



**DIPARTIMENTO DI
SCIENZE CHIMICHE
CORSO DI LAUREA
MAGISTRALE IN CHIMICA**

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**Sviluppo di un metodo basato su HPLC-MS per la
determinazione di tioli in matrici enologiche**

Relatore: Prof.ssa Sara Bogialli

Controrelatore: Prof.ssa Miriam Mba

LAUREANDO: Vonella Francesca

**ANNO ACCADEMICO
2021/2022**

*Alla mia scimmietta, Camilla,
che ha reso tutto più bello e speciale...*

Indice

Glossario	7
1. Introduzione	9
1.1. L'aroma	11
1.2. I tioli	15
1.2.1. Biogenesi	19
1.3. Metodi di analisi	23
1.3.1. Estrazione	24
1.3.2. Separazione cromatografica	29
1.4. Scopo della tesi	31
2. Materiali e Metodi	33
2.1 Reagenti	33
2.2 Descrizione degli esperimenti	36
2.2.1. Reazione di derivatizzazione	36
2.2.2. Estrazione in fase solida (SPE)	36
2.2.3. Analisi HPLC-Q-ToF	36
3. Risultati e Discussione	39
3.1. Ottimizzazione dei parametri cromatografici e di spettrometria di massa	39
3.2. Ottimizzazione della reazione di derivatizzazione	50
3.3. Estrazione in fase solida (SPE)	58
4. Conclusione	61
Appendice	63
5. Strumentazione	63
5.1. HPLC	63
5.2. Spettrometro di massa	66
5.2.1. Ionizzazione Elettrospray (ESI)	68
5.2.2. Q-ToF	69
5.3. Estrazione in fase solida	71
Bibliografia	75
Ringraziamenti	79

Glossario

- 3MH: 3-Mercaptohexan-1-ol
- 3MHA: 3-Mercaptohexyl acetate
- MMBF: 3-Mercapto-3-methylbutyl formate
- 4MMP: 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one
- 4MMPOH: 4-Mercapto-4-methylpentan-2-ol
- 6MH: 6-Mercaptohexan-1-ol
- BT: Phenylmethanethiol
- FT: Furan-2-ylmethanethiol
- Cys: Cisteina
- DTDP:4,4'-Dithiodipyridine
- ebselen: 2-Phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one
- EFSA: European Food Safety Authority
- EIC: Extracted Ion Chromatogram
- ETP: Ethyl propiolate
- GSH: Glutathione
- HS-SPME: Headspace Solid-Phase Microextraction
- LLE: Liquid-Liquid Extraction
- LMW: Low Molecular Weight
- LOD: Limit Of Detection
- ODTs: Odor Detection Thresholds
- OPA: *o*-Phthaldialdehyde
- *p*-HMB: *p*-Hydroxyphenylmercuric acetate
- PFBBBr: 2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl bromide
- SPE: Solid-Phase Extraction
- VCF: Volatile Compounds in Food

1. Introduzione

Il vino è una bevanda ottenuta dalla completa o parziale fermentazione alcolica di acini d'uva pestati o dal succo d'uva (mosto). Il vino viene prodotto e consumato nella zona Mediterranea fin dall'antichità; gradualmente, però, questo si è diffuso da prima nel Nord Europa, e successivamente in tutto il resto del continente. Di fatti, anche se grazie alla globalizzazione la bevanda è stata esportata su scala mondiale, l'Europa continua a far da padrona nella produzione e consumazione, con l'Italia, la Francia e la Spagna come paesi leader per la qualità e per l'ampia offerta dei prodotti.¹

Tra le diverse specie di *Vitis*, la vite da vino più importante e di qualità è la *Vitis Vinifera*, maggiormente coltivata nella zona meridionale del continente; tuttavia, negli ultimi decenni, questa viene incrociata con altre varietà per incrementarne la resistenza ai pesticidi, preservando, però, la qualità del prodotto finale. Generalmente, queste coltivazioni si differenziano per forma, colore e grandezza degli acini d'uva, che vengono destinati alla produzione di vino bianco, vino rosso o uva da tavola, ma anche per la loro composizione di zuccheri e aromi.

La parte più importante del processo di vinificazione è la fermentazione alcolica, dalla durata variabile, che può avvenire naturalmente ad opera di lieviti presenti sulla superficie degli acini, oppure grazie a lieviti accuratamente selezionati che vengono inoculati nel mosto. Questa si divide in due fasi: la principale, chiamata primaria (che varia tra i 5 e i 7 giorni), alla fine della quale gli zuccheri, glucosio e fruttosio, sono stati ampiamente convertiti in etanolo mentre le proteine, le pectine, i tannini, insieme all'acido tartarico e alle cellule del lievito si depositano sul fondo; e una secondaria, che può essere soppressa in base al prodotto che si vuole ottenere, con l'aggiunta di acido solforoso, per ritenere gli zuccheri residui non fermentati (dolcezza residua). La fermentazione alcolica si ferma ad una concentrazione di etanolo che varia tra il 12% e il 15% dipendentemente dal tipo di lievito impiegato, se la concentrazione supera questa percentuale è probabile che l'etanolo sia stato aggiunto artificialmente post-fermentazione.² Fino agli ultimi anni il lievito più usato per il processo era il *Saccharomyces cerevisiae*, poiché era il più disponibile commercialmente, ma nell'ultimo decennio, grazie allo sviluppo di protocolli di analisi migliori, le nuove ricerche hanno confermato che molti ceppi non-*Saccharomyces* hanno la capacità di risolvere alcuni problemi del processo di vinificazione e di aumentare la qualità del prodotto. Essendo però incapaci in molti casi di portare a termine la fermentazione alcolica, questi vengono spesso utilizzati insieme ai *Saccharomyces cerevisiae*.³ La composizione chimica del vino varia non solo a seconda del tipo di uva, della fermentazione e dei lieviti impiegati, ma è condizionata anche da diverse altre cause, come i fattori ambientali e lo stoccaggio dell'uva, del mosto e del prodotto

finito. Le analisi principalmente si concentrano sull'estratto, ossia su ciò che non è volatile o distillabile, sull'alcol, sugli zuccheri, sui tannini, sui composti azotati e su quelle sostanze aromatiche che vanno a costituirne il bouquet, vale a dire tutto ciò che può influenzare la qualità del vino finale.²

Questo concetto è molto complesso e si collega a molti elementi intrinseci (definiti dall'esperienza di ogni persona durante l'assaggio) così come a quelli estrinseci, come il processo di vinificazione, il prezzo, l'origine, la forma della bottiglia e il colore, che influenzano le scelte dei consumatori. Tra questi, l'aroma è considerato uno dei più significativi al fine di stabilire la qualità e il carattere del vino, determinando in questo modo l'accettabilità da parte del consumatore.⁴

1.1. L'aroma

Quando un cibo o una bevanda vengono consumati, un'interazione di sapore, profumo e consistenza gli conferiscono una caratteristica complessiva, che in inglese viene definita "flavour", ma che difficilmente trova un fedele corrispettivo nelle lingue di derivazione latina; in italiano può essere tradotta come gusto.²

I composti responsabili del sapore sono generalmente non-volatili a temperatura ambiente e per questo interagiscono solo con i recettori sensoriali collocati nella cavità orale, le gemme gustative, presenti all'interno delle papille gustative, che permettono di riconoscere con alta sensibilità le diverse molecole. Quattro sono i sapori fondamentali che vengono riconosciuti dai recettori: amaro, acido, dolce e salato; alcune ricerche, però, riferiscono della percezione di altri due sapori che potrebbero costituire un sottogruppo: l'umami e il grasso. Oltre a questi, è possibile la percezione di altre presunte qualità come il kokumi (sapore ricco, denso e delizioso) o i gusti metallici.⁵

Al contrario, i composti che conferiscono l'aroma sono volatili e vengono percepiti dai recettori situati nel tessuto olfattivo della cavità nasale, inizialmente attraverso il naso stesso e successivamente, essendo rilasciati durante la masticazione, tramite la gola (rilevazione rispettivamente ortonasale e retronasale). Anche per le sostanze aromatiche vengono identificati degli odori fondamentali, facendo infatti riferimento alla teoria di John Amoore degli anni 50 essi sono: canforacei, eterei, floreali, mentati, muschiati, pungenti, putridi e terrosi.⁶ Queste sostanze sono numerose e presentano un'ampia variabilità delle caratteristiche fisico-chimiche le cui combinazioni permettono così di conferire proprietà aromatiche uniche e differenti ad ogni alimento.

Un database commerciale, il Volatile Compounds in Food (VCF)⁷, ha stilato una lista con un totale di 9902 componenti volatili ad oggi identificati in letteratura, ma continuamente in aggiornamento, per prodotti alimentari naturali e processati. Tra tutti, i composti solforati rappresentano la seconda più vasta categoria, preceduti solamente dagli eteri, e rappresentano circa il 13% del totale (vedi **Figura 1.**)⁷

LISTA DEI COMPOSTI VOLATILI VCF

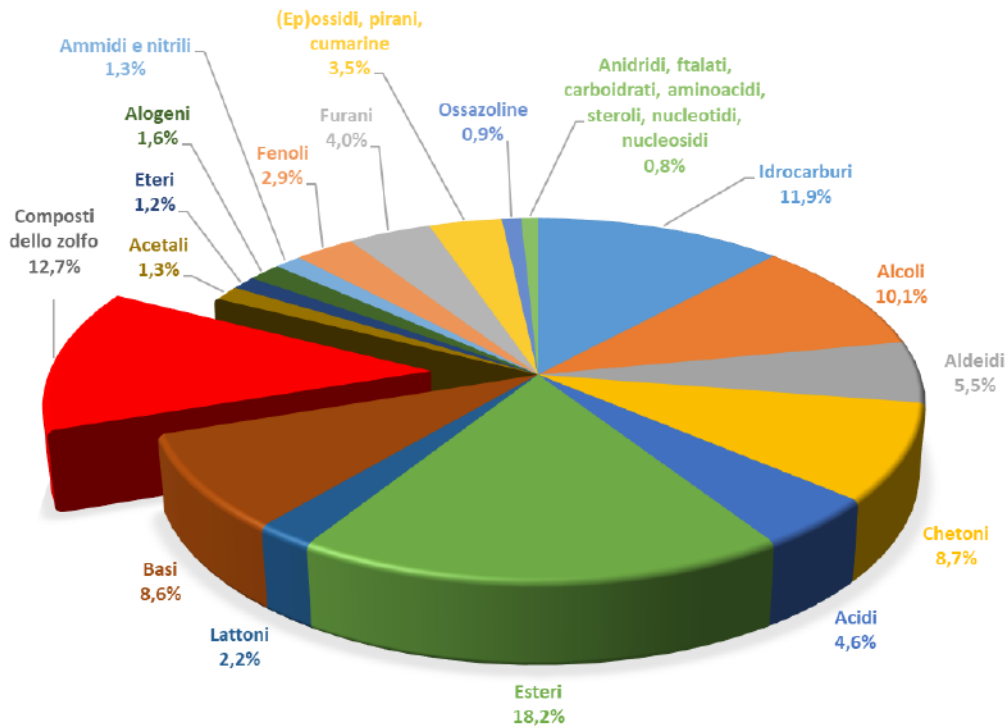


Figura 1. Grafico a torta che mostra le relative percentuali di composti volatili identificati negli alimenti in accordo con il database Volatile Compounds in Food (VCF), dove ogni settore rappresenta una categoria chimica di composti.⁷

Nel vino i descrittori aromatici di maggior interesse sono: citrico, dolce, legnoso, fiorito, miele, cocco, tropicale, frutti di bosco e di albero, fermentato, tostato, speziato, alcolico, vanigliato, erbaceo, lattico (formaggio, burro), ossidato, ridotto (animale, pelle) e tabacco (vedi **Figura 2**).⁴ I composti responsabili dell'aroma nella matrice enologica possono essere classificati in base al periodo in cui essi si formano rispetto al processo di vinificazione:

- **Composti aromatici varietali:** dati da precursori varietali, normalmente inodore, che durante il processo possono generare composti odoriferi tipici della varietà d'uva scelta. Sono presenti all'interno dell'uva in forma libera o legata, la cui rottura del legame avviene a seguito di operazioni tecniche durante il processo di vinificazione. Sono varietali tutti quei composti che conservano la struttura del residuo aromatico biosintetizzato dalla pianta, anche se questi vengono rilasciati ad opera di reazioni enzimatiche dei lieviti durante la fermentazione (tioli).
- **Aromi di pre-fermentazione:** appaiono tra il raccolto e la fermentazione alcolica attraverso reazioni enzimatiche che avvengono a causa della rottura dell'acino d'uva.

- Aromi di fermentazione: prodotti secondari del metabolismo di microorganismi e sono responsabili del carattere olfattivo vinoso e fruttato del prodotto finale.
- Aromi di post-fermentazione: si formano durante l'invecchiamento del vino e coinvolgono reazioni chimiche e biochimiche che convertono i composti volatili. Sono responsabili del complesso bouquet dei vini invecchiati.⁸

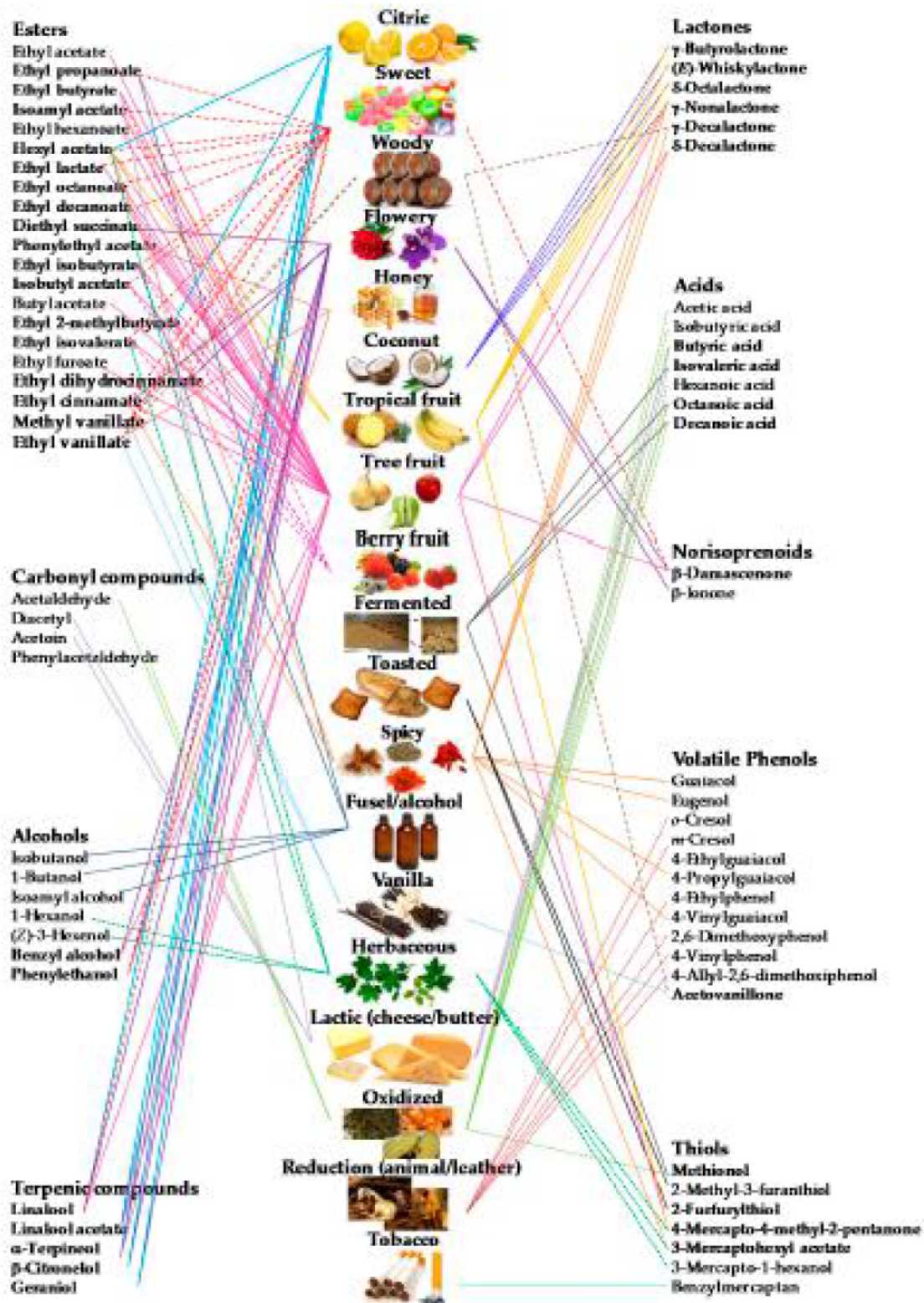
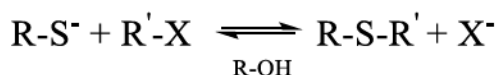


Figura 2. La colonna centrale rappresenta i 19 descrittori aromatici mentre le colonne laterali sono i 71 composti volatili che possono contribuire a queste note.⁴

1.2. I tioli

I tioli sono molecole organiche che legano un gruppo sulfidrilico ($-SH$), a differenza degli alcoli, hanno bassi punti di ebollizione, non essendo in grado di formare legami a idrogeno, per la bassa elettronegatività dello zolfo, e di conseguenza sono spesso volatili anche a temperatura ambiente. I tioli a basso peso molecolare (LMW), storicamente conosciuti come mercaptani per la loro capacità di legarsi covalentemente con i metalli pesanti come il mercurio (*mercurium captans*) e l'arsenico, sono una sottocategoria dei Composti Volatili dello Zolfo. Questi composti, caratterizzati da un odore forte e pungente, sono di particolare interesse perché hanno alcune delle più basse Soglie di Percettibilità Olfattiva (ODTs) e sono identificati spesso come sostanze odoranti potenti.

