



Società Chimica Italiana  
Divisione di Spettrometria di Massa



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI MILANO



# Il TOF compie 70 anni!

Università degli Studi di Milano

Sala Malliani

via Festa del Perdono 7

Milano

**1 dicembre 2016**



**J1. A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion.**  
W. E. STEPHENS, *University of Pennsylvania*.—Advances in electronics seem to make practical a type of mass spectrometer in which microsecond pulses of ions are selected every millisecond from an ordinary low voltage ion source. In travelling down the vacuum tube, ions of different  $M/e$  have different velocities and consequently separate into groups spread out in space. If the ions are collected in a fixed Faraday cage and the current amplified, then pulses of current corresponding to different ion  $M/e$  will be dispersed in time. If the amplified current pulses are put on the vertical plates of an oscillograph whose sweep is synchronized with the pulses, then an  $M/e$  spectrum of the ions will be exhibited. This type of mass spectrometer should offer many advantages over present types. The response time should be limited only by the repetition rate (milliseconds). The indication would be continuous and visual and easily photographed. Magnets and stabilization equipment would be eliminated. Resolution would not be limited by smallness of slits or alignment. Such a mass spectrometer should be well suited for gas composition control, rapid analysis, and portable use. A mass spectrometer of this type is being constructed.

PHYSICAL REVIEW VOLUME 69, NUMBERS 11 AND 12  
JUNE 1 AND 15, 1946 PAGE 691

## **Comitato Scientifico**

**Giuseppe Avellone**, Università di Palermo

**Gianluca Bartolucci**, Università di Firenze

**Giuliana Bianco**, Università della Basilicata

**Alessandro Buchicchio**, Università della Basilicata

**Donatella Caruso**, Università di Milano

**Vincenzo Cunsolo**, Università di Catania

**Roberta Galarini**, IZSUM, Perugia

**Gianluca Giorgi**, Università di Siena

**Fulvio Magni**, Università di Milano Bicocca

**Giorgio G. Mellerio**, Università di Pavia

**Nico Mitro**, Università di Milano

**Michele Suman**, Barilla Spa

**Organizzato in collaborazione con:**



# PROGRAMMA

9:30	<b>Registrazione e coffee break</b>
10:15 – 10:30	<b>Introduzione ai lavori</b>
10:30	<b><u>Sessione 1</u></b> Moderatori: Fulvio Magni, UNIMIB e Giuliana Bianco, UNIBAS
10:30 – 11:00	<b>70 anni passati in un volo!</b> <i>Giorgio Giacomo Mellerio, Università di Pavia</i>
11:00 – 11:30	<b>Combining the twin ion method with ESI-QTOF MS to study drug metabolism, insecticide resistance and toxicology</b> <i>Richard A.J. O’Hair, University of Melbourne (Australia)</i>
11:30 – 11:50	<b>MALDI-MS Imaging of glomerular diseases: a possible diagnostic role?</b> <i>Andrew Smith, Università Milano Bicocca, Monza</i>
11:50 – 12:10	<b>MALDI-TOF Biotyper: andiamo oltre la routine!</b> <i>Elena De Carolis, Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma</i>
12:10 – 12:30	<b>TOF MS: from small molecules in gas phase to macro molecules on tissues. The times they are a-changin’</b> <i>Veronica Mainini, Shimadzu Italia</i>
12:30 – 12:50	<b>Identificazione dei prodotti di degradazione della sulforodamina B nei trasferelli mediante microLC-QTOF</b> <i>Fabio Gosetti, Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro", Novara</i>
12:50 – 13:10	<b>Once upon a time, there was a TOF that became a QTOF</b> <i>Simona Scarpella, Waters, Milano</i>
13:10 – 13:40	<b>2014-2016: 3 anni insieme! E uno sguardo al futuro ....</b> <i>Gianluca Giorgi, Presidente DSM</i>
13:40 – 15:00	<i>Pranzo di lavoro</i>
15:00	<b><u>Sessione 2</u></b> Moderatori: Donatella Caruso, UNIMI e Michele Suman, Barilla SpA
15:00 – 15:30	<b>When time of flight mass analysers meet Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry: an efficient tool for food volatilomics</b> <i>Franco Biasioli, Fondazione Edmund Mach, S. Michele All’Adige (TN)</i>
15:30 – 16:00	<b>QTOF nello studio della metabolomica dell'uva e dei vini</b> <i>Riccardo Flamini, CREA-VIT Conegliano</i>

