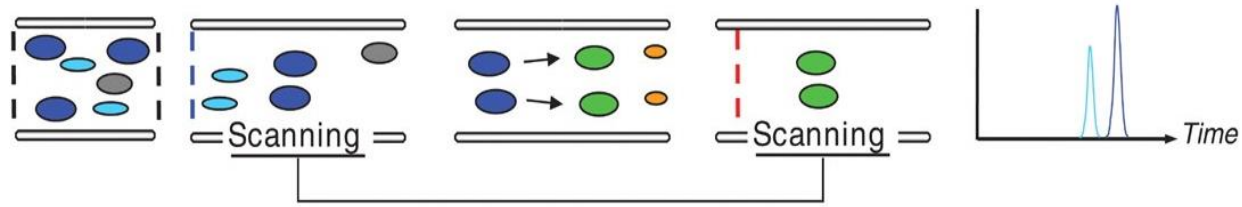
Aglicone

Glicone

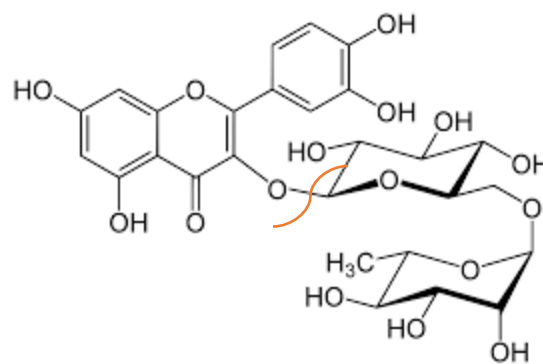
# Precursor ion scan (PIS)



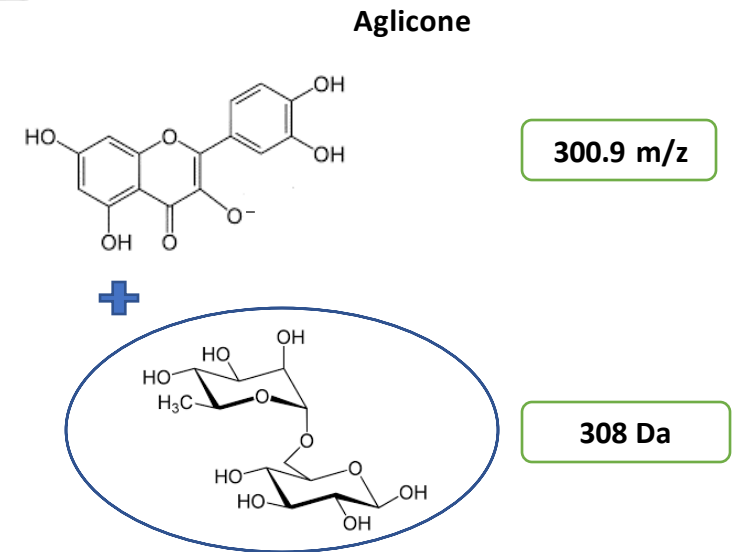
# Neutral Loss (NL)



**Q1**  
Parent ion



**Q2**



**Q3**  
Glicone  
daughter ion

# Analisi qualitative e quantitative

## **Analisi qualitativa**

Indica se una specie chimica (analita) è presente o meno in una matrice

## **Analisi quantitativa**

Indica la quantità di specie (analita) presente (concentrazione)