Se confrontiamo queste molecole con gli alcoli, che al posto dello zolfo si legano all'ossigeno ($R-OH$), i tioli risultano essere acidi più forti, con pK_a di circa 10, e lo ione tiolato che si forma a seguito della dissociazione, essendo più grande e quindi meno solvatato, in un solvente protico si comporta come un buon nucleofilo.⁹



Sono composti molto reattivi che a pH acidi e/o in presenza di ioni metallici potrebbero isomerizzare, riarrangiare, reagire con polifenoli e ossidare per formare i rispettivi disolfuri. I tioli LMW, data la loro elevata reattività, sono coinvolti nella risposta a quasi tutti i fattori di stress e nella regolazione del metabolismo cellulare delle piante, possono inoltre modificare l'attività di enzimi regolatori e svolgono una funzione detossificante per l'organismo. Questi hanno, inoltre, non solo strutture variabili tra di loro, infatti possono contenere diversi gruppi funzionali e anelli aromatici, ma eventuali enantiomeri, dalle proprietà chimico-fisiche quasi uguali, generano una grande varietà di molecole spesso con diversi aromi e ODT.¹⁰

Per dare un'idea della varietà di composti solforati LMW presenti negli alimenti, sia sintetici che derivanti da fonti naturali, almeno 188 sono stati classificati e testati dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) e almeno cinquanta di questi sono tioli, classificati come:

- ❖ semplici tioli con catene laterali alifatiche non-ossidate o aromatiche;
- ❖ tioli con catene laterali ossidate, in cui un alcol, aldeide, chetone, estere o acido carbossilico è presente;

❖ ditioli.¹¹

In ambito biologico, il glutatione (GSH) è il tiolo più abbondante sia negli organismi vegetali che in quelli animali, ed è uno dei più importanti grazie alle sue funzioni regolatrici e il ruolo nelle reazioni redox. Non solo come tale, ma anche alcuni suoi derivati sono ampiamente studiati, primo fra tutti la cisteina (Cys), presente in concentrazione minore essendo velocemente convertita in altri composti, che gioca un ruolo chiave in molti percorsi metabolici e nella sintesi proteica.

I tioli a basso peso molecolare sono, inoltre, molecole che giocano un ruolo chiave nell'attribuzione del gusto a cibi e bevande, in particolar modo per quanto riguarda il bouquet aromatico del vino. Se molecole come l'etantiolo e il metantiolo sono responsabili di alcuni difetti olfattivi, come l'odore ridotto, di uova marcie e solforoso¹², altri, soprattutto i tioli varietali a catena lineare, presenti a basse concentrazioni che oscillano tra parti-per-milione e parti-per-trilione, donano al vino un piacevole aroma fruttato e tropicale (vedi **Tabella 1.**)⁸ Quattro tioli varietali sono stati spesso, se non quasi sempre, identificati nel vino, indipendentemente dalla sua origine, dalle caratteristiche e dal processo di vinificazione. È emerso, a seguito di analisi e ricerche, che queste molecole, ovvero il 4-mercapto-4-metil-2-pentanone (4MMP), il 3-mercaptoesil acetato (3MHA), il 3-mercapto-1-esanolo (3MH) ed il 4-mercapto-4-metil-2-pentanololo (4MMPOH), contribuiscono positivamente al gusto unico e caratteristico di ogni tipologia di uva ed influenzano significativamente il consumatore sulla scelta del prodotto finale. In particolar modo, essi sono presenti nel Sauvignon Blanc e nel Riesling, indentificandosi come composti chiave per il loro aroma singolare, motivo per cui risultano di maggior interesse. Per quanto riguarda l'aroma specifico che questi conferiscono al vino, il 3-mercapto-1-esanolo (3MH), isolato inizialmente nel frutto della passione, e il 4-mercapto-4-metil-2-pentanololo (4MMPOH) donano note tropicali e agrumate, mentre il derivato acetato del 3MH (il 3-mercaptoesil acetato, 3MHA) e il 4-mercapto-4-metil-2-pentanone (4MMP) conferiscono in particolare la fragranza di ribes nero e di bosso. Tuttavia, al bouquet aromatico del vino contribuiscono anche altri tipi di tioli polifunzionali, di tipo non varietale, come il 2-furfuriltiolo (FT) e il benziltiolo (BT) che donano al vino e allo champagne l'aroma affumicato e tostato, soprattutto nel caso siano stati invecchiati in botti di rovere tostato.¹³ In **Tabella 2.** sono stati riportati per ognuno dei sei composti i vini nei quali è stato ad oggi identificato.

Tabella 1. Tioli volatili identificati nei vini di *Vitis Vinifera*.⁸

Origine	Numeri	Molecole	Nomi	Odori	Soglia di percezione in soluzioni modello (ng/L)	Range di concentrazione riportato in letteratura (ng/L)
Tioli Varietali	1		4-mercapto-4-methylpentan-2-one (4MMP)	Bosco, frutto della passione, ginestra, ribes nero	0.8	Fino a 400
	2		3-mercaptohexyl acetate (3MHA)	Frutto della passione, pompelmo, bosso, uva spina, guava	42 in miscela racemica	Fino a 2500
	3		3-mercaptohexan-1-ol (3MH)	Pompelmo, frutto della passione, uva spina, guava	60 in miscela racemica	Fino 19000
	4		3-mercaptopentan-1-ol	Pompelmo	950	90-300
	5		4-mercapto-4-methylpentan-2-ol (4MMPOH)	Bosco, fibre di ginestra, scorza di agrumi, pipi di gatto	55	Fino a 90
	6		3-mercapto-2-methylbutan-1-ol	Pompelmo	35	25-75
	7		3-mercaptoheptan-1-ol	Cipolla cruda	-	80-150
Tioli Non Varietali	8		2-mercaptoethyl acetate	Carnoso	-	-
	9		3-mercaptopropyl acetate	Carnoso	-	-
	10		3-mercapto-2-methylpropan-1-ol	Brodo, sudore	3000 (in acqua)	25-10000
	11		furan-2-ylmethanethiol (FT)	Caffè	0.4	0.4-62
	12		ethyl 3-mercaptoacetate	Carnoso	200	40-12000 (in vini frizzanti)
	13		phenylethanethiol (BT)	Affumicato	0.3	10-40
	14		2-methylfuran-3-thiol	Carnoso	0.4-1.0 (in acqua)	>100
	15		ethyl 2-mercaptoacetate	Fruttato	500	-
	16		3-mercapto-2-methylpentan-1-ol	Cipolla cruda	-	-
	17		3-mercaptobutan-1-ol	Cipolla, porro	-	-
	18		3-mercapto-3-methylbutan-1-ol	Pomo cotto	1500	-

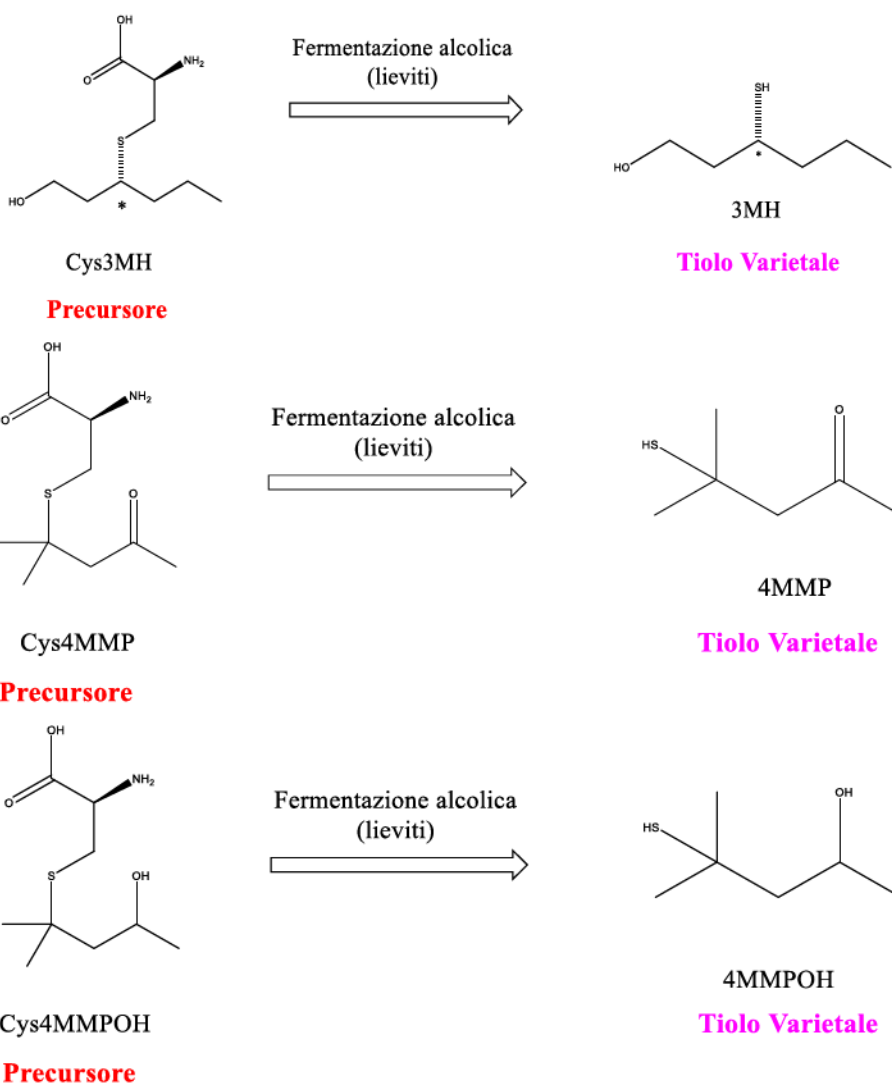
Tabella 2. Tioli di interesse e la relativa identificazione in diversi vini provenienti dalla *Vitis Vinifera*. ^(a)Tioli di origine varietale; ^(b)Tioli di origine non-varietale.^{8,14}

Tioli	Vini
4MMP ^(a)	Sauvignon Blanc, Scheurebe, Maccabeo, Gewürztraminer, Riesling, Muscat, Colombard, Petit Manseng e Tpkay (bianchi)
3MH ^(a) 3MHA ^(a)	Sauvignon Blanc, Riesling, Petite Arvine, Petit and Gros Manseng, Melon B. and Bacchus, Semillon, Verdejo e Koshu (bianchi) Grenache, Merlot e Cabernet Sauvignon (rossi)
4MMPOH ^(a)	Sauvignon Blanc, Petit and Gros Manseng, Gewürztraminer, Riesling (bianchi) Merlot e Cabernet Sauvignon (rossi)
FT ^(b)	Petit Manseng (bianchi) Vini Bordeaux a partire da Merlot, Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon (rossi) <i>Fermentati e/o invecchiati in botti di rovere</i>
BT ^(b)	Vini da Champagne <i>Fermentati e/o invecchiati in botti di rovere</i>

1.2.1. Biogenesi

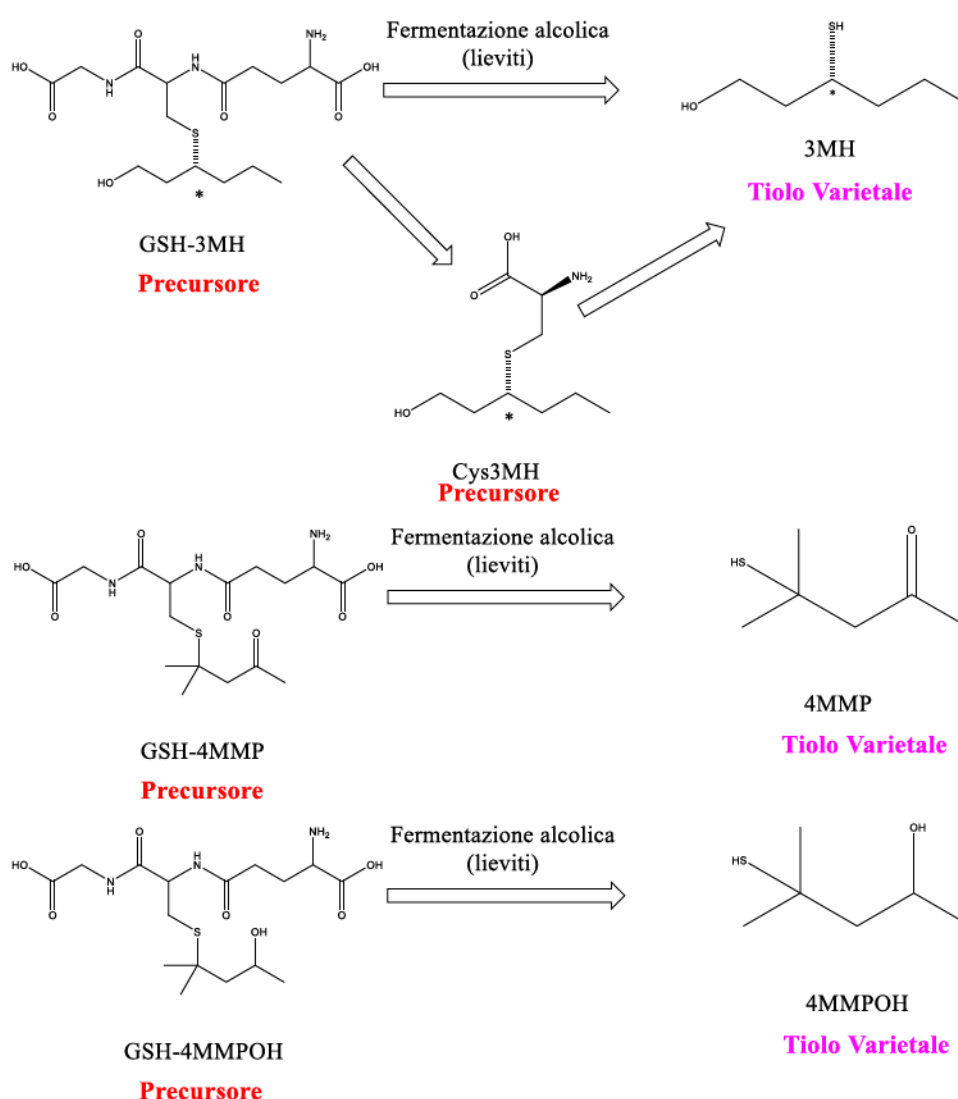
I tioli varietali 3MH, 3MHA, 4MMP e 4MMPOH, vengono rilasciati durante la fermentazione alcolica da precursori inodore presenti negli acini d'uva e nel mosto. Tre percorsi di biogenesi sono comunemente accettati per quanto riguarda il rilascio del 3MH, del 4MMP e del 4MMPOH.

