

Tecnica analitica: **liquido cromatografia/spettrometria di massa (LC/MS)**

Campionamento e tipo di analisi: tecnica adatta alla determinazione qualitativa e quantitativa di composti organici da media ad alta polarità, in campioni liquidi o solidi (<1 mg). A seconda degli analiti di interesse possono essere necessari stadi di estrazione, purificazione e preconcentrazione. Analisi microinvasiva e microdistruttiva.

Principio di funzionamento: il campione viene iniettato all'interno di un sistema liquido cromatografico costituito da una colonna cromatografica termostata, attraversata da un flusso di solvente che può essere costituito da una miscela di più solventi. La eluizione può avvenire sia isocraticamente che a gradiente di polarità, questo ultimo ottenuto variando la composizione percentuale della miscela di solventi nel tempo. Le varie specie chimiche che compongono il campione vengono separate durante il loro percorso nella colonna in base alla loro diversa interazione con le particelle che la costituiscono, e rilevate dallo spettrometro di massa con filtro quadrupolare, dopo essere state ionizzate. Le tecniche di ionizzazione per i sistemi liquido sono definite soft e consistono in un processo di desolvatazione assistita da un gas di nebulizzazione che avviene attraverso un capillare carico e porta alla formazione di goccioline cariche che per esplosione di coulomb trasferiscono la carica agli analiti (ESI). In questi casi viene in genere rilevato lo ione molecolare e i suoi addotti, ad esempio con Na^+ o NH_3 . La sorgente APCI si distingue per una ionizzazione a cascata in gas phase ottenuta per impatto elettronico di elettroni ottenuti per effetto corona, facendo attraversare al solvente una punta carica ad alto voltaggio. In questo caso si può lavorare anche con molecole di bassa polarità e rispetto alle analisi condotte con ionizzazione mediante ESI si riscontra negli spettri di massa un maggior grado di frammentazione. In genere operando in ionizzazione positiva si rileva l'addotto dello ione molecolare con H^+ .

Procedura analitica adottata per i campioni di unguenti antichi: il campione (0,1-1 mg) viene sottoposto a estrazione a caldo per 2 ore con una miscela cloroformio metanolo 2-1 e successivamente filtrata con filtro in fibra di vetro. Viene poi eseguita una separazione con imbuto a freddo raccogliendo una frazione apolare in esano e una frazione polare in etanolo-acqua 70 a 30. La frazione apolare è anidrificata, rifiltrata con filtro in PTFE, concentrata e diluita nel solvente di eluizione cromatografica.

Strumentazione e condizioni sperimentali adottate: è stato utilizzato un liquido cromatografo accoppiato con spettrometro di massa 2010A (Shimadzu, Japan) equipaggiato con un iniettore Rheodyne 7725. La ionizzazione è ottenuta mediante una sorgente APCI con un flusso di azoto posto 2,5 ml/minuto. Lo scan positivo è effettuato su un range di massa 300-1000 con una velocità di scan pari a 500 amu al

secondo. La temperatura dell'interfaccia è posta a 400°C , la temperatura del CDL a 250°C e la temperatura del Block Heater a 200°C. Il voltaggio del Detector è settato a 1,5 kV mentre quello dell'interfaccia a 4,5 kV .

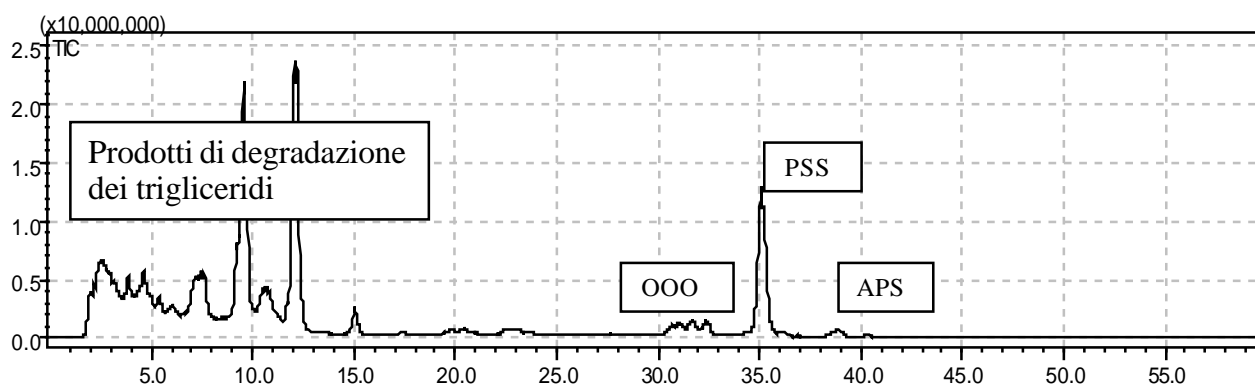
Condizioni della separazione liquido cromatografica:

- colonna C18 Ascentis C18 15cm*4,6mm*5µm (SUPELCO, Bellefonte, USA in), precolonna forno termostato a 20 C
- solventi: isopropanolo e metanolo, flusso 0,8 ml/minuto temperatura della colonna: 20°C;
- gradiente di eluizione: percentuale iniziale di isopropanolo 25% e isocratica per 6 minuti; successivamente gradiente fino a 60% in 24 minuti

Informazioni ottenibili: LC/MS analysis give detailed information to recognize organic compounds, principally based on comparing retention time of standard and mass of the molecular ion with standard he. The origin of natural organic material is (polifenoli, cere naturali, oli e grassi) in base alla presenza di specifici biomarker molecolari oppure in base a specifici profili di molecole significative . Il profilo cromatografico dei trigliceridi ad esempio permette di porre ipotesi fondate sulla della fonte (oli e grassi di origine vegetale o animale).