# Definizione di standard e bianco

**standard** → campione a concentrazione nota della specie da analizzare

**bianco** → campione privo della specie da analizzare

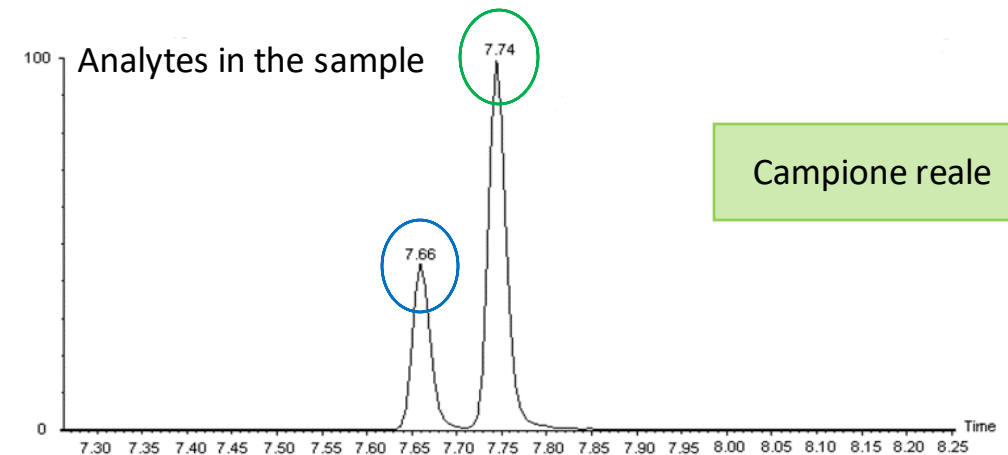
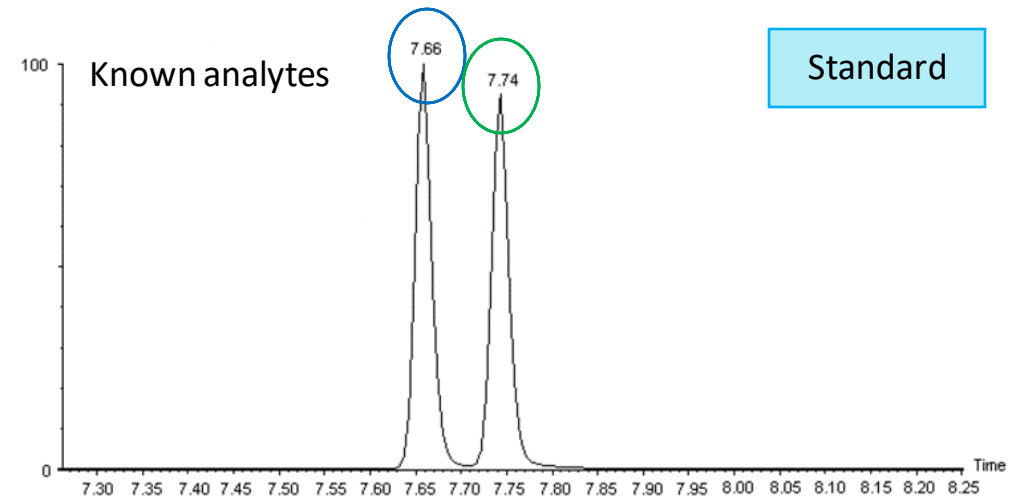
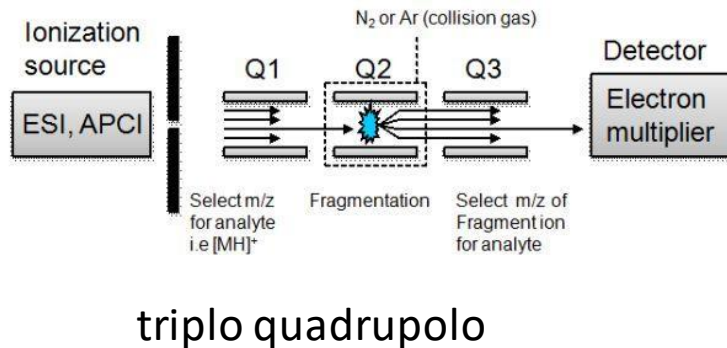
Gli **standard** vanno possibilmente realizzati con la stessa matrice del campione da analizzare ma privo dell'analita.

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



# Analisi qualitativa: Analisi targeted

- Standard analitico delle molecole
- La quantificazione delle molecole viene eseguita attraverso l'uso di standard interni e analitici per creare curve di calibrazione per ciascuna delle molecole target nello studio



# Analisi quantitativa: Curva di calibrazione

- La curva di calibrazione detta retta di lavoro o retta di taratura costituisce un metodo indispensabile per la determinazione della concentrazione o della massa 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**.



# Definizione dei limiti inferiori del campo di misura

## Limite di rilevabilità (LOD)

Per limite di rilevabilità si intende la più piccola quantità determinabile dal metodo con un certo livello di fiducia