Il primo percorso inizia da precursori cisteina-S-coniugati in cui il legame viene rotto durante la fermentazione alcolica a seguito dell'attività enzimatica della liasi carbonio-zolfo (β -liasi) presente nei lieviti, che scinde il legame tra carbonio e zolfo attraverso una β -eliminazione. Questi precursori S-cisteinilati sono presenti in grandi quantità nelle piante, ma il Cys3MH è stato dimostrato essere generalmente più abbondante e ubiquitario nell'uva rispetto al Cys4MMP e al Cys4MMPOH.¹⁵⁻¹⁷



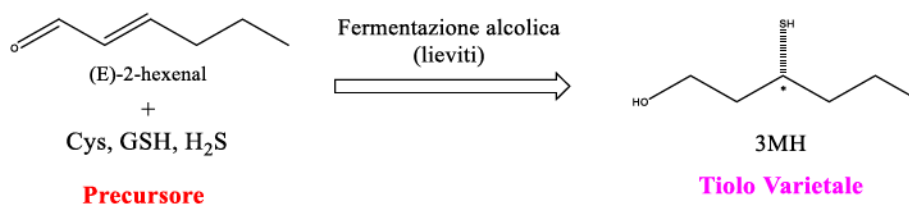
Un'altra via biogenetica è costituita da precursori in cui i tioli sono legati ad una molecola di glutatione. Il rilascio avviene a seguito della degradazione del GSH,

dopo che il GSH-coniugato è stato portato all'interno della cellula dal trasportatore del glutatione. Oltre a ciò, attraverso studi su colture cellulari della *Vitis Vinifera* e mediante l'attività della γ -glutamiltanspeptidasi, è apparso che il precursore GSH-3MH è anche un pro-precursore per il Cys3MH. Per quanto riguarda le diverse abbondanze nel vino dei precursori glutationati, invece, esse hanno lo stesso andamento dei cisteinil-S-coniugati, seppur questi ultimi siano presenti in maggior quantità.^{17,18} Tuttavia, negli ultimi anni, sono stati riconosciuti altri quattro precursori che possono essere intermedi nei processi sopra descritti, o dare origine a diverse reazioni che portano alla formazione del 3MH e del 4MMP.¹⁹

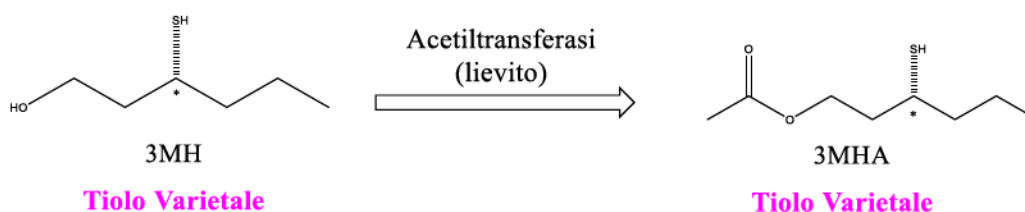


Infine, l'ultimo percorso biogenetico interessa unicamente il 3MH ed ha origine da composti C₆ insaturi, come (E)-2-esanale, che durante la fermentazione aggiungono un solfuro. Il donatore non è stato ancora identificato, ma ci sono diverse ipotesi a riguardo che potrebbero interessare molecole come la cisteina,

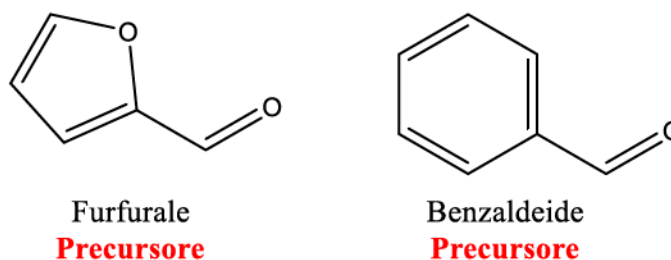
il glutatione, H₂S o altre molecole presenti nel mosto che abbiano una funzione sulfidrilica libera.⁸



Al contrario degli altri tre, la formazione del 3MHA è piuttosto particolare perché avviene durante la fermentazione a partire dal 3MH mediante l'attività enzimatica dell'acetiltransferasi del lievito. Si può quindi considerare come percorso di biogenesi quello del 3MH.



Per quanto riguarda i tioli non varietali, invece, il furfuriltiolo (FT) si genera a partire dal suo precursore, il furfurale, che viene rilasciato dal legno tostato quando entra in contatto con il vino, motivo per cui questo tiolo è presente unicamente nei vini fermentati e/o invecchiati in botti di rovere. La sua formazione, a seguito di diverse reazioni enzimatiche ad oggi ancora difficilmente determinabili, è fortemente collegata ai meccanismi di sintesi dei solfuri del lievito.²⁰ I meccanismi chimici e biologici per la biosintesi del benziltiolo (BT), diversamente, non sono ancora stati ben identificati, ma l'ipotesi è che la sua formazione avvenga a partire da un'aldeide, similmente alla biogenesi del furfuriltiolo, e che quindi il suo precursore sia la bezaldeide.²¹



D'altra parte, però, è importante specificare che in base al lievito scelto, e alla presenza di geni espressi in maggiore o minore quantità, che vanno a regolare l'attività enzimatica dello stesso, la quantità di tioli rilasciata durante la

fermentazione è variabile e diversa, in particolare per quanto concerne i tioli di origine varietale.¹⁵

1.3. Metodi di analisi

Negli ultimi trent'anni sono stati raggiunti molti progressi per quanto riguarda lo sviluppo di metodi analitici per l'identificazione *non target*, ossia la ricerca nella matrice di composti non conosciuti precedentemente, e la quantificazione *target*, rivolta ad analiti già conosciuti, per quanto riguarda i tioli volatili in matrici enologiche. L'analisi di queste molecole negli alimenti, siano essi cibi o bevande, è stata una sfida per due ragioni principali: la complessità della matrice, sia per la variabilità che per la composizione, e le loro proprietà chimico-fisiche, che possono causare problemi durante le fasi di estrazione e separazione cromatografica.

Un ideale metodo analitico per l'analisi dei tioli dovrebbe essere veloce, semplice, affidabile, robusto, green, cioè eliminare o diminuire l'utilizzo di reagenti e solventi pericolosi per l'ambiente e/o la salute umana, sensibile (essendo presenti a basse concentrazioni è importante che il LOD sia al di sotto dell'ODT) e conveniente dal punto di vista economico. Inoltre, nel caso di un metodo di quantificazione *target* tra i fattori più importanti ci sono il limite di quantificazione (LOQ), l'effetto matrice, la ripetibilità, la precisione e l'accuratezza. Essendo presenti in una matrice molto complessa, in cui sono presenti molti altri metaboliti volatili e non volatili che potrebbero interferire o creare problemi durante l'analisi, a concentrazioni molto basse, la fase di pretrattamento del campione è molto importante e complicata, sono stati, infatti, riportati in letteratura diverse procedure di estrazione e pre-concentrazione.

In generale, possiamo suddividere il metodo analitico in tre fasi: la preparazione del campione (in cui l'analita viene estratto dalla matrice e preconcentrato), la separazione cromatografica e la rivelazione.

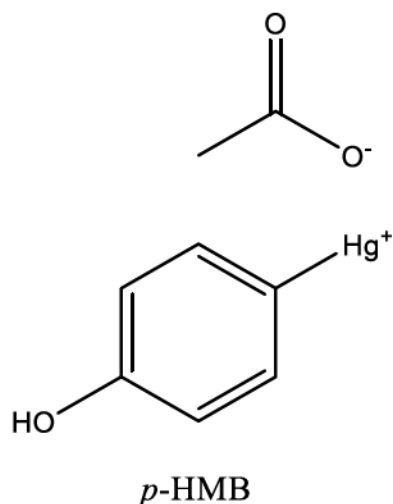
1.3.1. Estrazione

Ad oggi, in letteratura, sono riportati tre diversi approcci per quanto riguarda l'estrazione dei tioli a basso peso molecolare in matrice enologica:

- estrazioni non-specifiche, tecniche simili a quelle utilizzate comunemente per altri composti volatili, come ad esempio la microestrazione in fase solida per spazio di testa (HS-SPME), l'estrazione in fase solida (SPE), l'estrazione liquido-liquido (LLE), il purge and trap (P&T) e la distillazione in vuoto;
- estrazioni selettive con ioni metallici;
- derivatizzazioni accoppiate a estrazioni non-specifiche.

In virtù della capacità di queste molecole di legare covalentemente i metalli pesanti, questi sono stati spesso utilizzati per l'estrazione selettiva dei tioli LMW. In particolare, composti organomercuriali sono spesso stati protagonisti dei metodi estrattivi per i mercaptani. Infatti, il legame covalente tra il tiolo e il mercurio è stabile, si forma un mercaptide, e reversibile; perciò, il residuo tiolico d'interesse può essere sostituito con un eccesso di un altro tipo di tiolo LMW, ad esempio GSH, durante lo step di eluizione. Uno degli agenti che più è stato utilizzato è sicuramente il *p*-idrossifenilmercurio acetato (*p*-HMB), per via della sua selettività rispetto agli analiti e per i brevi tempi di reazione nel vino. Anche se i risultati erano abbastanza soddisfacenti per l'identificazione, i metodi che coinvolgevano questo agente avevano diversi svantaggi: il primo è sicuramente l'elevata tossicità dei composti organomercuriali, poi diversi problemi, come la regolazione del pH e i grandi volumi di campione trattati, portavano ad un'elevata dilatazione dei tempi della procedura.²²⁻²⁴

Un altro metodo è stato sviluppato sfruttando l'affinità del gruppo sulfidrilico per gli ioni Ag^+ e per questo sono state utilizzate delle cartucce SPE, disponibili commercialmente, funzionalizzate con argento. Confrontandolo con il metodo di Mateo-Vivaracho²⁵, basato sulla funzionalizzazione di cartucce SPE con *p*-HMB, il vantaggio dell'utilizzo di Ag è quello di evitare composti altamente tossici e di avere cartucce già disponibili in commercio. D'altra parte, anche in questo caso ci sono diversi svantaggi, tra cui lunghi tempi per la procedura e grandi volumi di campione utilizzati. Infine, in tutti i casi precedentemente presentati, alla fine del processo di estrazione, e pre-concentrazione, i tioli sono in forma libera e quindi esiste l'elevata possibilità di reazioni di vario genere, come isomerizzazioni, riarrangiamenti o ciclizzazioni, e ossidazioni ad opera, per esempio, di ioni metallici presenti nella matrice, che possono creare problemi nel momento della separazione cromatografica.²⁶

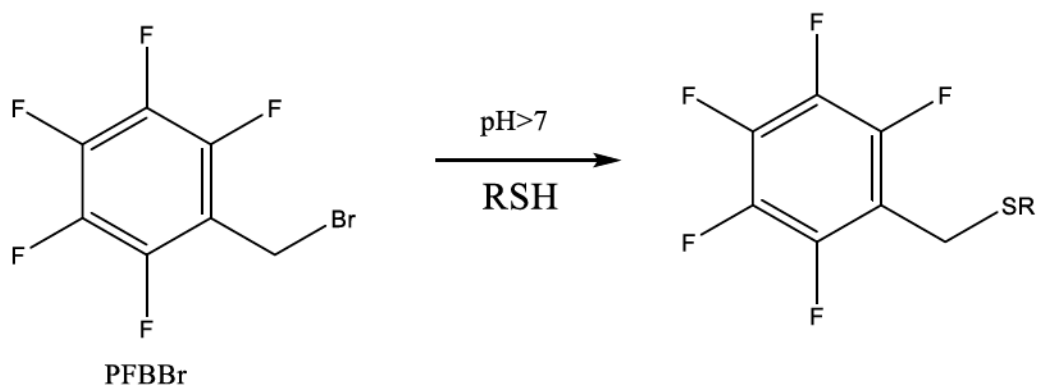


Ag^+

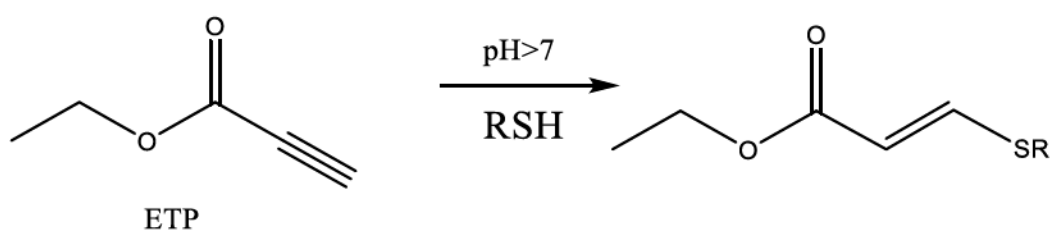
Cartucce SPE: Meta-Sep IC-Ag

A causa di ciò, metodi di derivatizzazione che fossero più selettivi, efficienti e che semplificassero le procedure di isolamento e stabilizzazione dei tioli sono stati ampiamente sviluppati. Questi approcci hanno il fine di aumentare la sensibilità strumentale poiché gli agenti derivatizzanti hanno lo scopo di rendere i tioli volatili più facilmente estraibili, compatibili con un'analisi cromatografica e rivelabili. Per selezionare un reagente derivatizzante che sia appropriato bisogna tenere conto di diversi fattori come: la specificità della reazione, la sua efficienza, la compatibilità con la matrice, eventuali trattamenti del campione e la presenza di possibili interferenti.

Un reagente derivatizzante che è stato usato frequentemente per i tioli LMW è il 2,3,4,5,6-pentafluorobenzil bromuro (PFFBr), che, grazie alla presenza del bromo, è particolarmente suscettibile a sostituzioni nucleofile da parte di ioni tiolati in presenza di base. L'addotto che si forma non solo stabilizza gli analiti per le procedure di estrazione, ma aumenta la sensibilità strumentale dello spettrometro di massa grazie alla capacità di catturare elettroni. La reazione avviene normalmente su un estratto purificato ed è stata valutata in diversi ambienti di reazione, a seguito della quale sono state svolte diverse procedure di estrazioni non specifiche, come HS-SPME e/o SPE.^{27,28} Tuttavia, l'utilizzo di questo reagente non è ottimale a causa dei rischi che questo comporta per la salute, per l'utilizzo di solventi cancerogeni in cui far avvenire la reazione (benzene) e a causa dei problemi riscontrati nella quantificazione. Il range di linearità per gli analiti studiati, infatti, non è molto ampio e solamente due dei tioli di interesse sono stati analizzati con questo metodo.^{27,29}

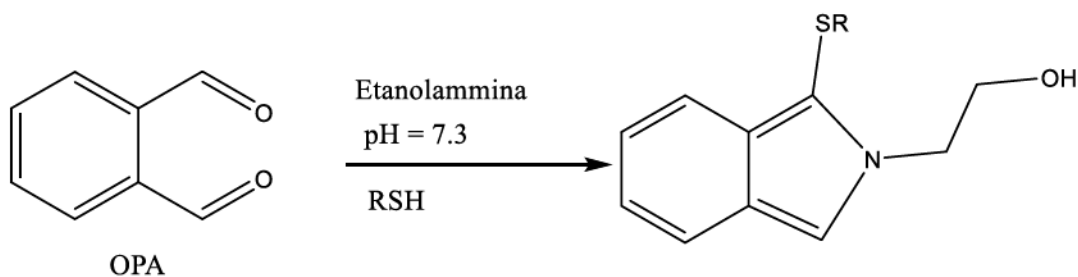


Il propiolato di etile (ETP) è un altro reagente derivatizzante utilizzato per gli analiti di interesse presenti in diverse matrici. Nel caso della matrice enologica, in cui la reazione avviene direttamente, i tempi sono piuttosto veloci, ma si riscontrano dei problemi riguardanti l'efficienza di reazione per quanto riguarda in particolare il 4MMP.³⁰

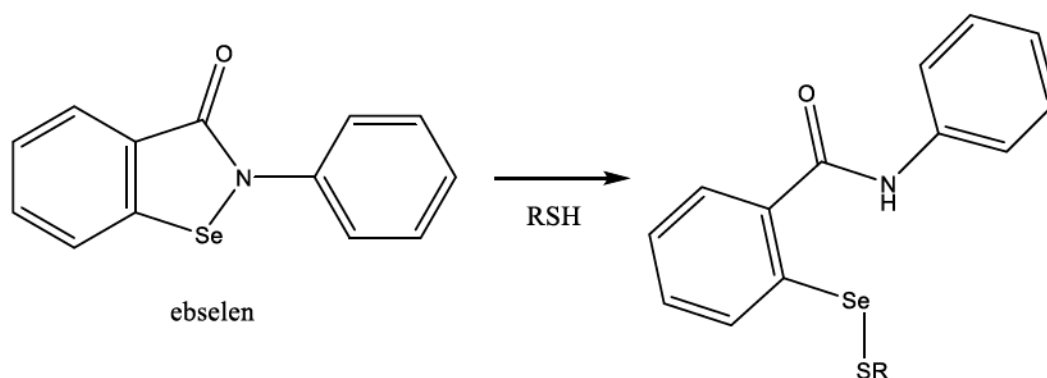


Se fino ad ora i metodi proposti per l'estrazione, siano essi con ioni metallici o successivi ad una derivatizzazione, sono compatibili per una gas cromatografia (GC), negli ultimi decenni sono stati sviluppati degli approcci compatibili con la cromatografia liquida, che in certi aspetti hanno semplificato la procedura di estrazione.