16:00 – 16:20	<b>Studio di complessi proteici mediante spettrometria di massa: per certe cose ci vuole il TOF...</b> <i>Fabrizio Dal Piaz, Università degli Studi di Salerno</i>
16:20 – 16:40	<b>SWATH™ LC-TOF MS/MS: il traguardo delle <i>Data Independent Analysis</i></b> <i>Stefano Fiorina, AB Sciex</i>
16:40 – 16:55	<b>RAMASSAYS™: All-in-one synergistic combination of matrix-free mass spectrometry and plasmon-free surface enhanced Raman scattering for detection and analysis of small molecules</b> <i>Alessandra Gianoncelli, University of Brescia, Brescia</i>
16:55 – 17:10	<b>QToF and MALDI ToF ToF applications in the ADC field</b> <i>Sonia Troiani, Nerviano Medical Sciences, Nerviano</i>
17:10	Chiusura dei Lavori





# ABSTRACT

Il TOF compie 70 anni! Milano, 1 Dicembre 2016

## Settanta anni passati in un volo

**Giorgio G. Mellerio**

Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Pavia  
via Taramelli, 10 - 27100 Pavia E-mail: giorgiogiacomo.mellerio@unipv.it

Nel 1946 William E. Stephens dell'Università di Pennsylvania descrisse in una breve nota i principi dello spettrometro di massa a tempo di volo [*Phys. Rev.*, **69**, 691, (1946)] ovvero un selettore di velocità. Due anni più tardi A.E. Cameron e D.F. Eggers costruirono un apparecchio del medesimo tipo, cioè un ToF lineare: lo chiamarono "ion velocitron" [*Rev. Sci. Instrum.*, **19**, 605, (1948)]. Lo strumento aveva risoluzione eguale a circa 25. Il prototipo di un moderno ToF fu sviluppato da W.C. Wiley a I.H. McLaren nel 1955 [*Rev. Sci. Instrum.*, **26**, 324, (1955)], riprodotto, preceduto da un commento di M. Karas, in *J. Mass Spectrom.*, **32**, 1, (1997)]. Il loro progetto fu tradotto in uno strumento commerciale dalla ditta americana Bendix Corporation [W.C. Wiley, *Science*, **124**, 817, (1956)]. Nel dicembre 1955 alla Dow Chemical, R.S. Gohlke (1929-2000) e F.W. McLafferty interfacciarono un prototipo del Bendix direttamente ad un GC "fatto in casa" [R.S. Gohlke, *Anal. Chem.*, **31**, 535, (1959)]. La velocità di scansione (10000 spettri al secondo con intervallo di masse 1 - 600 u) rese possibile l'acquisizione degli spettri lungo tutto il cromatogramma e anche la rivelazione di più ioni selezionati; queste caratteristiche fecero del ToF lo strumento ideale per la GC-MS fino a quando venne soppiantato dal quadrupolo (1968). La "resurrezione del ToF" iniziò con lo sviluppo di nuove tecniche di ionizzazione come la ionizzazione/desorbimento di campo, con le misure di spettri di massa ottenuti con di ioni secondari (come 252Cf-PD) e culminò con gli studi che portarono al MALDI alla fine degli anni '80 [M. Karas, D. Bachman, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **78**, 53,(1987)]. All'inizio degli anni '70 a Leningrado il gruppo di Boris Alexandrovich Mamyrin (1919-2007) pubblicò un metodo per focalizzare raggruppamenti di ioni negli spettrometri a tempo di volo correggendo la distribuzione dell'energia cinetica [V.I. Karataev, B.A. Mamyrin, D.V. Schmikk, *Soviet Physics - Technical Physics*, **16**, 1177, (1972)] e raggiungendo la risoluzione di 3500 [B.A. Mamyrin, V.I. Karataev, D.V. Schmikk, V.A. Zagulin, *Soviet Physics - JETP*, **37**, 45, (1973)]. Il *reflectron* venne brevettato negli Stati Uniti nel 1978. Nel 1980 l'Accademia Russa delle Scienze costruì lo strumento MX-5302: un ToF con *reflectron* adatto all'analisi delle sostanze organiche e con risoluzione pari a 5600. Miglioramenti tecnologici nel campo del *reflectron* contribuirono anche ai risultati del premio Nobel 2002 K. Tanaka. Inoltre nel 1991 B. Spengler, D. Kirsch, K. Kaufmann [*Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **5**, 198, (1991)] tramite un ToF con *reflectron* ottennero informazioni strutturali (MALDI - *post source decay* PSD).

## Combining the twin ion method with ESI-QTOF MS to study drug metabolism, insecticide resistance and toxicology

**Richard A.J. O'Hair**

Bio21 Institute of Molecular Science and Biotechnology, The University of Melbourne, Melbourne, Australia E-mail: rohair@unimelb.edu.au

The rapid scan rates of time-of-flight (TOF) mass spectrometers provides an excellent match for separation via liquid chromatography. Here, an automated and non-targeted procedure is introduced for detecting metabolites of drugs, insecticides and known carcinogens without authentic metabolite standards using stable isotope labelling, liquid chromatography mass spectrometry (LCMS), and high performance computing.