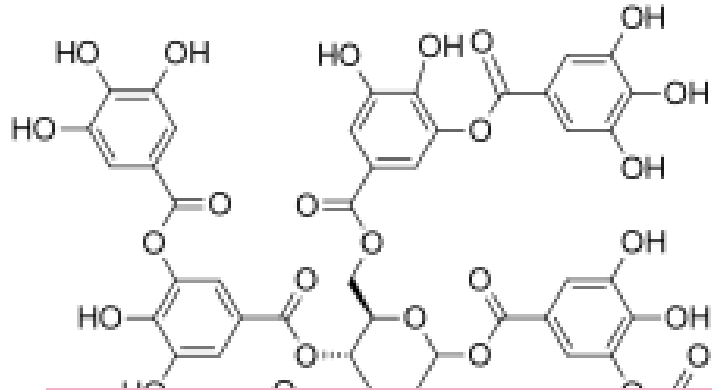
$LOD = K S_b / m$ ;  $K = 2$  o  $3$ ;  $S_b$  = deviazione standard del bianco;  $m$  = pendenza della curva

## Limite di quantificazione (LOQ)

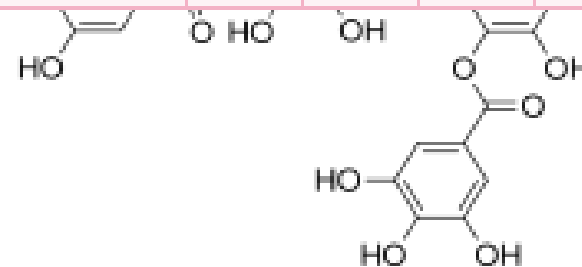
Per limite di quantificazione si intende la più piccola quantità quantificabile con dal metodo con un livello di fiducia superiore

$LOQ = K S_b / m$ ;  $K = 5$  o  $10$ ;  $S_b$  = deviazione standard del bianco,  $m$  = pendenza della curva

# Validation data:



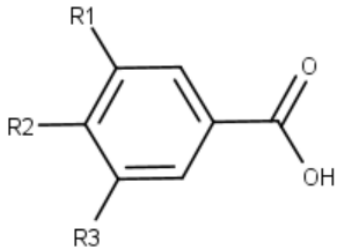
ANALYTE	EQUATION	R <sup>2</sup>	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Recovery	Matrix effect	ANALYTE	EQUATION	R <sup>2</sup>	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Recovery	Matrix effect
Gallic Acid	$y=33173,6x+1020,749$	0,996	0,152	0,505	54-89%	(-10) - 13%	Tyrosol	$y=52347,4x+54168$	0,998	0,122	0,407	62-78%	(-14) - (-17)%
OH-Tyrosol	$y=7,2033e5x+(-26722,935)$	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%							



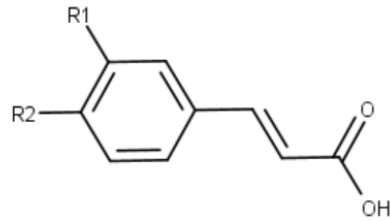
# Phenolic Compounds

## Phenolic Acids C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>

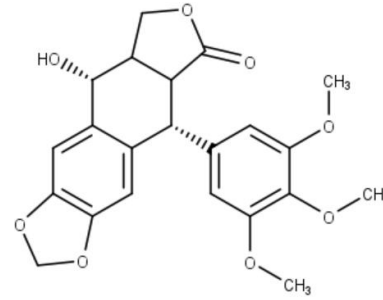
### Hydroxybenzoic Acid



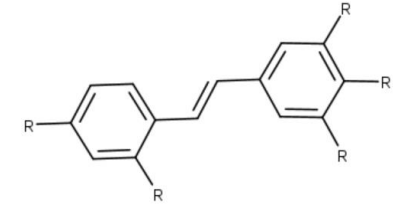
### Hydroxycinnamic Acid



## Lignans C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>

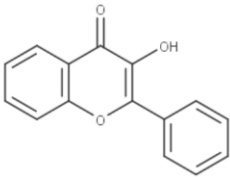


## Stilbenes C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>

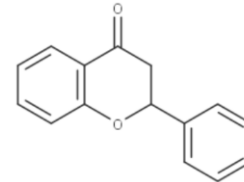


## Flavanoids C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>

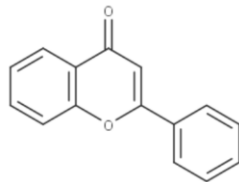
### Flavonols C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>



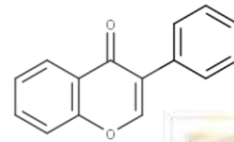
### Flavanones C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>



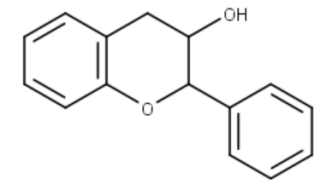
### Flavones C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>