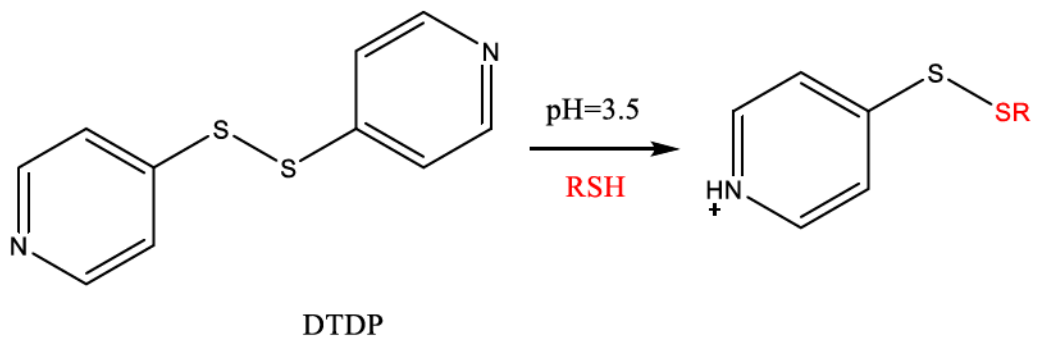
Inizialmente è stato identificato come reagente derivatizzante l'*o*-ftaldialdeide (OPA), ma questa è stata presto sostituita a causa di diversi svantaggi.^{10,12,31} Infatti, oltre alla scarsa reattività con uno degli analiti, il 4-MMP, la procedura di pre-trattamento del campione e di preparazione sono piuttosto complicate, e gli addotti che si formano risultano instabili, anche se conservati a temperature molto basse, e la loro rapida degradazione comporta, di fatto, una significativa perdita di sensibilità del segnale e conseguenti errori nella quantificazione.¹²



Di conseguenza, sono stati ricercati altri tipi di reagenti che potessero formare dei composti coniugati stabili con i tioli, che reagissero in condizioni blande con gli analiti e con procedure di preparazione più semplici e sicure. Per queste ragioni, il 2-fenil-1,1-benzisoselenazol-3(2H)-one (ebselen), già utilizzato per l'analisi di tioli LMW in matrici biologiche e lipidiche, è stato sperimentato per un protocollo di estrazione nel vino. Anche questo, però, presenta difficoltà durante la procedura, infatti, la reazione deve essere fatta avvenire in atmosfera inerte, tipicamente di azoto.³²



Infine, Capone ha valutato un metodo di derivatizzazione efficace e semplice, che non richiede particolari e difficoltosi passaggi di pretrattamento del campione. L'utilizzo della 4,4'-ditiodipiridina (DTDP), reagente sicuro per la salute umana e disponibile commercialmente, reagisce direttamente nella matrice al normale pH del vino, evitando così il passaggio di regolazione del pH che si doveva effettuare nei precedenti casi. Questi composti coniugati, inoltre, risultano piuttosto idrofobici e abbastanza stabili e quindi la procedura di estrazione tramite una SPE a fase inversa, cioè con la *fase stazionaria* apolare (vedi **Appendice**), risulta più semplice, con l'utilizzo di solventi meno dannosi alla salute, e anche più efficiente. Questo metodo ha portato a buoni risultati per quanto riguarda l'identificazione dei tioli varietali di interesse e per la loro quantificazione, tuttavia restano ancora problemi per quanto riguarda l'effetto matrice.³³



1.3.2. Separazione cromatografica

Per l'analisi qualitativa e quantitativa dei tioli volatili a basso peso molecolare è richiesta una strumentazione analitica appropriata.

Essendo composti volatili ed essendo presenti in concentrazioni molto basse, questi sono spesso stati separati in gas cromatografia (GC) come tali o in forma derivatizzata. Nel primo caso è stato messo appunto un metodo con iniezione in Purge and Trap³⁴, che ha delle buone prestazioni di estrazione e pre-concentrazione anche per volumi di campione relativamente piccoli; mentre per le derivatizzazioni sono stati utilizzati reagenti come il PFBBr e l'ETP accoppiati a HS-SPME, SPE oppure LLE. La stabilizzazione termica dei composti, a seguito della derivatizzazione, permette di variare diversi parametri cromatografici per quanto riguarda il metodo e la temperatura di iniezione, ma anche i volumi di campione trattati. È fondamentale al fine della separazione scegliere la colonna più adatta, in generale sono state utilizzate colonne capillari in silice fusa sia apolare che polari come fase stazionaria. I detectors accoppiati normalmente al GC sono differenti in base allo scopo dell'analisi, sia essa di identificazione o quantificazione. Comunemente per un'analisi qualitativa vengono associati dei rivelatori olfattometrici (O), a ionizzazione di fiamma (FID), a cattura elettronica (ECD), a chemiluminescenza di zolfo, ma anche spettrometri di massa, in particolare un quadrupolo accoppiato ad un tempo di volo (Q-TOF-MS), mentre nel caso delle quantificazioni vengono scelti dei detector come il triplo quadrupolo (QqQ).^{10,27,30,10,27,30}

Recentemente, per semplificare e velocizzare le procedure di analisi, sono state proposte delle alternative basate sull'utilizzo della cromatografia liquida (LC), già in uso per protocolli analitici riguardanti tioli non volatili presenti in matrici biologiche. L'analisi in LC avviene a seguito della stabilizzazione (derivatizzazione), isolamento e pre-concentrazione degli analiti, che non sono rivelabili come tali, a differenza della GC. Si usa comunemente una cromatografia a fase inversa (RP-LC) con colonne C18, per cui si ha la necessità di aumentare, non solo il peso molecolare degli analiti, ma anche le caratteristiche idrofobiche per renderli più compatibili con la strumentazione cromatografica. In questo caso, i parametri di cui tener conto sono diversi, infatti sono stati utilizzati diversi eluenti come *fasi mobili*, in dipendenza della colonna scelta, ma anche del tipo di reagente derivatizzante utilizzato. Sia per la quantificazione che per l'identificazione, la cromatografia liquida viene accoppiata allo spettrometro di massa, sia esso QqQ, Q-TOF o un Orbitrap, che oltre allo ione molecolare ci permettono di valutare le sue possibili frammentazioni. Generalmente, in quasi tutti i casi presentati, viene scelta una ionizzazione elettrospray (ESI), la quale ci permette la risoluzione dei problemi collegati all'interfaciare uno strumento

HPLC, che lavora ad alte pressioni, con uno spettrometro di massa, che, al contrario, lavora in alto vuoto. I metodi di rivelazione con gli analizzatori precedentemente nominati hanno delle prestazioni molto buone per quanto riguarda la selettività e la sensibilità per gli analiti in questione.^{10,12,32,33}

1.4. Scopo della tesi

La presenza nel vino di composti aromatici, in particolar modo per quanto riguarda i tioli varietali, in diverse concentrazioni conferisce ad esso peculiari caratteristiche che influenzano la scelta del consumatore. Essendo questi dipendenti dal tipo di uva utilizzata, ma anche dal tipo di lievito impiegato per la fermentazione che libera i tioli in diversa quantità, l'importanza dell'identificazione e della quantificazione di questi composti nella matrice enologica deriva dalla possibilità di associare ad ogni lievito un profilo aromatico differente e di conseguenza una diversa qualità del prodotto finale, per incontrare maggiormente i gusti del consumatore.

Il progetto di tesi ha lo scopo di sviluppare un metodo cromatografico in cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (HPLC-MS) per l'analisi dei tioli presenti in una matrice enologica. Il pretrattamento del campione consiste in una reazione di derivatizzazione, per aumentare la stabilità, il peso molecolare e l'idrofobicità degli analiti, al fine di renderli più compatibili con l'analisi cromatografica, in un'estrazione in fase solida e in una pre-concentrazione, poiché questi sono presenti in concentrazioni molto basse, anche parti-per-trilione, nella matrice. Per la derivatizzazione è stato scelto un agente derivatizzante già utilizzato in proteomica, come la iodoacetammide (IAA), in quanto meno pericoloso rispetto a quelli presentati in letteratura, disponibile commercialmente e dai costi contenuti.

A causa della complessità della matrice, prima il metodo verrà valutato su delle soluzioni modello di acqua milliQ e fase organica e poi su matrici complesse per verificare l'effetto matrice.

Lo scopo finale della tesi è quello di individuare e quantificare nel vino quattro tioli varietali, ossia il 3-mercapto-1-esanolo (3MH), il 3-mercaptoesil acetato (3MHA), il 4-mercapto-4-metil-2-pentanone (4MMP) e il 4-mercapto-4-metil-2-pentanololo (4MMPOH), e 2 tioli di origine non varietale, ovvero il furfuriltiolo (FT) e il benziltiolo (BT), arrivando a concentrazioni uguali o inferiori al ng/L.

2. Materiali e Metodi

2.1 Reagenti

I tioli presi in considerazione per questo progetto sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich con purezza $\geq 98\%$ e sono: 3-mercapto-1-esanolo (3MH), il 3-mercaptoesil acetato (3MHA), il 4-mercapto-4-metil-2-pentanone (4MMP), il 4-mercapto-4-metil-2-pentanololo (4MMPOH), il furfuriltiolo (FT), il benziltiolo (BT), il 3-mercapto-3-metilbutil formiato (MMBF) e il 6-mercapto-1-esanolo (6MH) (vedi **Figura 3**). Questi ultimi due, il 6MH e l'MMBF, sono stati scelti come Standard Interni perché con proprietà molto simili agli analiti di interesse, soprattutto per quanto riguarda il 6MH, ma che non sono normalmente presenti nella matrice enologica.

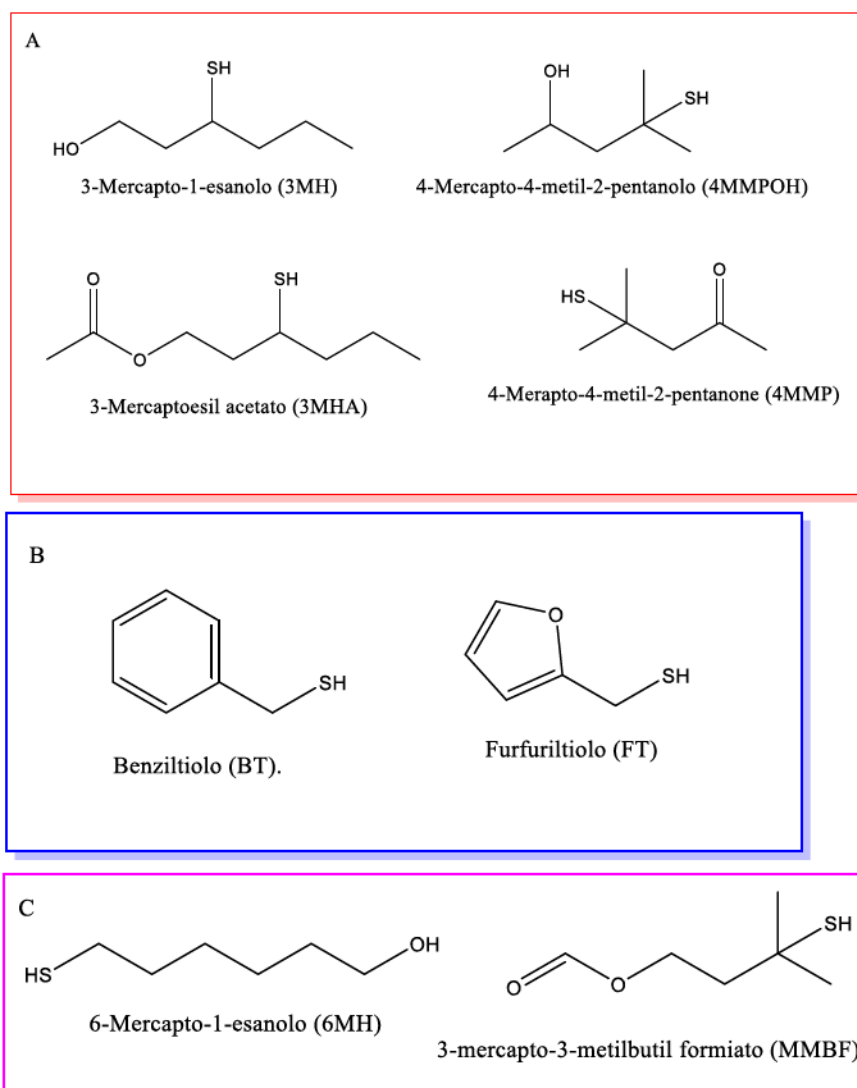
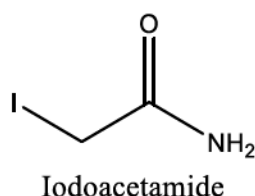


Figura 3. Standard analitici: (A) tioli varietali, (B) tioli non-varietali, (C) Standard interno.

Il reagente derivatizzante utilizzato è la Iodoacetammide, anch'esso acquistato da Sigma-Aldrich con purezza $\geq 98\%$.



Per la reazione è stato impiegato come solvente etanolo (Carlo Erba, 99%) e per modificare il pH della soluzione sono stati utilizzati acido acetico (Sigma Aldrich, 99%), ammonio idrossido (Sigma-Aldrich, 28%-30%), idrossido di sodio (Sigma Aldrich) e ammonio bicarbonato (Carlo Erba); per il quenching acido formico (Sigma Aldrich, 99%). Per l'estrazione in fase solida sono stati utilizzati H₂O milliQ e metanolo (Carlo Erba, 99%). Per la cromatografia, invece, sono stati utilizzati acetonitrile (Carlo Erba, 99%), H₂O milliQ, ammonio fluoruro (Sigma Aldrich, 99%) e ammonio acetato (Merck, 99%).

In **Tabella 3.** sono riportati per ogni standard, siano essi tioli o reagente derivatizzante, alcune caratteristiche chimico fisiche.

Tabella 3. Caratteristiche chimico-fisiche degli standard analitici e dei reagenti acquistati da Sigma-Aldrich e utilizzati nel progetto.

Nome	Sigla	Soglia Percezione in vino (ng/L)	CAS	Purezza	MM [g/mol]	d [g/mL]	T eb [°C]
3-Mercapto-1-esanolo	3MH	60 in miscela racemica	51755-83-0	$\geq 98\%$	134,24	0,98	61° - 62°
3-Mercaptoesil acetato	3MHA	4,2 in miscela racemica	136954-20-6		176,28	0,994	-
4-Mercapto-4-metil-2-pentanone	4MMP	0,8	19872-52-7		132,22	-	-
4-Mercapto-4-metil-2-pentanololo	4MMPOH	55	255391-65-2		134,24	-	-
Furfuriltiolo	FT	0,4	98-02-2		114,17	-	-
Benziltiolo	BT	0,3	100-53-8		124,2	-	194° - 195° - lit
6-Mercapto-1-esanolo	6MH	-	1633-78-9		134,24	0,981	225° - lit
3-mercapto-3-metilbutil formiato	MMBF	-	50746-10-6		148,23	-	-
Iodoacetamide	IAA	-	144-48-9		184,96	-	-

In **Tabella 4.** sono riportati, invece, i solventi e restanti reagenti utilizzati per le soluzioni.

Per il vino modello è stato utilizzato il Vino Bianco Tavernello.

Tabella 4. Solventi^(a) e reagenti^(b) utilizzati nel progetto.

Nome	Formula	Sigla	Purezza	Produttore
Etanolo ^(a)	CH ₃ CH ₂ OH	EtOH	99%	Carlo Erba
Metanolo ^(a)	CH ₃ OH	MeOH	99%	Carlo Erba
Acido Formico ^(b)	HCOOH	FA	98%	Sigma Aldrich
Ammonio Idrossido ^(b)	NH ₄ OH	-	28% - 30%	Sigma Aldrich
Acetonitrile ^(a)	CH ₃ CN	ACN	99%	Carlo Erba
Acido Acetico ^(b)	CH ₃ COOH	-	99%	Sigma Aldrich
Ammonio Fluoruro ^(b)	NH ₄ F	-	99%	Sigma Aldrich
Ammonio Acetato ^(b)	CH ₃ COONH ₄	NH ₄ Ac	99%	Merck
Idrossido di Sodio ^(b)	NaOH	-	-	Sigma Aldrich
Ammonio Bicarbonato ^(b)	NH ₄ HCO ₃	-	-	Carlo Erba

2.2 Descrizione degli esperimenti

2.2.1. Reazione di derivatizzazione

Per l'ottimizzazione della reazione di derivatizzazione sono state analizzate soluzioni a diverse concentrazioni di standard analitici e di agente derivatizzante e con diverse composizioni di fase organica (etanolo e metanolo in diverse percentuali). Sono stati valutati i parametri migliori per la reazione, come la concentrazione di agente derivatizzante, il pH, la temperatura e il tempo di reazione. Per la procedura finale utilizzata, ad una soluzione di 100 mL EtOH 10% sono stati aggiunti gli analiti da analizzare, la iodoacetammide (500 mg/L) e il reagente modificante del pH (ammonio bicarbonato, 50 mM). La reazione è stata scaldata a 30 °C in forno e dopo 3 ore è stato effettuato il quenching con acido formico, 50 mM. Sono state fatte anche prove di derivatizzazione in soluzione di vino modello (Tavernello Bianco) trattato, in precedenza, con ammonio bicarbonato 150 mM, EDTA e filtrato su un filtro a fascia nera (Munktell Filter Discs Grade 388, d = 110 mm, 84 g/m²), a cui sono stati aggiunti i tioli standard e la iodoacetammide. I tempi e le temperature di reazione sono stati mantenuti uguali a quelle delle soluzioni standard e il successivo quenching è stato effettuato con acido formico, 150 mM.