LCMS of blood plasma extracts from rats that were administered a 1:1 mixture of acetaminophen (APAP) and  $^{13}\text{C}_6$ -APAP resulted in mass spectra that contained "twin" ions for drug metabolites that were not detected in control spectra (i.e., no APAP administered). By developing a program (High-resolution Twin-Ion Metabolite Extraction; HiTIME) that can identify twin-ions in raw high-resolution mass spectra, 9 doublets corresponding to APAP metabolites were identified.

We next applied this non-targeted methodology to identify the protein targets of chemically reactive metabolites thought to be responsible for acute drug toxicity or carcinogenesis. As a proof-of-concept study, 1:1 APAP and  $^{13}\text{C}_6$ -APAP were oxidised in liver microsomes. Following trypsin digestion and LCMS analysis, HiTIME scoring revealed twin-ion signals corresponding to peptides that had undergone reaction with NAPQI/ $^{13}\text{C}_6$ -NAPQI. These highly-scoring peptides were then sequenced via collision induced dissociation allowing the site of protein modification to be identified.

These methodologies can be used to rapidly detect the metabolites of small molecules and the protein targets of reactive metabolites without prior knowledge of their identity.

## MALDI-MS Imaging of glomerular diseases: a possible diagnostic role?

***Andrew Smith†, Vincenzo L'Imperio MD\*, Manuel Galli†, Martina Stella†,  
Clizia Chinello†, Franco Ferrario MD\*\*, Fabio Pagni MD\*, Fulvio Magni†***

† Department of Medicine and Surgery, Proteomics and Metabolomics Unit, University of Milano-Bicocca, Monza, Italy \* Department of Medicine and Surgery, Pathology, University of Milano-Bicocca, San Gerardo Hospital, Italy \*\*Department of Medicine and Surgery, Nephrology Unit, University of Milano-Bicocca, Monza, Italy

Glomerulonephritis (GN), such as focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), IgA nephropathy (IgAN), and membranous nephropathy (MN) represent the most frequent Glomerular Kidney Diseases (GKDs) worldwide and are a common cause of end-stage renal disease (ESRD). Without the correct diagnosis and, ultimately, the correct selection of therapeutic treatment, the patient has a higher probability of progressing to ESRD and requiring dialysis or transplantation. Although the renal biopsy currently remains the gold standard for the routine diagnosis of idiopathic GN, the invasiveness and difficulty of diagnoses related with this procedure means that there is a strong need for the detection of diagnostic and prognostic biomarkers that can be translated into less invasive diagnostic tools. Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry imaging (MSI) is a unique proteomic technology that explores the spatial distribution of biomolecules directly *in situ*, thus integrating molecular and morphological information. The possibility to correlate distribution maps of multiple analyses with histological features makes it an ideal research tool to discover new diagnostic and prognostic markers. This modern proteomic technique could represent an invaluable tool in the field of nephropathology, most specifically in the study of GNs, due to its potential to obtain proteomic signatures from pathological glomeruli and tubuli. Here we present our recent contributions to this field, underlining how MALDI-MS Imaging, when applied to both fresh-frozen (FF) and formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) renal biopsies, can be used to detect proteomic signatures of pathological glomeruli related with the aforementioned diseases. Briefly, employing FF tissue, this technique was able to generate molecular signatures capable of distinguishing between normal kidney and pathological GN, with specific signals ( $m/z$  4025, 4048 and 4963; AUC > 0.8) representing potential biomarkers of CKD progression. Moreover, specific disease-related signatures ( $m/z$  4025 and 4048 for FSGS,  $m/z$  4963 and 5072 for IgAN; AUC > 0.8) were detected. Furthermore, employing FFPE tissue, MALDI-MSI was able to generate molecular signatures of primary and secondary MN, with one particular signal ( $m/z$  1459), identified as a tryptic peptide related to Serine/threonine-protein kinase MRCK gamma, being over-expressed in the glomeruli of primary MN patients with respect to secondary MN. The potential to perform MALDI-MS Imaging of intact proteins from FF tissue and tryptic peptides, following on-tissue digestion, from FFPE tissue opens up many possibilities in nephropathology research. It is hoped that these initial findings can be built upon in order to obtain protein markers that can truly assist in the diagnosis of glomerular-based renal diseases.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This research leading to these results received funding from the European Union's Seventh Framework Programme FP7/ 2007-2013 under grant agreement FP7-PEOPLE-2013-ITN-608332 and was also supported by grants from the MIUR: FIRB 2007 (RBRN07BMCT\_11), FAR 2012-2015; and in part by Fondazione Gigi & Pupa Ferrari Onlus.