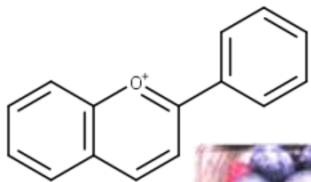
### Isoflavones C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>



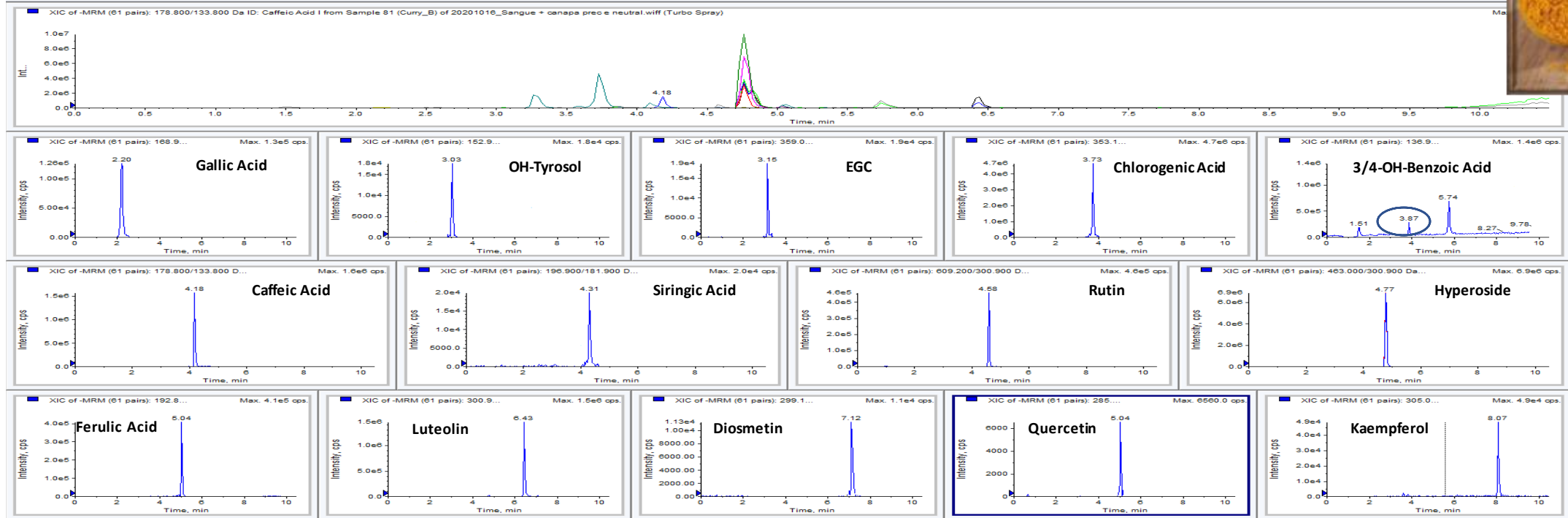
### Flavan-3-ols C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub> (Catechines and Proanthocyanidines)



### Anthocyanidin C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>O<sup>+</sup>



# 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.



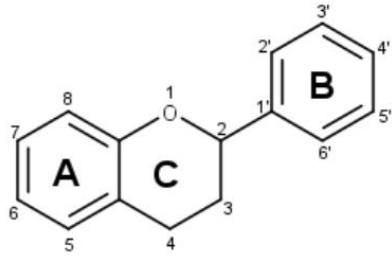
	Chlorogenic Acid	Tyrosol	3/4-OH-Benzoic Acid	Caffeic Acid	Vanillic Acid	Siringic Acid	Rutin	3-OH-Cinnamin Acid	p-Coumaric Acid	
Alge Rosse	0,1823	167,7	30,57	0,1002	5,276	0,001641	0,000872	2,556	0,2235	µg/g
Alge Verdi	<LOQ	13,71	2,425	<LOQ	1,549	0,01237	0,001056	0,2633	0,0272	µg/g