2.2.2. Estrazione in fase solida (SPE)

Per l'estrazione in fase solida sono state valutate le performance di due tipologie di cartucce: C18 e a base polimerica (HyperSep® C18 6cc 500mg ThermoScientific, Sep-Pak® Vac 6cc C18- 500mg Waters e Oasis® HLB 6cc, 200 mg Waters). L'attivazione è stata effettuata con 6 mL di metanolo e il condizionamento con 6 mL di H₂O milliQ. Dopo aver fatto passare il campione in cartuccia, questa è stata lavata con 6 mL di H₂O milliQ. L'eluizione è stata fatta con 12 mL di metanolo e l'eluato è stato fatto evaporare a 32 °C mediante l'ausilio di un flusso di N₂, fino ad un residuo di 50 µL. Infine, questo è stato ricostituito con 150 µL di MeOH.

2.2.3. Analisi HPLC-Q-ToF

Lo strumento cromatografico utilizzato è un HPLC 1260 Infinity II Agilent, mentre lo spettrometro di massa è un Agilent 6545 LC/Q-TOF con ionizzazione elettrospray.

È stata ottimizzata la procedura cromatografica utilizzando la colonna XBridge® BEH C18 2.5µm, 2.1x150mm Column XP¹². Sono stati valutati diversi tipi di eluenti (*fasi mobili*) ed, infine, sono stati scelti come eluente polare H₂O milliQ

con 1 mM di ammonio fluoruro e come eluente apolare, invece, acetonitrile. La corsa cromatografica di 30 minuti è stata svolta secondo gradiente di concentrazione (**Tabella 5.**).

Tabella 5. Gradiente di concentrazione per la *fase mobile*.

Tempo	A (%)	B (%)	Flusso (mL/min)	Limite massimo di pressione (bar)
0.00	100.0	0.00	0.200	600.00
2.00	100.0	0.00	0.200	600.00
17.00	0.00	100.0	0.200	600.00
22.00	0.00	100.0	0.200	600.00
23.00	100.0	0.00	0.200	600.00
30.00	100.0	0.00	0.200	600.00

I parametri strumentali dello spettrometro di massa sono riportati in **Tabella 6.**

Tabella 6. Parametri strumentali di acquisizione degli spettri di massa dello strumento Agilent 6545 LC/Q-TOF.

Parametro	Valore
Ionization Mode	Positive
Gas Temperature	250°C
Nebulizer	35 psi
Drying Gas	12 l/min
Sheat Gas Temperature	225°C
Sheat Gas Flow	12 l/min
Acquisition mode: Full Scan	
Scan Range	60-750 m/z

3. Risultati e Discussione

Tenuto conto di quelli che sono i metodi di analisi presenti in letteratura, in questo progetto di tesi è stato scelto come reagente derivatizzante la iodoacetamide, già comunemente utilizzato in proteomica per la derivatizzazione di tioli a basso peso molecolare come cisteine e GSH.³⁵⁻³⁷ I vantaggi di questo reagente, oltre ad essere più economico e sicuro da utilizzare rispetto a quelli già in uso per le matrici enologiche, sono la selettività rispetto al gruppo sulfidrilico, la possibilità di far avvenire le reazioni in condizioni blande, di aumentare il peso molecolare degli analiti e di aumentarne, anche se di poco, l'idrofobicità, per permetterne la cromatografia a fase inversa e aumentare la risposta mass-spettrometrica con ionizzazione ESI (vedi **Appendice**).

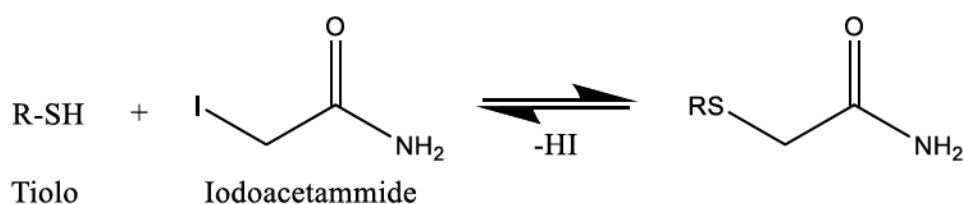
3.1. Ottimizzazione dei parametri cromatografici e di spettrometria di massa

I composti di interesse non sono rivelabili come tali in HPLC-MS, per questo motivo è necessario un pretrattamento in cui vengono derivatizzati.

Il reagente derivatizzante scelto è la iodoacetammide (IAA), già utilizzato in proteomica per la derivatizzazione di tioli LMW di ambito clinico-biologico. Questa è selettiva per il gruppo funzionale sulfidrilico, non è un reagente pericoloso da utilizzare ed è piuttosto economica. La reazione è stata condotta in condizioni simili a quelle utilizzate per le analisi proteomiche. Ad 1 mL di soluzione di EtOH 50% o MeOH 50%, in presenza del derivatizzante (IAA) in concentrazione 50 mg/L e 2 μ L di NH₄OH (30%), per rendere il pH basico, sono stati aggiunti, singolarmente o insieme, i 4 tioli varietali di interesse (3MH, 3MHA, 4MMP e 4MMPOH) e gli Standard Interni (6MH e MMBF) in concentrazione 100 μ g/L. La reazione è stata tenuta in agitazione per 30 minuti, al termine dei quali si è effettuato il quenching con 2 μ L di Acido Formico (FA) puro. I due Standard Interni sono stati scelti perché sono tioli a basso peso molecolare, con simili caratteristiche ai tioli varietali di interesse, in particolare il 6MH (un isomero strutturale del 3MH), ma che non sono presenti nella matrice enologica. La presenza dello Standard Interno, aggiunto in concentrazione nota, ci permette in questo modo di valutare le perdite degli analiti durante il trattamento del campione e di minimizzare l'effetto matrice, di conseguenza i rapporti di segnale tra gli analiti e l'SI ci permettono di costruire una retta di calibrazione migliore, in quanto ci permette di tener conto di variazioni durante l'analisi strumentale e la risposta dell'analita è direttamente collegata a quello dello standard.

❖ FIA (Flow Injection Analysis)

Inizialmente sono state svolte delle analisi in Flow Injection Analysis (FIA) per valutare la risposta mass-spettrometrica, la ionizzazione ESI è stata impostata in positivo e le analisi sono state effettuate in modalità full scan. I parametri dello spettrometro, riportati in **Tabella 6.**, sono stati scelti similmente a quelli utilizzati per analisi di tioli a basso peso molecolare derivatizzati con IAA in analisi proteomiche. La modalità in FIA è un'analisi per iniezione di flusso, nella quale il campione viene direttamente iniettato nello spettrometro di massa, senza passare attraverso una colonna cromatografica, tramite un flusso continuo di eluente.



In **Tabella 7.** sono riportati i segnali m/z teorici che mi aspetto di ottenere nel caso in cui gli addotti formati acquisiscano un protone oppure uno ione sodio.

Tabella 7. Segnali m/z teorici per i tioli LMW di interesse.

Analita	Ione - ESI positivo	m/z
4MMPOH	$[(\text{M}-\text{H})\text{CH}_2\text{CONH}_2+\text{H}]^+$	192,1053
	$[(\text{M}-\text{H})\text{CH}_2\text{CONH}_2+\text{Na}]^+$	214,0872
6MH	$[(\text{M}-\text{H})\text{CH}_2\text{CONH}_2+\text{H}]^+$	192,1053
	$[(\text{M}-\text{H})\text{CH}_2\text{CONH}_2+\text{Na}]^+$	214,0872
3MH	$[(\text{M}-\text{H})\text{CH}_2\text{CONH}_2+\text{H}]^+$	192,1053
	$[(\text{M}-\text{H})\text{CH}_2\text{CONH}_2+\text{Na}]^+$	214,0872
3MHA	$[(\text{M}-\text{H})\text{CH}_2\text{CONH}_2+\text{H}]^+$	234,1158
	$[(\text{M}-\text{H})\text{CH}_2\text{CONH}_2+\text{Na}]^+$	256,0978
4MMP	$[(\text{M}-\text{H})\text{CH}_2\text{CONH}_2+\text{H}]^+$	190,0896
	$[(\text{M}-\text{H})\text{CH}_2\text{CONH}_2+\text{Na}]^+$	212,0716
MMBF	$[(\text{M}-\text{CO}-\text{H})\text{CH}_2\text{CONH}_2+\text{H}]^+$	178,0896
	$[(\text{M}-\text{H})\text{CH}_2\text{CONH}_2+\text{Na}]^+$	200,0716
IAA	$[\text{CH}_2\text{CONH}_2+\text{H}]^+$	185,941

Dai cromatogrammi in corrente ionica estratta dei sei composti si nota che il segnale relativo ad uno degli Standard Interni, l'MMBF, è inferiore di circa 100 o 1000 volte rispetto al segnale degli altri composti (circa 10^4 rispetto a 10^6 o 10^7). In **Figura 4.** e **Figura 5.** sono riportati gli spettri di massa dei singoli composti analizzati in FIA nei quali sono presenti i picchi relativi agli ioni protonati degli analiti e agli ioni sodiati, con intensità paragonabili. Per quanto riguarda gli Standard Interni, inoltre, si può notare la presenza del picco protonato relativo alla iodoacetammide in eccesso non reagita. È importante notare che lo Standard Interno MMBF ionizza in modo differente rispetto agli altri. Infatti, se gli altri analiti si limitano ad una ionizzazione positiva acquisendo un protone o un atomo di sodio, oltre a ciò, l'MMBF frammenta, perdendo un gruppo $-CO$, e non è infatti possibile ottenere un segnale in corrente ionica estratta con il rapporto m/z relativo al picco quasi-molecolare, e, in aggiunta, i segnali di questo addotto protonato e di quello sodiato hanno un'intensità molto più bassa rispetto all'altro SI.

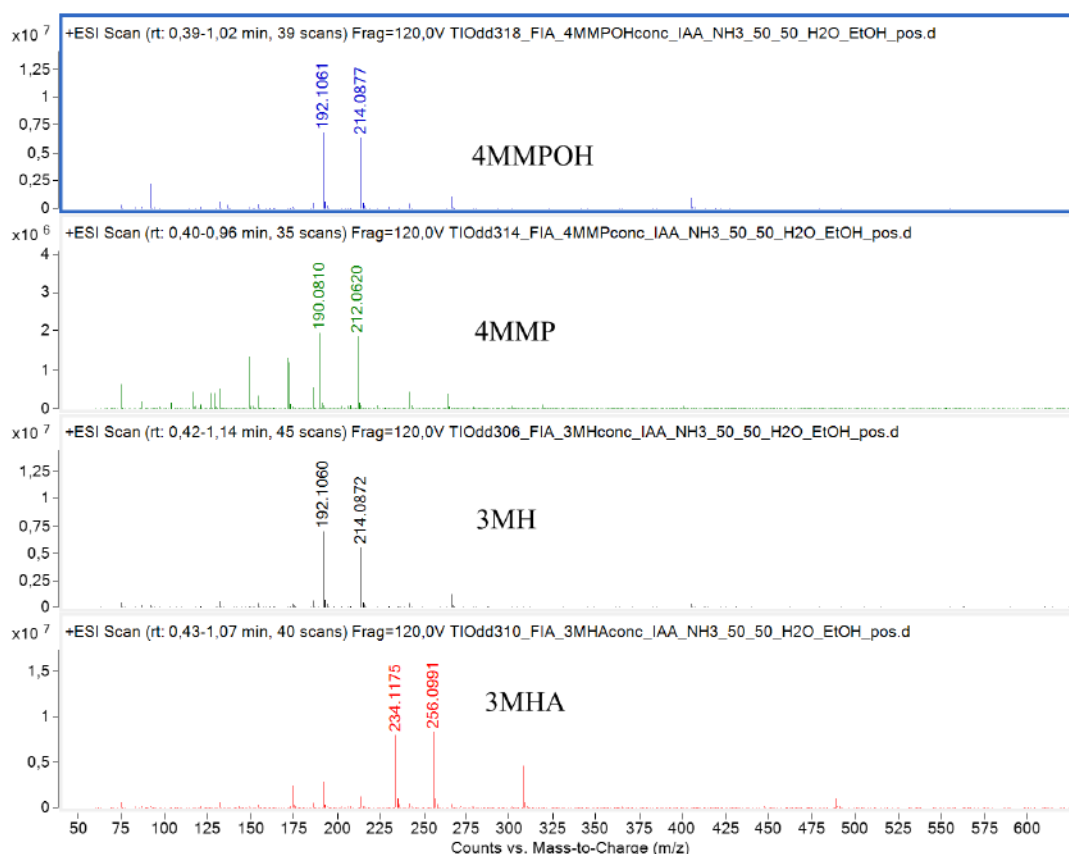


Figura 4. Spettri di massa relativi rispettivamente ai composti 4MMPOH, 4MMP, 3MH e 3MHA.

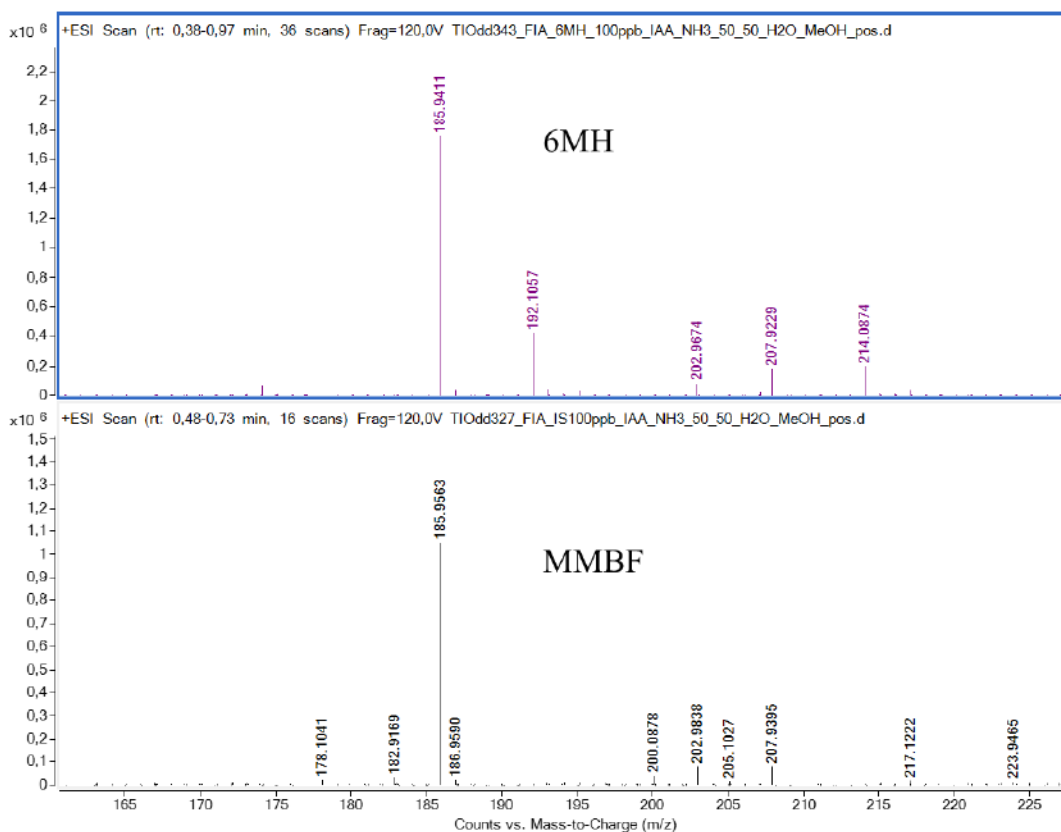


Figura 5. Spettri di massa relativi rispettivamente ai composti 6MH e MMBF.