## **MALDI-TOF Biotyper: andiamo oltre la routine!**

***Elena De Carolis***

Università Cattolica del Sacro Cuore, Istituto di microbiologia, Roma  
E-mail: elenadecarolis@yahoo.it

Negli ultimi anni l' introduzione della spettrometria di massa MALDI-TOF ha portato ad una vera e propria rivoluzione nella diagnostica microbiologica determinando una notevole riduzione dei tempi e dei costi ma soprattutto apportando un notevole impatto nella gestione del paziente.

Oltre a consentire l'identificazione dei microrganismi comunemente isolati nella pratica clinica, il software MALDI BioTyper offre una varietà di algoritmi avanzati utili non solo all' ampliamento dei database attualmente disponibili ma anche ad una caratterizzazione dei microrganismi attraverso l'analisi della comparazione dei profili proteici che consente di espandere gli orizzonti applicativi di tale metodologia.

Tra gli studi più interessanti sicuramente vanno annoverate le recenti applicazioni volte alla determinazione rapida delle resistenze batteriche e fungine che aprono la strada verso nuove possibilità per la spettrometria di massa che muove così i primi passi per andare ad affiancare i test fenotipici e molecolari attualmente in uso.

## **TOF MS: from small molecules in gas phase to macro molecules on tissues. The times they are a-changin'**

***Veronica Mainini***

Shimadzu Italy Srl, Milano - Italy

Since the first publication on TOF MS analyzer, dated back to 1946, we have observed 70 years of growth and changes.

The first TOF analyzers were coupled to GC, nevertheless, they were soon implemented also with ESI and MALDI sources. In the meanwhile, the analyzer side was changing: reflector and TOF/TOF were introduced and then followed by hybrids, such as Q-TOF and IT-TOF. The versatility of the analyzer, the possibility to couple it to different sources together with the possibility to reach high resolution and accurate mass information, allowed to cover a wide range of applications.

We are reporting one of the most recent application related to MALDI-TOF technology: imaging mass spectrometry. In detail, we'll present data obtained from the analysis of lipids on tissue sections approached by a MALDI TOF/TOF instrument provided with a high energy collision cell and able to perform high resolution MS/MS analysis.

Results demonstrate that this is a very efficient approach, allowing the in situ characterization of several phospholipids. Moreover, it also elucidates the structure of isobaric species, confirming the potential of this technology to bridge between spatial and structural information on this class of compounds.

## **Identificazione dei prodotti di degradazione della sulforodamina B nei trasferelli mediante microLC-QTOF**

***Fabio Gosetti, Bianca Bolfi, Emilio Marengo***

Università del Piemonte Orientale, DISIT, E-mail: fabio.gosetti@uniupo.it

Il tatuaggio è una antica forma d'arte, che nel tempo si sviluppata in ogni parte del mondo fino a diventare negli ultimi anni sempre più popolare.

In letteratura sono presenti molti studi inerenti la tossicità degli inchiostri usati per i tatuaggi permanenti, ma riguardano particolarmente le allergie da metalli (nichel, piombo, cadmio). Invece, questo studio ha considerato la componente organica all'interno di trasferelli, tatuaggi non permanenti di cui usufruiscono principalmente i bambini.

Uno dei coloranti maggiormente utilizzati per la formulazione di questi prodotti è la sulforodamina B (o Acid Red 52, AR52). Siccome è possibile che coloranti non tossici e permessi possano dare origine a specie più tossiche dopo l'esposizione a irraggiamento solare, è stato valutato l'effetto dell'irraggiamento solare su AR52 sia in soluzione acquosa sia in soluzione simulante sudore, effettuando poi un confronto con la possibile degradazione su pelle suina.

Evidenze della degradazione del colorante si sono ottenute su entrambe le soluzioni dopo 9 giorni di irraggiamento. L'identificazione dei prodotti di degradazione è stata effettuata mediante un approccio non-target utilizzando uno strumento microLC accoppiato ad uno spettrometro di massa con analizzatore ibrido QTOF. L'identificazione dei prodotti di degradazione è stata condotta utilizzando un approccio multivariato basato sull'analisi delle componenti principali accoppiato all'analisi discriminante (PCA-DA). Sono stati identificati 5 prodotti di degradazione e 2 impurezze del colorante, e le loro strutture sono state proposte sulla base dell'interpretazione degli spettri di MS e MS/MS acquisiti. I prodotti di degradazione sono gli stessi sia per la soluzione acquosa che per la soluzione simulante il sudore, mentre la velocità di degradazione del colorante è leggermente più lenta in soluzione acquosa ( $t_{1/2} = 1.9$  giorni vs  $t_{1/2} = 1.6$  giorni).