## Seaweeds

# Experimental work: Glycoside derivatives

**Aglycone** (non sugar part)

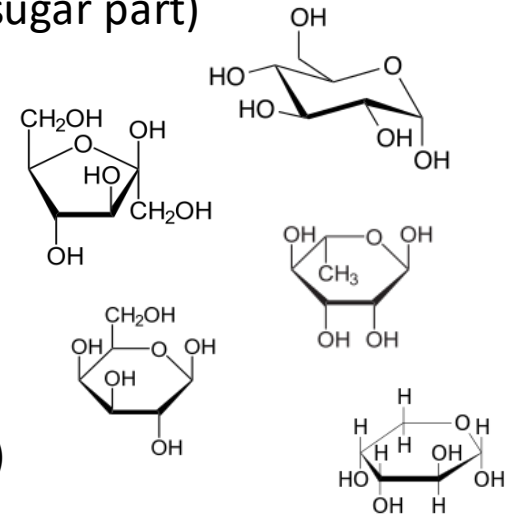


Benzene ring (A) condensed with six membered ring (C) pyran ring, which in the 2-position carries a phenyl ring (B) as a substituent

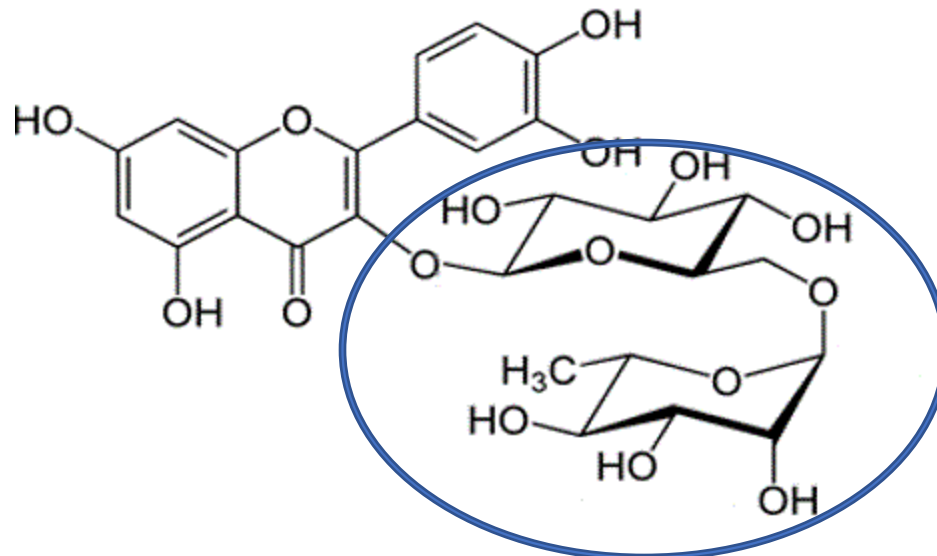


**Glycone** (sugar part)

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

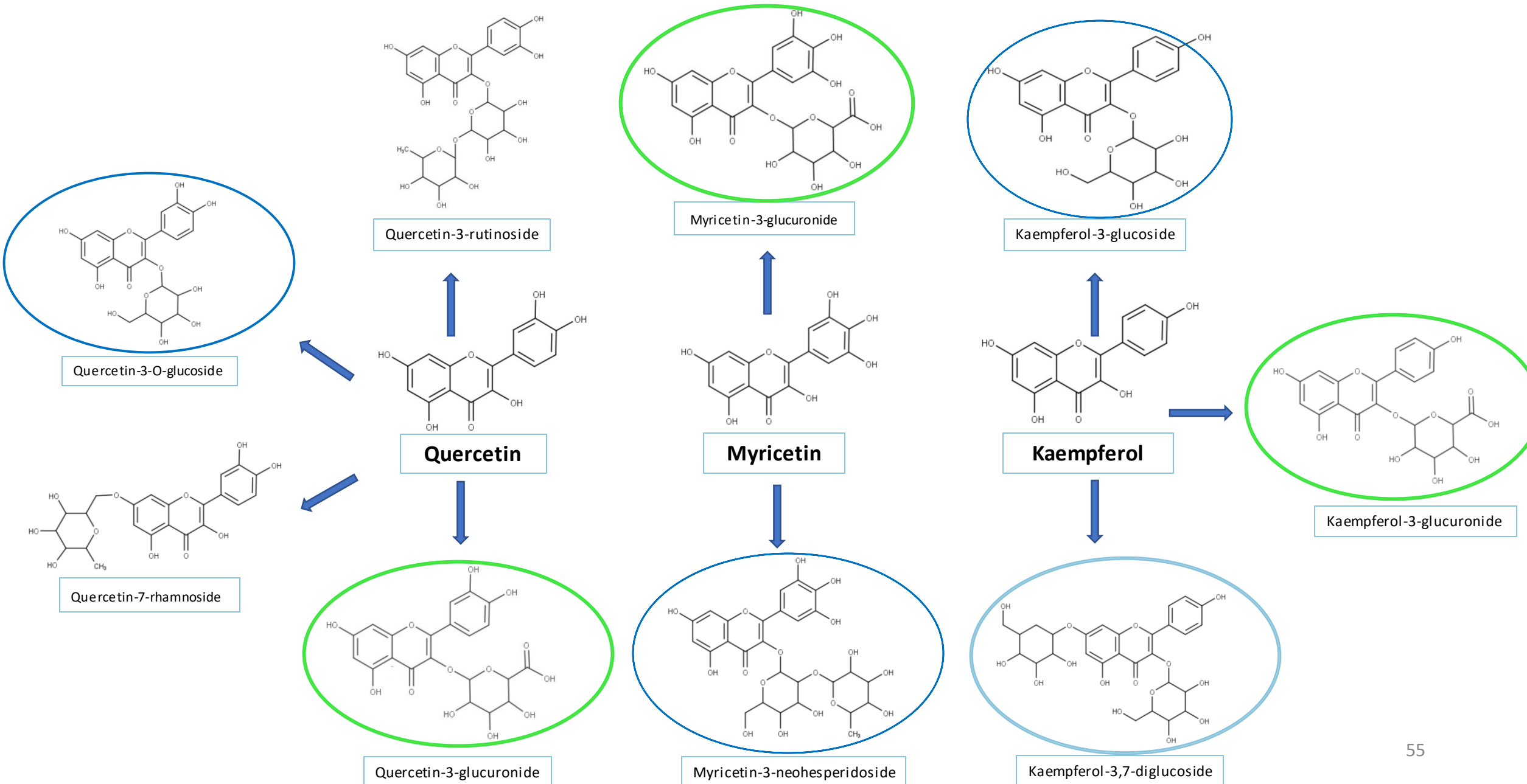


**Aglycone:**  
**Quercetin**

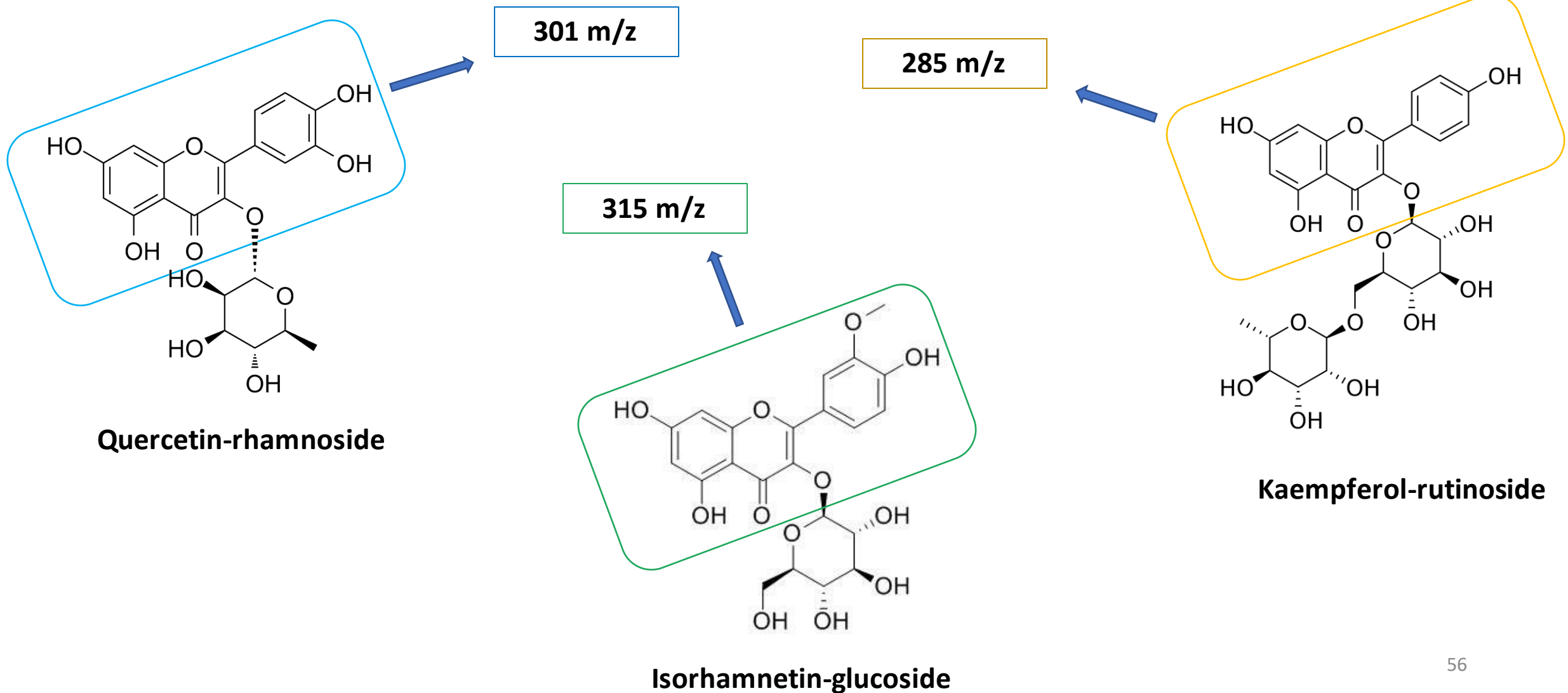


**Glycone:**  
**Rutinose**

# Flavonoids



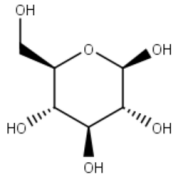