❖ Cromatografia

In seguito, è stata valutata la risposta cromatografica utilizzando le soluzioni standard preparate con lo stesso metodo utilizzato per le analisi in FIA. Inizialmente, sono state effettuate le corse cromatografiche in HPLC utilizzando un metodo già presente in letteratura per analisi proteomiche di tioli LMW derivatizzati con IAA: una colonna BEH C18 e come eluenti H₂O milliQ con NH₄Ac 1 mM e MeOH. Come si può notare dalla **Figura 6.** i picchi relativi ai composti isobari di m/z teorico pari a 192,1053 sono ben separati, e le intensità degli analiti sono abbastanza alte, anche se l'MMBF risulta ancora quello con minore intensità. Un problema che si è evidenziato dall'analisi cromatografica e dalla rivelazione in spettrometria di massa, come si vede nelle **Figure 7., 8. e 9.,** è la presenza, non solo dei picchi cromatografici relativi all'addotto protonato, ma anche quella dei picchi sodiati (m/z picco quasi-molecolare + 22) con intensità comparabili. Questo è un problema in quanto l'addotto sodiato è meno stabile e le frammentazioni sono meno riproducibili, rispetto al protonato, inoltre, la presenza di questi comporta una diminuzione del segnale degli analiti, che già, per le loro caratteristiche chimico-fisiche, non hanno una elevata risposta per quanto riguarda l'analisi in HPLC-MS. Come conseguenza, questo porterebbe ad avere maggiori difficoltà nella quantificazione dei tioli di interesse.

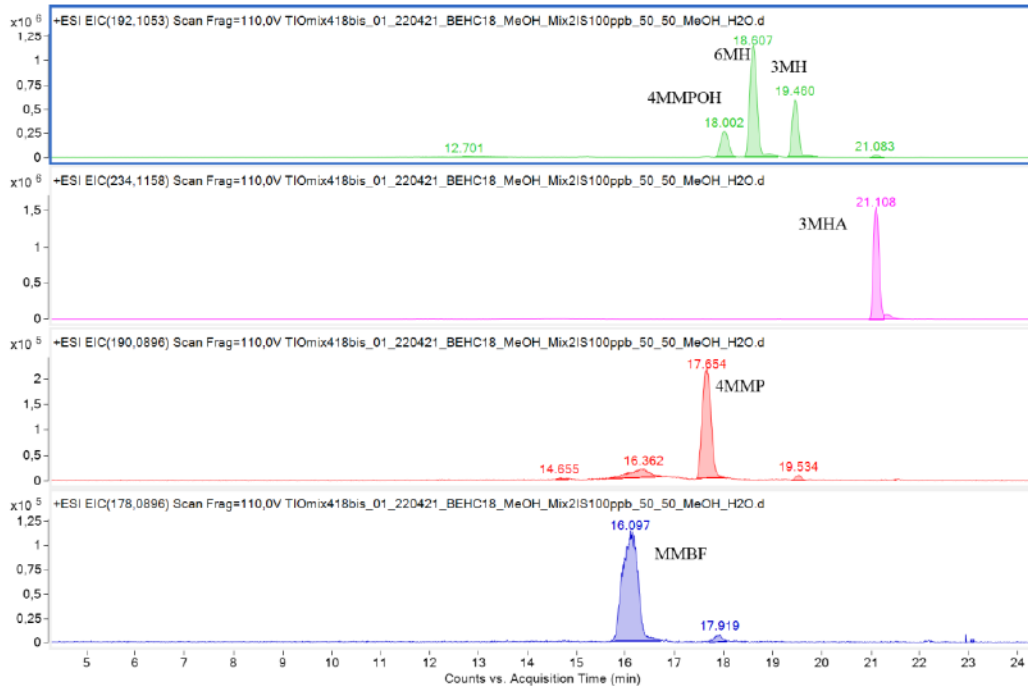


Figura 6. Cromatogrammi in corrente ionica estratta (EIC) degli addotti protonati relativi ai 4 tioli varietali (3MH, 3MHA, 4MMP e 4MMPOH) e ai 2 Standard Interni (6MH e MMBF) ottenuti dalle analisi HPLC-MS dei composti in concentrazione 100 $\mu\text{g/L}$, con eluenti H_2O milliQ + NH_4Ac 1mM e MeOH.

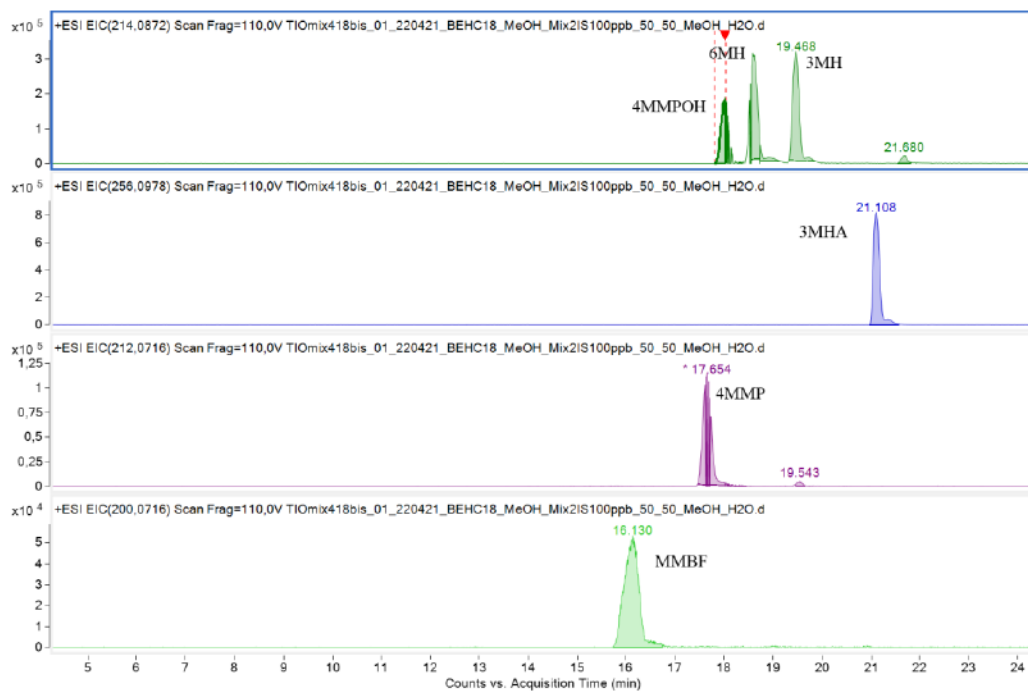


Figura 7. Cromatogrammi in corrente ionica estratta (EIC) degli addotti sodiati relativi ai 4 tioli varietali (3MH, 3MHA, 4MMP e 4MMPOH) e ai 2 Standard Interni (6MH e MMBF) ottenuti dalle analisi HPLC-MS dei composti in concentrazione 100 $\mu\text{g/L}$, con eluenti H_2O milliQ + NH_4Ac 1mM e MeOH.

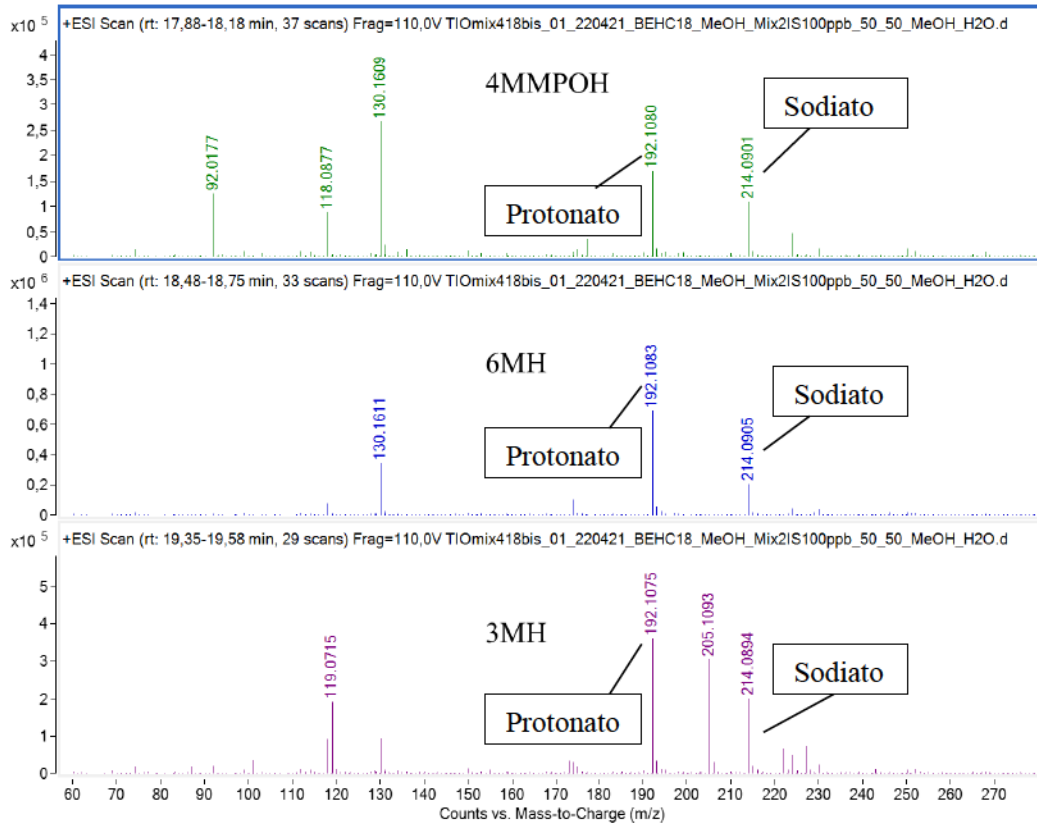


Figura 8. Spettro di massa relativo ai tioli 4MMPOH, 6MH e 3MH.

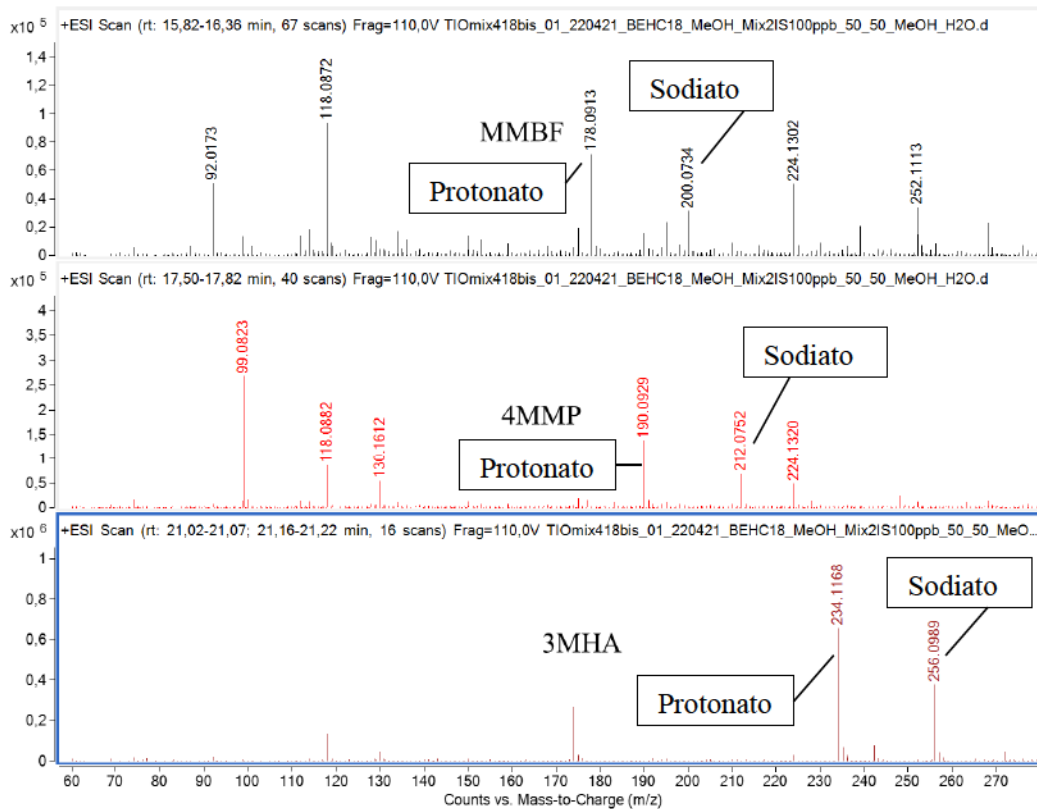


Figura 9. Spettro di massa relativo ai tioli MMBF, 4MMP e 3MHA.

A questo punto, per cercare di migliorare la risoluzione dei picchi, ed aumentarne

l'intensità, si è cambiato l'eluente organico MeOH con ACN, che possiede un potere eluotropico maggiore. Si può, infatti, vedere dai cromatogrammi in **Figura 10.** e **Figura 11.**, un leggero aumento nell'intensità del segnale dei picchi, i quali sono più stretti ed hanno una forma migliore. I picchi degli analiti con uguale massa teorica, il 4MMPOH, il 6MH e il 3MH, sono ben separati e, infine, si può notare anche una diminuzione generale nei tempi di ritenzione degli analiti. Tuttavia, cambiando la parte organica della fase mobile, è possibile evidenziare come per alcuni analiti persista la presenza degli addotti sodiati anche se c'è stata una diminuzione dell'intensità del segnale (vedi **Figura 12.** e **Figura 13.**)

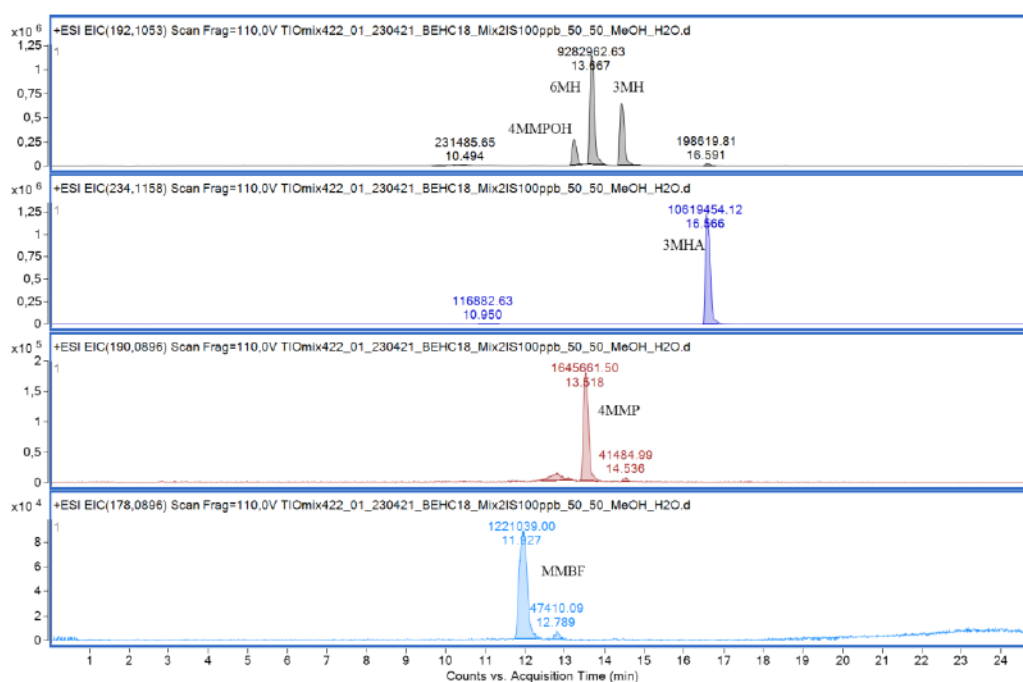


Figura 10. Cromatogrammi in corrente ionica estratta (EIC) degli addotti protonati relativi ai 4 tioli varietali (3MH, 3MHA, 4MMP e 4MMPOH) e ai 2 Standard Interni (6MH e MMBF) ottenuti dalle analisi HPLC-MS dei composti in concentrazione 100 $\mu\text{g/L}$, con eluenti H_2O milliQ + NH_4Ac 1mM e ACN.