Al fine di simulare al meglio l'effetto dell'irraggiamento del colorante sulla pelle, il metodo è stato applicato direttamente sulla pelle di maiale. Nessuno dei prodotti di degradazione precedenti è stato identificato, ma è emerso un nuovo segnale m/z. La mutagenicità dei prodotti di fotodegradazione identificati è stata valutata mediante approccio QSAR, che ha dato esito negativo per tutte le strutture indagate [1].

[1] F. Gosetti, B. Bolfi, E. Marengo, *Anal Bioanal Chem* (2015) 407, 4649–4659.



## Once upon a time, there was a TOF that became a QTOF

**Simona Scarpella,<sup>a</sup> Steve Preece<sup>b</sup>**

<sup>a</sup> Waters Italy, <sup>b</sup> Waters Corporation

From its first commercial introduction at ASMS in Portland, Oregon 20 years ago, the Q-ToF mass spectrometer has evolved from a purely research tool into a routine analytical instrument that is used across a wide variety of applications. The initial impetus for the development of this technology was driven by the requirements of ultra-high sensitivity biopolymer sequencing studies. Previous axial TOF instruments had been restricted to use with pulsed ionisation sources such as matrix-assisted laser desorption ionisation (MALDI) whereas, by using an orthogonal acceleration TOF analyser, the Q-ToF could be interfaced with continuous flow ionisation sources, such as electrospray, which remains the ionisation technique of choice for LC-MS/MS studies of proteins and peptides. By replacing the final mass analyser on a tandem quadrupole mass spectrometer with an oa-TOF, improvements in performance of one to two orders of magnitude could be realised. In addition, the higher mass resolution and mass accuracy of the TOF analyser allowed the removal of interpretation ambiguities and easy differentiation of multiple charge states. Since then, further improvements in sensitivity, mass resolution, mass accuracy and ease of use have allowed the Q-ToF to be used to solve problems in a broad range of applications, including metabolite and impurity characterisation, pesticide screening and clinical research.

In this presentation we will discuss the initial development of the Q-ToF mass spectrometer and look at its evolution in terms of performance and ease of use and its transition from the floor to the bench. We will also describe the development of the Q-ToF to incorporate ion mobility spectrometry to further enhance selectivity and reach lower detection levels.

## **When Time of Flight mass analysers meet Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry: an efficient tool for food volatilomics**

***Franco Biasioli***

Fondazione Edmund Mach San Michele all'Adige, Italy

Volatile metabolites play a relevant role in food science and technology in most, if not all, steps of the production chain: they are, e.g., important for plant ecology and physiology (plant response and signaling upon biotic or abiotic stress), they are drivers and products of fruit changes during ripening and storage and they control to a large extent the way we perceive food before (odor), during (flavour, aroma) and after (aftertaste) consumption. Moreover, being spontaneously and continuously released, volatile compounds provide a non-invasive and rapid tool for the control of food samples and the real-time monitoring of biological and technological processes.

For these reasons, the analysis of food volatilome is of interest if, mostly in an omic approach, it can provide i) high sensitivity and large dynamic range because volatile compounds can produce biological or sensory effects at different, possibly very low, concentrations and ii) fast and non-invasive measurements both to allow the screening of large sample sets and the monitoring of rapid processes.

These issues can be efficiently addressed by different Direct Injection Mass Spectrometry (DIMS) methods developed for volatile compound analysis, Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry (PTR-MS) in particular. The lack of specificity of these techniques, as compared with chromatographic ones, is compensated by other features: they are very fast, non-invasive and provide high sensitivity even without sample pretreatment.

This contribution, after a short description of a prototypical DIMS set-up based on PTR-MS, aims at pointing out how the introduction of Time of Flight mass analysers was a major breakthrough for DIMS based volatilomics.

Firstly, PTR-MS profiling of berry fruit, apple and dairy products has been used for sample sets exploration and to set classification or calibration models that link food volatilome with sensory or genomics allowing, for instance, i) the efficient identification of quantitative trait loci related to fruit volatile compounds, ii) the setting of instrumental models of sensory quality which should make "sensomic" studies realistic and iii) the identification of typicality markers. Secondly, a fully automated system for the monitoring of volatile compounds released during biological or technological processes has been developed and used to investigate microbiological processes as bread leavening, lactic and alcoholic fermentation and spoilage during storage. Finally, DIMS allows the investigation of the interaction of food with humans or animal models, both on a sensory and health perspective, by measuring metabolites released during food consumption (nose-space analysis) or in exhaled breath (breath analysis).

Some recent developments which should increase specificity of PTR-MS based methods without compromising its positive features are also described.