# PIS: Aglycon moiety



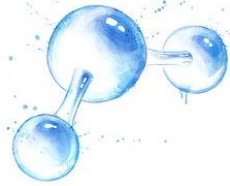


# NL: Sugar moiety

## Glucose and galactose



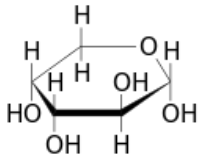
MW= 180,157 g/mol



MW= 18,0153 g/mol

162 Da

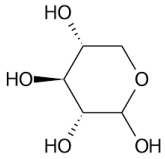
## Arabinose



MW= 150,130 g/mol

or

## Xylose



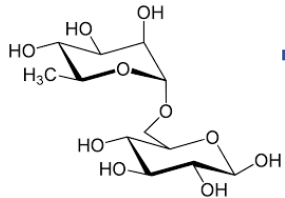
MW= 150,130 g/mol



MW= 18,0153 g/mol

132 Da

## Rutinose



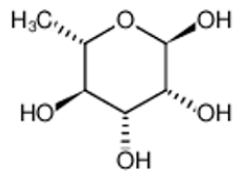
MW= 326,297 g/mol



MW= 18,0153 g/mol

308 Da

## Rhamnose



MW= 164,160 g/mol

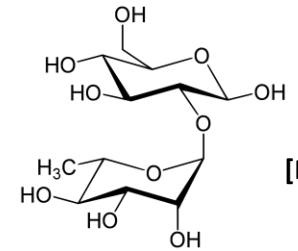


MW= 18,0153 g/mol

146 Da

## Neohesperidoside

[rhamnopyranosyl-gluco-pyranoside]



[M-H-146-308]<sup>-</sup>

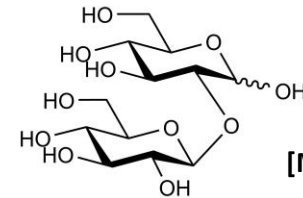
146 Da

or

308 Da

## Sophoroside

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

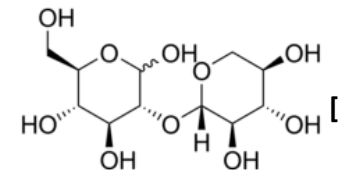


[M-H-162-162]<sup>-</sup>

162 Da

## Sambubioside

[beta-D-xylosyl-(1->2)-beta-D-glucose]



[M-H-132-162]<sup>-</sup>

132 Da

or

162 Da

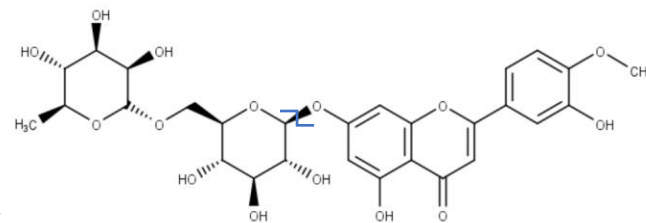
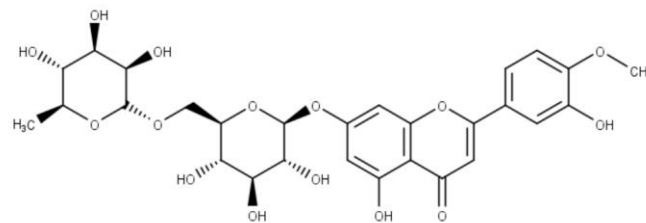
# Curry leaves