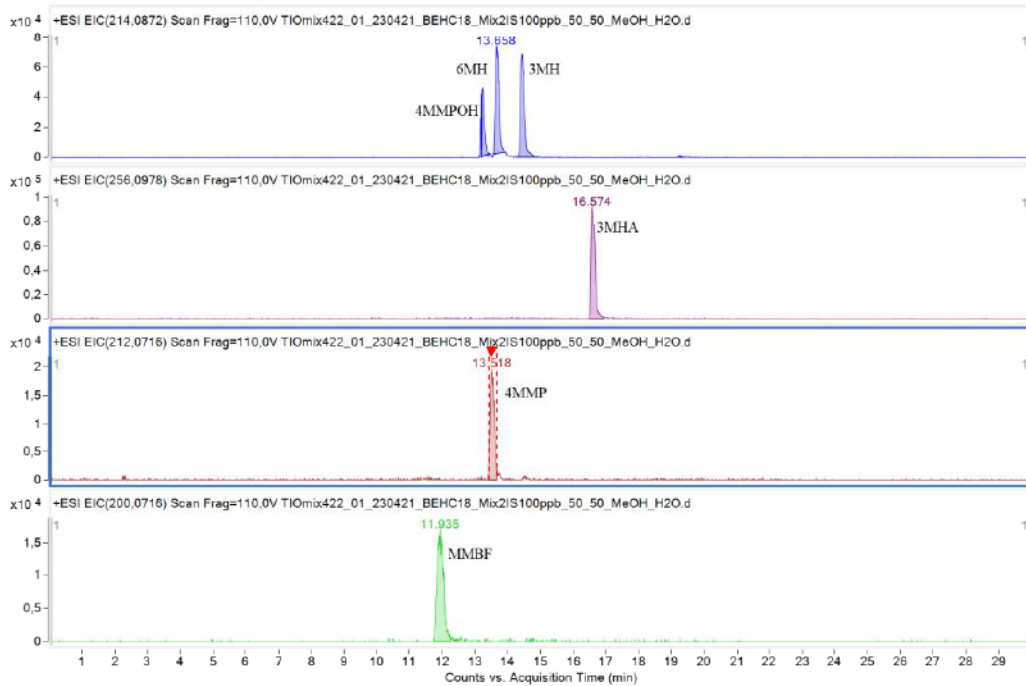


Figura 11. Cromatogrammi in corrente ionica estratta (EIC) degli addotti sodiati relativi ai 4 tioli varietali (3MH, 3MHA, 4MMP e 4MMPOH) e ai 2 Standard Interni (6MH e MMBF) ottenuti dalle analisi HPLC-MS dei composti in concentrazione 100 $\mu\text{g/L}$, con eluenti H_2O milliQ + NH_4Ac 1mM e ACN.

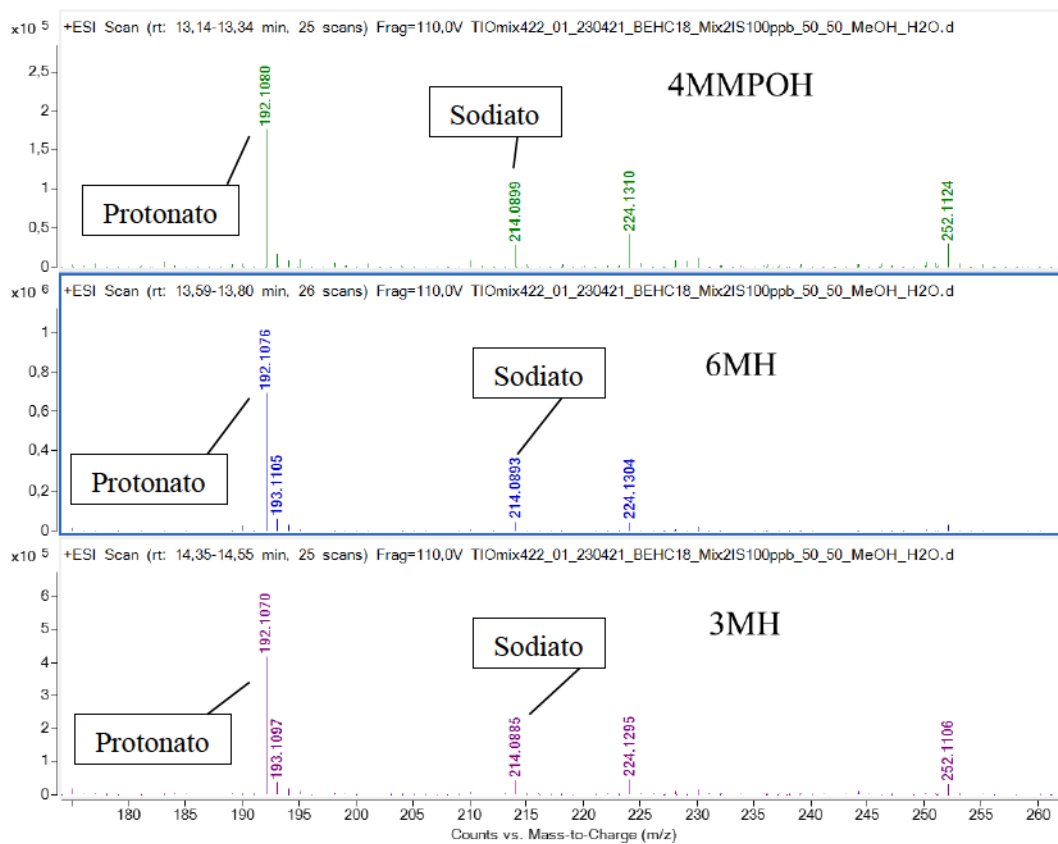


Figura 12. Spettro di massa relativo ai tioli 4MMPOH, 6MH e 3MH.

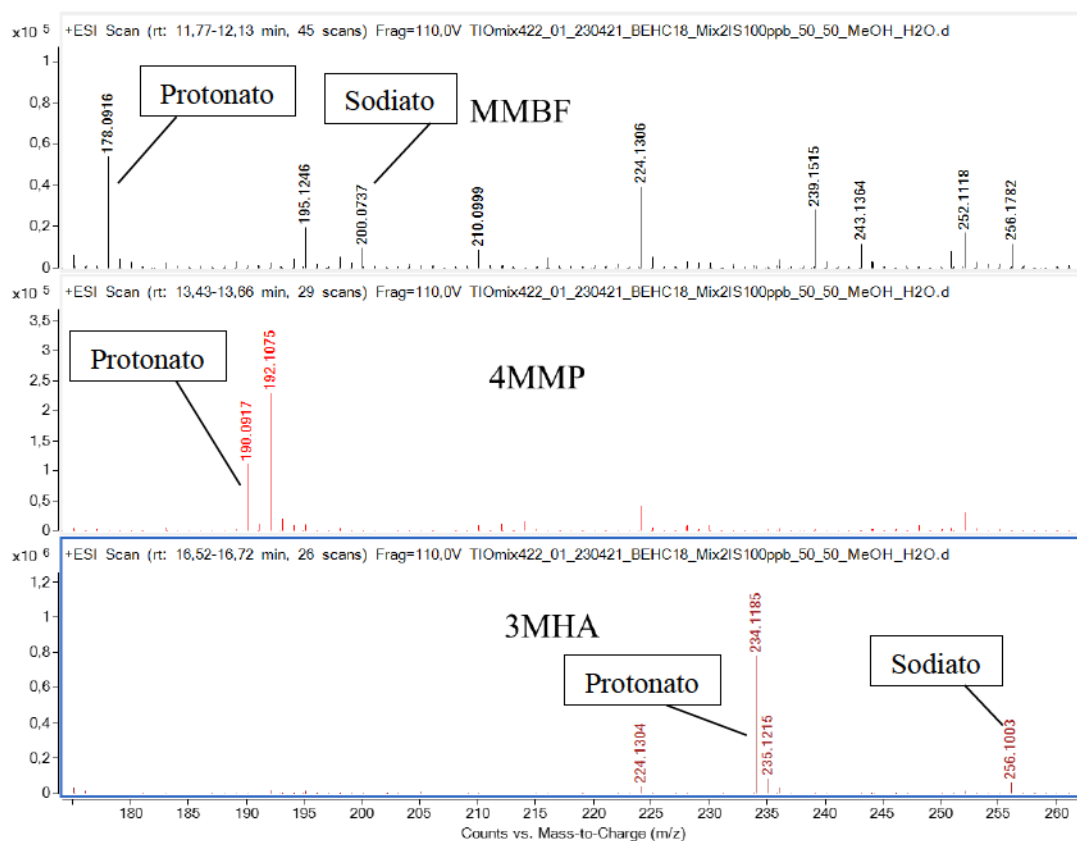


Figura 13. Spettro di massa relativo ai tioli MMBF, 4MMP e 3MHA.

A questo punto, per spostare l'equilibrio degli addotti sodiati verso la forma protonata, ed aumentare quindi l'intensità del segnale del picco protonato dell'analita, è stato cambiato l'additivo dell'eluente polare, provando ad aggiungere all' H₂O milliQ, sia utilizzando come fase apolare MeOH che ACN, una concentrazione 1 mM di fluoruro d'ammonio. Questo, infatti, negli ultimi anni è stato ampiamente studiato come additivo per gli eluenti di cromatografie a fase inversa, in quanto ha la capacità di aumentare il segnale in spettrometria di massa sia per una ionizzazione ESI in negativo, sia in positivo. Se nel caso della ionizzazione in negativo, questa capacità si attribuisce alla forte basicità dello ione fluoruro in fase gas, che permette di sottrarre protoni da analiti neutri, per quanto riguarda quella in positivo non è ancora stato chiarito i meccanismi responsabili dell'aumento del segnale.³⁸⁻⁴⁰ Dai grafici in **Figura 14.** è evidente come la presenza dell'ammonio fluoruro diminuisca la formazione dell'addotto sodiato significativamente, i segnali, infatti, sono almeno cento volte inferiori rispetto a quello protonato. In aggiunta, si possono escludere la presenza di eventuali addotti dati dallo ione ammoniato, in quanto non sono stati rivelati nello spettro di massa e in corrente ionica estratta.

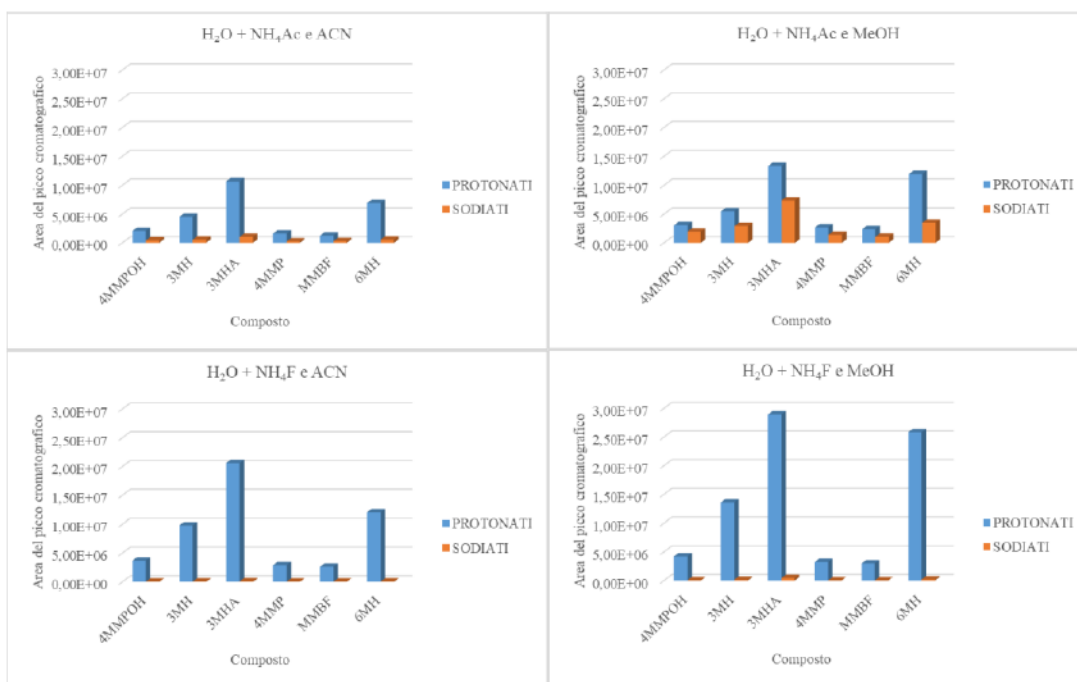


Figura 14. Grafici relativi ai segnali in corrente ionica estratta (EIC) degli addotti protonati e sodiati relativi ai 4 tioli varietali (3MH, 3MHA, 4MMP e 4MMPOH) e ai 2 Standard Interni (6MH e MMBF) ottenuti dalle analisi HPLC-MS dei composti in concentrazione 100 µg/L, con le diverse fasi mobili studiate.

Perciò, tenuto conto di quelli che sono stati i risultati ottenuti nelle diverse analisi cromatografiche, anche se le analisi effettuate utilizzando MeOH come eluente portano a dei segnali più intensi, la fase mobile scelta per le analisi consiste in H₂O milliQ + NH₄F 1 mM per l'eluente polare e in ACN per l'eluente apolare, in quanto questa ci permette di avere dei picchi con una migliore risoluzione.

Inoltre, per l'attribuzione dei segnali cromatografici, in particolare per quanto riguarda i tre composti isobari (4MMPOH, 6MH e 3MH), sono state effettuate delle corse per ogni singolo standard analitico nelle migliori condizioni trovate precedentemente e i cromatogrammi sono riportati in **Figura 15.**

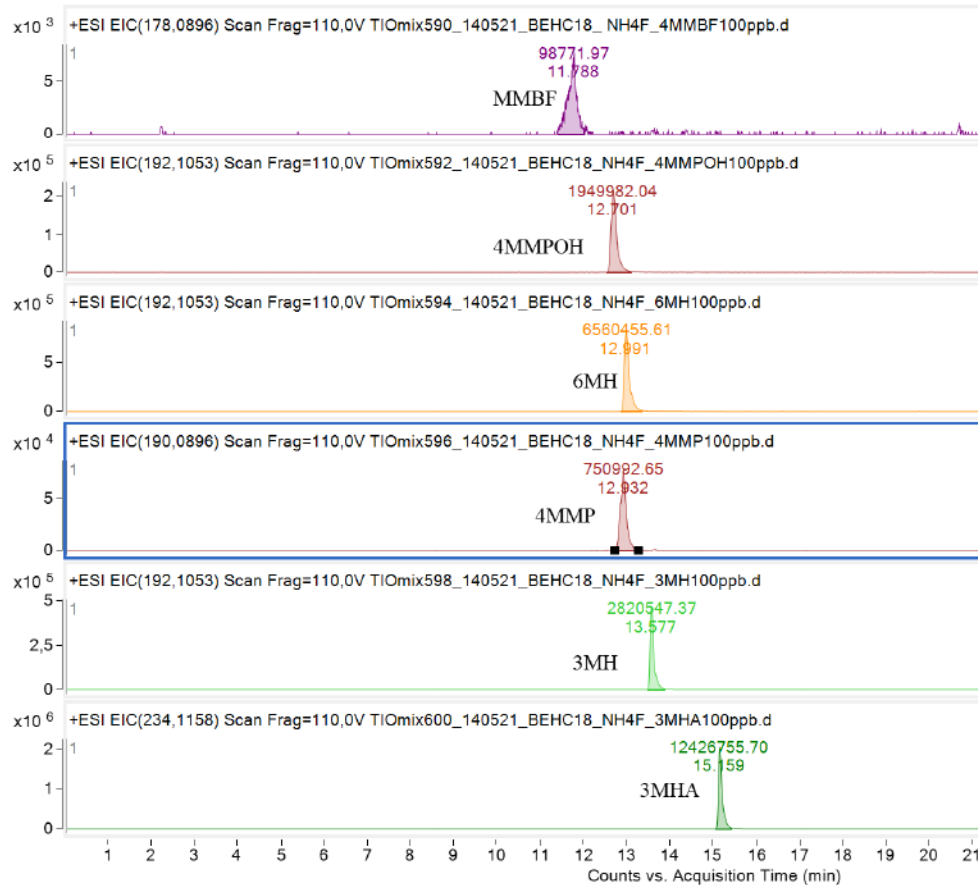


Figura 15. Cromatogrammi in corrente ionica estratta (EIC) relativi ai 4 tioli varietali (3MH, 3MHA, 4MMP e 4MMPOH) e ai 2 Standard Interni (6MH e MMBF) ottenuti dalle analisi HPLC-MS dei composti in concentrazione 100 µg/L, con eluenti H₂O milliQ + NH₄F 1mM e ACN.

3.2. Ottimizzazione della reazione di derivatizzazione

Per la derivatizzazione sono stati valutati diversi parametri, ad esempio la quantità di reagente derivatizzante, il pH, il tempo e la temperatura. Le analisi cromatografiche e spettrometriche sono state condotte utilizzando le condizioni migliori precedentemente studiate.

❖ Valutazione del pH

Come prima cosa, in questo studio, è stato valutato il pH in cui svolgere la reazione di derivatizzazione; i metodi presenti in letteratura per l'utilizzo della iodoacetammide come derivatizzante nelle analisi proteomiche, infatti, prevedono un ambiente di reazione basico. Le soluzioni prese in considerazione sono state preparate in questo modo: 1 mL di EtOH 50% contenente 50 mg/L di IAA e 100 µg/L di tioli; da qui è stato valutato il pH migliore per la derivatizzazione. A queste, infatti, è stata inizialmente aggiunta un'aliquota di NH₄OH (30%) (2 µL, pH = 11) per la valutazione di un ambiente basico; dopo 30 minuti di reazione, è stata aggiunta una pari quantità di Acido Formico puro. L'analisi cromatografica ha evidenziato la presenza dei composti di interesse derivatizzati (vedi **Figura 16.**) con segnali abbastanza intensi, circa 10⁶.