## QToF nello studio della metabolomica dell'uva e dei vini

**Riccardo Flamini**

Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria – Viticoltura (CREA-VIT) [riccardo.flamini@crea.gov.it](mailto:riccardo.flamini@crea.gov.it)

Lo studio della metabolomica mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione QToF trova applicazione nella caratterizzazione chimica delle uve (chemiotassonomia) e lo studio dell'espressione fenotipica dei vitigni, studiare le malattie della vite (es. il monitoraggio di fitoalessine), studiare gli effetti dei cambiamenti climatici e dei diversi metodi culturali della vite sui metaboliti secondari che determinano le caratteristiche qualitative delle uve e dei vini. La metabolomica permette inoltre di affinare le pratiche enologiche (es. studiare l'estrazione di polifenoli e precursori aromatici dalle uve in vinificazione), i metodi d'invecchiamento dei vini, i processi di appassimento delle uve destinate alla produzione di vini rinforzati.

I composti dell'uva e della vite sono anche impiegati nell'industria alimentare e della nutraceutica, in tale ambito particolarmente interessante è lo studio di uve prodotte da varietà ibride in quanto spesso caratterizzate da più ricchi profili e contenuti di metaboliti secondari rispetto alla *V. vinifera*.

Recentemente presso il CREA-VIT è stato sviluppato un metodo UHPLC/QToF di studio della metabolomica dell'uva e dei vini attraverso un approccio di *suspect screening analysis*.<sup>1</sup> Una prima ricerca *targeted* viene eseguita utilizzando un database di metaboliti putativi dell'uva e del vino che è stato appositamente costruito (*GrapeMetabolomics*). Tale ricerca fornisce un elenco dei composti attesi nel campione, ed una lista di composti isobari che escono nel cromatogramma a tempi di ritenzione diversi le cui identificazioni sono poi indagate mediante analisi MS/MS e lo studio dei tempi di eluizione cromatografica. Un successivo data processing *untargeted*, attuato con l'utilizzo algoritmi diversi, fornisce un elenco di formule molecolari di potenziali nuovi metaboliti che, se confermati, vengono inseriti nel DB che viene così ulteriormente ampliato. Attualmente sono state studiate oltre 60 varietà di uve, e *GrapeMetabolomics* contiene circa 1.100 entries. Eseguendo due analisi in modalità di ionizzazione positiva e negativa, il metodo consente di identificare in un estratto d'uva 320-450 composti putativi, a seconda della varietà. Molti sono polifenoli caratterizzati da importanti proprietà nutraceutiche: ad esempio, in un estratto di uva Raboso Piave, sono stati identificati oltre 80 composti antiossidanti come resveratrolo e derivati stilbenici, antociani, flavonoli, altri flavonoidi.

Questo approccio di metabolomica ha consentito di acquisire nuove conoscenze sulla chimica dell'uva, ad esempio con l'identificazione di nuovi derivati del resveratrolo, flavonoli glicosidi, polifenoli *p*-cumarati, la caratterizzazione dei precursori aromatici monoterpenici.<sup>2-4</sup>

Il metodo è stato anche utilizzato per lo studio di altri estratti naturali (fichi, caffè), e può trovare potenziali applicazioni nei prodotti d'interesse per l'industria alimentare, farmaceutica e della nutraceutica.

1. R. Flamini, M. De Rosso, *et al.* An innovative approach to grape metabolomics: stilbene profiling by suspect screening analysis. *Metabolomics*, 9:1243-1253 (2013).
2. M. De Rosso, L. Tonidandel, *et al.* Identification of new flavonols in hybrid grapes by combined liquid chromatography-mass spectrometry approaches. *Food Chem.*, 1635:244-251 (2014).
3. A. Panighel, M. De Rosso, *et al.* Putative identification of new *p*-coumaroyl glycoside flavonoids in grape by ultra-high performance-liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UHPLC/QTOF). *Rapid Comm. Mass Spec.*, 29(4): 357-366 (2015).
4. R. Flamini, M. De Rosso, *et al.* Profiling of grape monoterpene glycosides (aroma precursors) by ultraliquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UHPLC/QTOF). *J. Mass Spec.*, 49(12): 1214-1222 (2014).

## **Studio di complessi proteici mediante spettrometria di massa: per certe cose ci vuole il ToF...**

**Fabrizio Dal Piaz**

Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria "Scuola Medica Salernitana"  
Università degli Studi di Salerno, Via S. Allende 14. 84084 Baronissi (SA)

La caratterizzazione di complessi proteici costituisce un elemento essenziale per la comprensione di processi fisiologici e patologici, nonché per lo studio del meccanismo d'azione di farmaci e sostanze bioattive. In questo ambito, la spettrometria di massa rappresenta da più di vent'anni uno strumento fondamentale, e il suo ruolo è in continua evoluzione. A titolo d'esempio, basti pensare ai sempre più numerosi network proteici definiti grazie a studi di proteomica funzionale.