Esempio di analisi: Cromatogramma ottenuto mediante LC/MS di un campione dell'unguento etichettato come "ung. Rosatum", che fa parte della collezione del Museo Aboca di Sansepolcro (XVIII secolo), frazione APOLARE dopo estrazione e concentrazione.

La presenza di diacilgliceroli e triacilgliceroli idrossilati indica un forte invecchiamento protratto nel tempo. La presenza di PSS e APS fa presumere l'utilizzo di un grasso di origine animale e in particolare maiale. Il rinvenimento di una cospicua quantità di OOO fa propendere per un utilizzo anche di olio di oliva, in quanto difficilmente questo trigliceride sopravvive a un esteso processo degradativo.



Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

The analytical technique, an overview: Lc-Ms is a powerful analytical tool to identify and quantify the individual components of a mixture, especially dealing with organic compounds from low to high polarity in liquid or solid matrix (<1 mg). Normally extraction and purification are necessary to obtain the analytes in solution, and in some cases, to separate them from interfering species that may be present in the sample matrix. This analytical approach could be considered micro-invasive and micro-destructive.

Information about Lc-Ms technology: The sample to be analyzed is introduced by an injector in to the stream of a moderately polar mobile phase, based of a mixture of solvents, and traverse the column at a defined temperature and flow rate. The motion of the analytes through the column is slowed by hydrophobic interaction with the non-polar stationary phase (reversed phase chromatography). It is possible to vary the mobile phase composition during the analysis, to achieve better separation. The mass detection provide the specific retention time of each molecule and the relative mass spectra allow to identify and quantify unknowns.

Two soft techniques are available to obtain the necessary ionisation: APCI and ESI. In the electrospray ionization (ESI) the liquid containing the analytes is dispersed by an electrically charged spray into a fine aerosol. This aerosol is sampled into the first vacuum stage of a mass spectrometer through an electrically conducting capillary exposed at the open end to an electric field. Heating and nebulization by an inert gas aid the formation of charged droplets and solvent evaporation until the charged droplets become unstable upon reaching its Rayleigh limit. At this point, the droplets deform and emit charged jets in a process known as Coulomb fission that gives the charged ions. The ions observed by mass spectrometry (in our case with a quadrupole mass filter) may be quasimolecular ions created by the addition of a proton $[M + H]^+$, or of another cation such as sodium ion, $[M + Na]^+$ and molecular adducts. Multiply charged ions are formed if the analytes are macromolecules, but they are rarely observed by operating with small molecules.

In the atmospheric pressure chemical ionization (APCI) the ionization occurs in the gas phase, unlike ESI, where the ionization take place in the liquid phase. This is because, in this case, the entire aerosol cloud heated to relatively high temperatures (above 400 degrees Celsius), is subjected to a corona discharge in a gaseous state that creates ions. The advantage of APCI is that it is possible to use a non-polar solvent as a mobile phase solution. The ions are typically produced by the addition of a proton $[M + H]^+$ in the positive ion mode and unlike ESI, APCI only produce singly charged ions. An quite extensive fragmentation pattern could be observed

Sample preparation: the archaeological sample (0,1-1 mg) was submitted to warm extraction for 2 hours with chloroform-methanol (2:1) and then filtered. A second stage of cold extraction gave a non-polar fraction in hexane and a polar fraction in

ethanol :water (70-30). Before the injection in the liquid chromatography system, the organic fraction was dried, diluted in the eluent mixture and filtered on PTFE.

Chromatographic equipment and method: Lc-Ms analysis was carried out using a Shimadzu 2010A equipped with a Rheodyne 7725 injector. The analytical column was an Ascentis C18 15cm*4,6mm*5µm (SUPELCO , Bellefonte, USA). The mobile phase was composed of Isopropanol and Methanol . The flow rate was 0,8 ml/min and the column temperature was fixed at 20°C . The gradient program was: 20% isopropanol for the initial 6min and then linear gradient for 36 min to afford 60% in isopropanol . The Ms system was an Octapole mass filter with an Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) source. The instrument was settled on the positive ionization mode. The operating conditions were: Nitrogen Flow= 2,5 ml/min ; Detector Voltage = 1,5 kV; Interface Voltage =4,5 kV; CDL temperature= 250°C ; Interface temperature= 400°C; Block Heater Temperature =200°C. Mass acquisition are obtained in full scan from 300 to 1000 amu with scan speed 50 amu/sec.

Achievable results : LC/MS provide detailed information to recognize organic compounds, principally based on accurate comparison with retention time of standards and on the interpretation of Mass Spectra (molecular ion, its adducts and in rare cases fragmentation pattern). It is possible to hypothesize the main natural organic components (polyphenols, natural waxes, oils and fats) by checking the presence of particular biomarker or of a specific molecular composition. As an example the relative abundance of some triglycerides allows to discriminate between vegetable oils and animal fats .

An example : This representative LC-MS Chromatogram refers to the non polar fraction of an archaeological sample of a balsam? labelled as “ung. Rosatum” , from the collection Aboca Museum in Sansepolcro (XVIII century) The presence of monoacylglycerols, diacylglycerols and hydroxylated triacylglycerols could be related with an extensive degradation process. The PSS and APS triacylglycerols are typical in lard. The fact that triolein is still present as intact triacylglycerol indicate that olive oil was used.