**Name:**

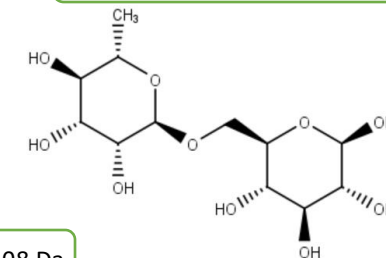
Diosmetin 7-o-rutinoside (Diosmin)

**Molecular Weight:**  
608.5 g/mol

**T<sub>R</sub>:**  
4,76



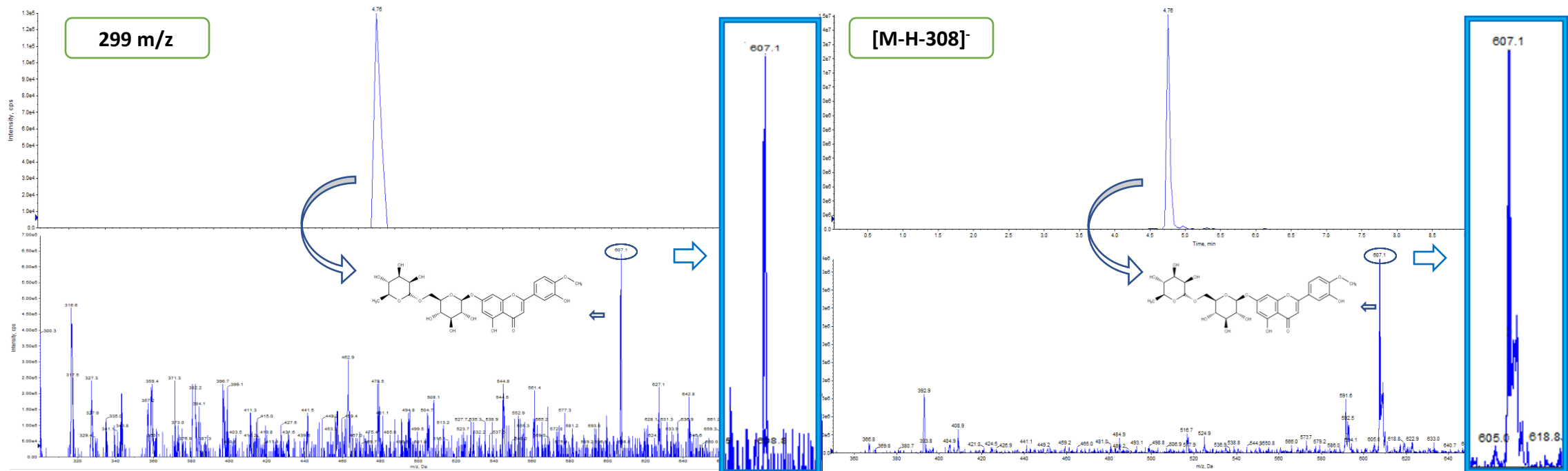
Rutinoside 326,297 g/mol



MW-H<sub>2</sub>O=308 Da

Precursor Ion Scan

Neutral Loss Scan

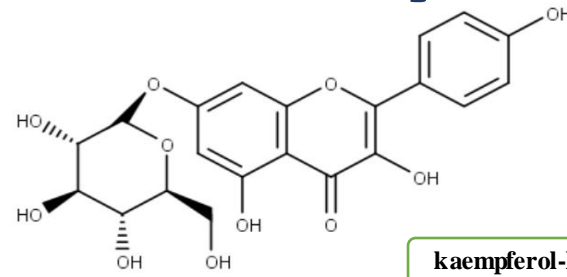


# Blueberry

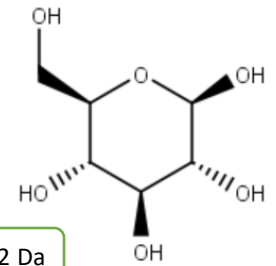
**Name:**  
Luteolin-hexoside/Kaempferol-hexoside

**Molecular Weight:**  
448.4 g/mol

**T<sub>R</sub>:**  
4,79



Hexoside 180,157 g/mol



MW-H<sub>2</sub>O=162 Da

Precursor ion scan

Neutral loss scan

285 m/z

[M-H-162]<sup>-</sup>