Un discorso specifico merita però la caratterizzazione strutturale dei complessi proteici, la definizione cioè non solo dei partner coinvolti in tali macro strutture, ma anche della loro stechiometria, della loro organizzazione spaziale e delle interazioni che ne stabilizzano la conformazione. Anche in questo specifico settore la spettrometria di massa ha giocato, e continua a giocare, un ruolo importante; approcci come la proteolisi limitata e lo scambio idrogeno deuterio accoppiati a tecniche di spettrometria di massa, infatti, consentono di ottenere informazioni preziose sulle regioni di interazioni tra monomeri in complessi multiproteici, o per individuare il sito di legame di piccole molecole con i loro partner macromolecolari. Inoltre, la spettrometria di massa nativa, consentendo la misura diretta e accurata del peso molecolare di macrocomplessi, permette di dedurre in modo diretto la stechiometria dei complessi, e di valutarne la stabilità in differenti condizioni. Queste metodiche hanno in comune almeno due caratteristiche: la prima è che la loro elevata versatilità pone pochi vincoli, consentendo di studiare le strutture macromolecolari anche in modelli sperimentali che mimino le condizioni fisiologiche. La seconda è che, in molti casi, per essere portate avanti con successo richiedono analizzatori di ioni in grado di fornire buone risposte in un ampio – talora ampissimo – intervallo di  $m/z$ . In questi casi non c'è alternativa: ci vuole il TOF!

## **SWATH™ LC-ToF MS/MS: il traguardo delle *Data Independent Analysis***

**Stefano Fiorina**

Sciex, Milano E-mail: stefano.fiorina@sciex.com

Era il gennaio 2013 quando sulla rivista Nature Methods<sup>1</sup> veniva eletto a "metodo dell'anno" la targeted proteomics. Per anni le analisi in questo ambito sono state condotte solo operando con la cosiddetta discovery proteomics, impiegando cioè gli spettrometri di massa per identificare un numero "x" di proteine all'interno dei campioni, senza però poi occuparsi della parte più importante ovvero capire se fra queste proteine poteva celarsi qualche biomarcatore che identificava sovra o sotto-espressioni del sistema cellulare studiato.

In questo ambito l'area di sviluppo più grande è rappresentata dalle Data Independent Acquisition (acronimo D.I.A.), ovvero sistemi di acquisizione dei dati basati sulla registrazione di TUTTI i dati del campione. Degno di nota in questo emergente settore è sicuramente un metodo messo a punto dal prof. Ruedi Aebersold dell'ETH di Zurigo, brevettato con il termine SWATH™<sup>2</sup>, che impiegando particolari analizzatori Q-TOF in grado di raggiungere velocità di acquisizione impressionanti (anche 200 spettri MS/MS al secondo) riesce a realizzare un vero e proprio "record digitale" del campione in un'unica iniezione.

Anche con limitate quantità di campione è quindi possibile in un'unica corsa, registrare TUTTE le informazioni dei peptidi presenti e i relativi spettri di MS/MS ad alta risoluzione. Il dato può essere poi riprocessato anche a distanza di tempo senza la necessità di dover iniettare nuovamente il campione. Questa tecnica di acquisizione sta ormai prendendo piede anche nel campo delle piccole molecole, sia nel settore farmaceutico<sup>3</sup> che in quello tossicologico<sup>4</sup>.

### Bibliografia

<sup>1</sup> Nature Methods, vol.10 num.1, January 2013

<sup>2</sup> Ludovic C. Gillet et al, Mol Cell Proteomics. 2012 Jun 11(6)

<sup>3</sup> Gérard Hopfgartner et al, Anal Bioanal Chem (2012) 402:2587–2596

<sup>4</sup> Scheidweiler KB et al, Anal Bioanal Chem. 2015 Jan;407(3):883-97

## "RAMASSAYS": All-in-one synergistic combination of matrix-free mass spectrometry and plasmon-free surface enhanced Raman scattering for detection and analysis of small molecules

***Michela Bertuzzi, Ivano Alessandri, Irene Vassalini, Nicolò Bontempi, Alessandra Gianoncelli***

INSTM and Chemistry for Technologies Laboratory, Mechanical and Industrial Engineering Department (DIMI), University of Brescia, via Branze 38, 25123 Brescia, Italy. b INSTM and Department of Molecular and Translational Medicine (DMMT), University of Brescia, Viale Europa 11, 25123, Brescia, Italy.

SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> core/shell (T-rex) beads were exploited as "all-in-one" building-block materials to create analytical assays that combine plasmon-free surface enhanced Raman scattering (SERS) and surface assisted laser desorption/ionization (SALDI) mass spectrometry (RaMassays). Such a multi-modal approach relies on the unique optical properties of T-rex beads, which are able to harvest and manage light in both UV and Vis range, making ionization and Raman scattering more efficient. RaMassays were successfully applied to the detection of small (molecular weight, M.W. <400 Da) molecules with a key relevance in biochemistry and pharmaceutical analysis. Caffeine and cocaine were utilized as molecular probes to test the combined SERS/SALDI response of RaMassays, showing excellent sensitivity and reproducibility. The differentiation between amphetamine/ephedrine and theophylline/theobromine couples demonstrated the synergistic reciprocal reinforcement of SERS and SALDI. Finally, the conversion of L-tyrosine in L-DOPA was utilized to probe RaMassays as analytical tools for characterizing reaction intermediates without introducing any spurious effects. RaMassays exhibit important advantages over plasmonic nanoparticles in terms of reproducibility, absence of interference and potential integration in multiplexed devices.

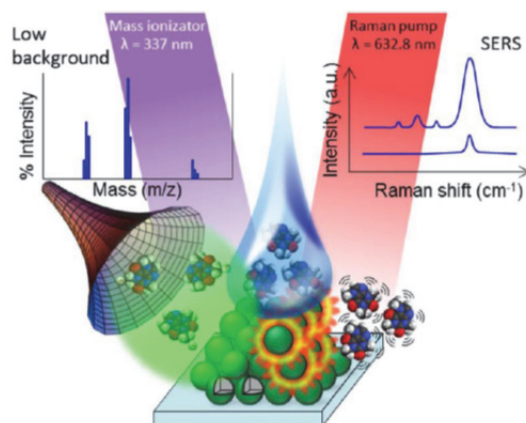


Figure 1: The RaMassay concept. 3D T-rex colloidal crystals are exploited as a highly efficient, background free matrix for mass analysis and all-dielectric substrate for plasmon-free SERS.

Alessandri, I., Vassalini, I., Bertuzzi, M., Bontempi, N., Memo, M., Gianoncelli, A. "RaMassays": Synergistic Enhancement of Plasmon-Free Raman Scattering and Mass Spectrometry for Multimodal Analysis of Small Molecules (2016) Scientific Reports, 6, art. no. 34521, DOI: 10.1038/srep34521

## QToF and MALDI ToF ToF applications in the ADC field

***Sonia Troiani, Ulisse Cucchi, Rita Perego, Matteo Salsa, Michele Caruso, Barbara Valsasina***

Nerviano Medical Sciences Srl

Antibody-Drug Conjugates (ADCs) combine the target specificity peculiar of monoclonal antibodies to the high cytotoxicity of a small molecule toxin selectively killing tumor cells while minimizing toxicity to normal tissues. During the last decade an increasing interest in ADCs has been observed due to the possibility to extend the therapeutic potential of mAbs.

With the aim to obtain a stable molecule able to release the cytotoxic drug inside the tumor, different parameters have to be considered and mass spectrometry characterization is required in many different steps of the process.

ADCs are generated by covalently binding the selected small molecule toxin through a linker to specific antibody residues, usually Cysteine or Lysine. This conjugation, however, increases the complexity of the products generating heterogeneous mixtures of isomers and isoforms. A careful characterization of all the different species requires the development of new protocols aimed to characterize both the biological molecule as well as the small drug present in the ADC. Moreover, this careful characterization is mandatory to guarantee batch to batch reproducibility during drug development.

Several analytical technologies, especially mass spectrometry, have provided the tools to better characterize these products, giving ADC developers the information needed for process and formulation development, and for identifying the methods needed for QC lot-release and stability testing.

At NMS the availability of QToF and MALDI ToF/ToF instrumentation allowed to correctly assign the Drug Antibody Ratio to different isolated ADC population while peptide mass fingerprinting by MALDI ToF/ToF identified the different modified residues in the isoforms. Results obtained using these powerful technologies on a proprietary drug conjugated to a commercial antibody will be presented.





## INDICE DEGLI AUTORI

Alessandri I.	20
Bertuzzi M.	20
Biasioli F.	16
Bolfi B.	14
Bontempi N.	20
Caruso M.	21
Chinello C.	11
Cucchi U.	21
Dal Piaz F.	18
De Carolis E.	12
Ferrario F.	11
Fiorina S.	19
Flamini R.	17
Galli M.	11
Gianoncelli A.	20
Gosetti F.	14
L'Imperio V.	11
Magni F.	11
Mainini V.	13
Marengo E.	14
Mellerio G. G.	9
O'Hair R. A.J.	10
Pagni F.	11
Perego R.	21
Preece S.	15
Salsa M.	21
Scarpella S.	15
Smith A.	11
Stella M.	11
Troiani S.	21
Valsasina B.	21
Vassalini I.	20