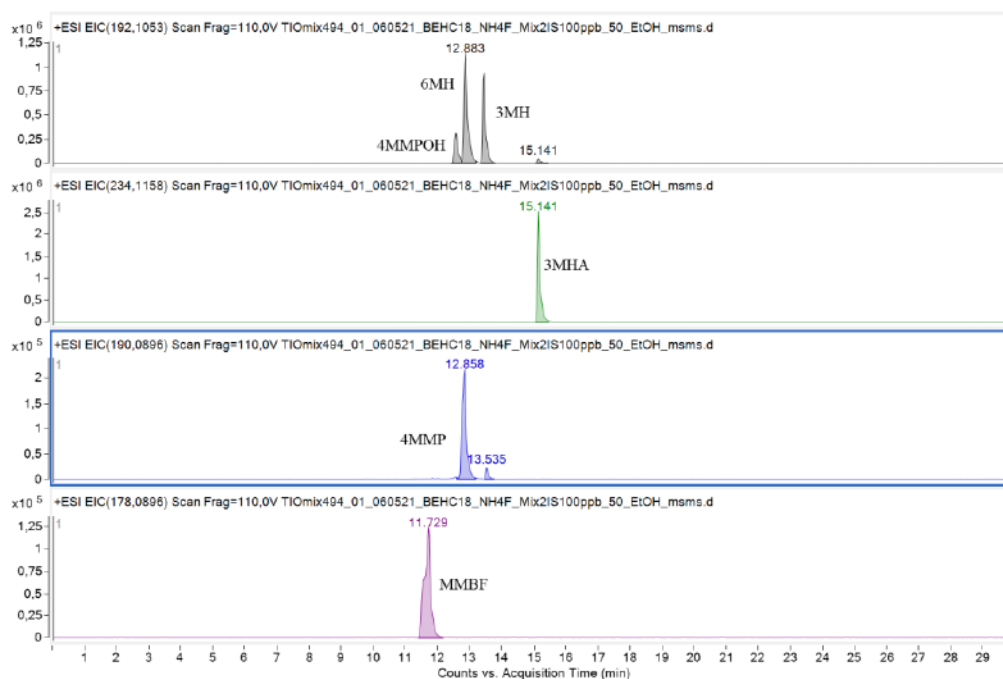


Figura 16. Cromatogrammi in corrente ionica estratta (EIC) relativi ai 4 tioli varietali (3MH, 3MHA, 4MMP e 4MMPOH) e ai 2 Standard Interni (6MH e MMBF) ottenuti dalle analisi HPLC-MS dei composti in concentrazione 100 µg/L, con eluenti H₂O milliQ + NH₄Ac 1mM e ACN, per la reazione a pH basico.

Per quanto riguarda un ambiente di reazione in cui non è stato aggiunto alcun reagente modificante del pH, le soluzioni sono state analizzate come tali in HPLC-MS; tuttavia, non è stato possibile ottenere dei segnali in EIC relativi ai composti di interesse. Simili risultati sono stati ottenuti per quanto riguarda le prove effettuate aggiungendo una quantità di acido (aggiunti 20 μ L di CH_3COOH 1 M, pH = 3). Con ciò, è possibile affermare che il pH è un parametro fondamentale per la reazione di derivatizzazione e che questo è necessario sia basico (pH = 11) affinché la reazione proceda.

❖ Valutazione dell'ambiente di reazione

A questo punto, è stato preso in considerazione il solvente nel quale far avvenire la reazione. Come primo passaggio, è stata valutata la diversa concentrazione di solvente organico presente. Se inizialmente le reazioni sono state fatte avvenire in una soluzione contenente una concentrazione di alcol del 50%, così da semplificare l'analisi mass-spetrometrica e poichè per gli standard erano disciolti in solvente organico, si è valutata la resa di derivatizzazione al diminuire della concentrazione di alcol, per poter valutare una condizione simile a quella del vino. In **Figura 17**, è possibile vedere i risultati delle analisi cromatografiche effettuate, e si può notare come, ad eccezione del 3MHA, questi siano abbastanza paragonabili tra loro. La diminuzione della concentrazione di alcol in soluzione, quindi, non influenza la resa di reazione e perciò, essendo il vino la matrice su cui si deve lavorare per la quantificazione degli analiti in concentrazione incognita, si è preferito ottimizzare i restanti parametri per la reazione di derivatizzazione con una concentrazione di alcol in soluzione del 10%.

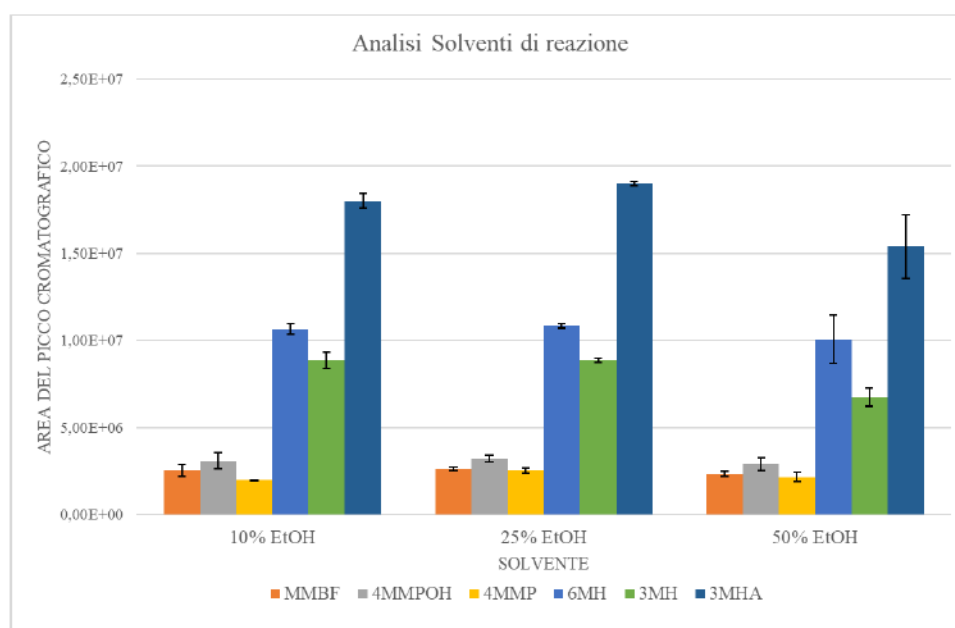


Figura 17. Grafico relativo ai segnali in corrente ionica estratta (EIC) dei 4 tioli varietali

(3MH, 3MHA, 4MMP e 4MMPOH) e dei 2 Standard Interni (6MH e MMBF) ottenuti dalle analisi HPLC-MS dei composti in concentrazione 100 µg/L, per i diversi solventi studiati.

Dopodiché, è stata considerata la quantità di reagente derivatizzante (IAA) aggiunta alla soluzione. Infatti, anche se la iodoacetammide è stata mantenuta in eccesso in tutte le prove effettuate, la sua concentrazione è stata aumentata e diminuita di dieci volte rispetto a quella utilizzata in precedenza. Ciò è stato studiato sia per una soluzione standard di EtOH 10% sia in matrice, mediante l'utilizzo di un vino modello, il Tavernello Bianco; questo perché in matrice sono presenti possibili interferenti che andrebbero a diminuire la quantità di iodoacetammide libera a causa di reazioni parallele (ad esempio con i solfiti). La matrice è stata trattata con NH₄OH (30%) (1 mL per 25 mL di vino) ed EDTA (25 mg), al fine di complessare gli ioni metallici presenti in soluzione per evitare possibili reazioni redox degli analiti di interesse, e, dopo aver lasciato decantare per circa 45 minuti, questo è stato filtrato mediante un filtro a fascia nera (Munktell Filter Discs Grade 388, d = 110 mm, 84 g/m²) per rimuovere il precipitato formatosi a causa della basificazione. Dai risultati dell'analisi riportati in **Figura 18.** e in **Figura 19.**, si può notare che in matrice i segnali sono meno intensi rispetto alla soluzione standard, probabilmente a causa di composti che rendono meno efficace la reazione di derivatizzazione, soprattutto nel caso di concentrazioni di IAA basse. D'altra parte, si può notare come in entrambi i casi studiati, i segnali più intensi sono stati registrati per una quantità maggiore di iodoacetammide (500 mg/L). Si può anche vedere dal grafico, che nel caso della matrice vino, l'andamento è differente per quanto riguarda lo standard interno 6MH e l'analita 3MHA. Infatti, se nelle soluzioni standard il primo è quello che presenta un segnale maggiore, nella matrice complessa non è più così, ma per tutte e tre le concentrazioni di IAA analizzate il 3MHA è quello con un'intensità di segnale maggiore. Questo risultato, perciò, si potrebbe attribuire alla possibile presenza di analita all'interno del vino modello utilizzato (Tavernello Bianco), ma in concentrazione non rivelabile dallo strumento nell'analisi del bianco.

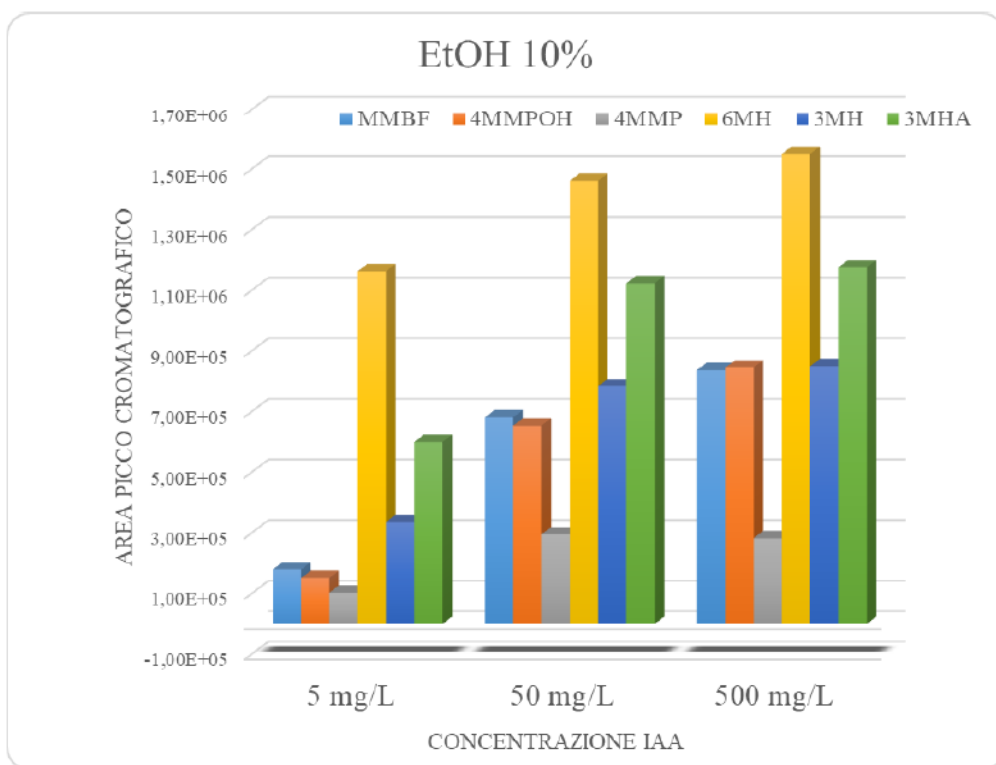


Figura 17. Grafico relativo ai segnali in corrente ionica estratta (EIC) dei 4 tioli varietali (3MH, 3MHA, 4MMP e 4MMPOH) e dei 2 Standard Interni (6MH e MMBF) ottenuti dalle analisi HPLC-MS dei composti in concentrazione 100 µg/L in una soluzione di EtOH 10%, per diverse quantità di iodoacetammide aggiunte.

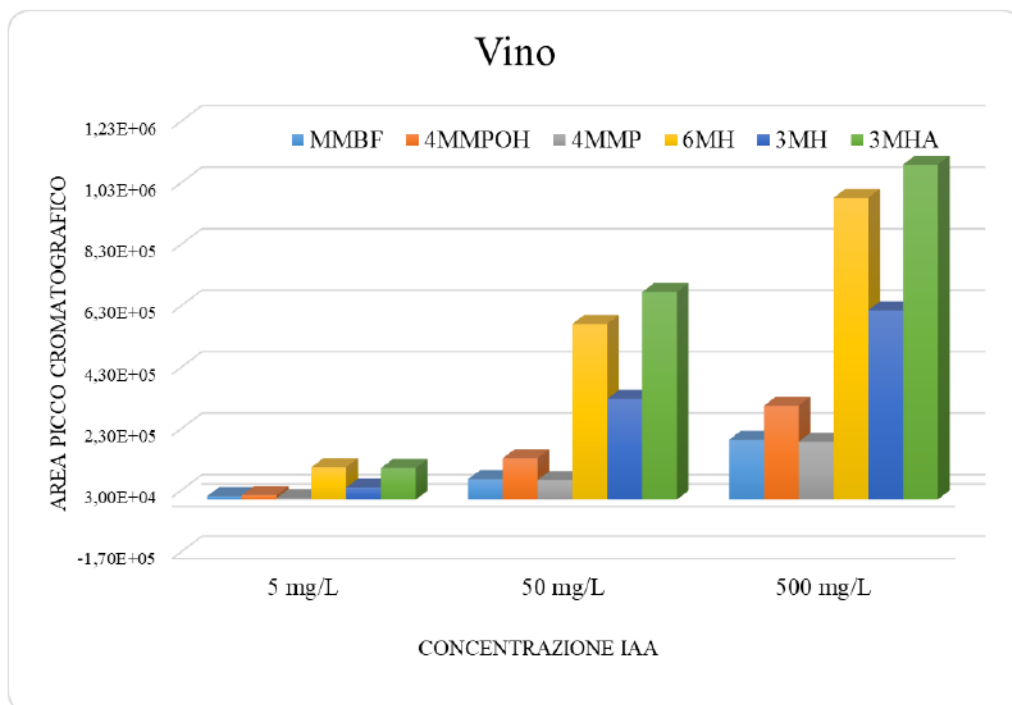


Figura 18. Grafico relativo ai segnali in corrente ionica estratta (EIC) dei 4 tioli varietali (3MH, 3MHA, 4MMP e 4MMPOH) e dei 2 Standard Interni (6MH e MMBF) ottenuti dalle analisi HPLC-MS dei composti in concentrazione 100 µg/L ne vino, per diverse quantità di iodoacetammide aggiunte.

Valutando a questo punto le performance dei due Standard interni, il 6MH e l'MMBF, quest'ultimo risulta, per ogni analisi effettuata, meno derivatizzato e con un segnale meno intenso; inoltre, come si può notare in **Figura 15**, il picco cromatografico risulta essere anche più largo. Tenuto conto di ciò, è stato ritenuto opportuno utilizzare come Standard Interno solamente il 6MH.

❖ Ottimizzazione dello Scale Up

Infine, come ultimo step per la valutazione dei parametri migliori per la reazione di derivatizzazione è stato preso in considerazione anche lo Scale Up. Se, infatti, fino ad ora le soluzioni in cui sono state condotte le reazioni erano di 1 mL, il campione che si dovrà analizzare, contenente gli analiti, dovrà avere un volume maggiore, fino a cento volte, in quanto questi sono presenti in concentrazioni molto basse. Per questo motivo, tenuto conto di quelli che sono i metodi riportati in letteratura nelle reazioni della iodoacetammide con i tioli in matrice biologica^{41,42}, sono state condotte delle prove diversificando la base utilizzata e, di conseguenza, il pH. Fino ad ora, le reazioni in 1 mL erano state effettuate in presenza NH₄OH (30%) (2 µL, pH = 11); tuttavia, aumentando il volume di soluzione a 100 mL, con il conseguente aumento della quantità di NH₄OH (30%) aggiunta, al fine di ottenere un pH pari a 11 (200 µL), ma mantenendo le concentrazioni di tioli e IAA uguali a quelle utilizzate in 1 mL (ossia 100 µg/L e 500 mg/L) non è stato possibile trovare in EIC i segnali relativi agli analiti di interesse. Perciò, l'idrossido d'ammonio è stato sostituito dal bicarbonato d'ammonio (NH₄HCO₃) e sono state valutate due diverse concentrazioni: 25 mM e 50 mM; il pH misurato con la cartina tornasole è circa 8. Il tempo di reazione è stato mantenuto costante per tutte le analisi, e per acidificare la soluzione nel caso del bicarbonato d'ammonio è stata aggiunta una uguale quantità di Acido Formico 1 M. In **Figura 20**, sono riportati i segnali relativi alle analisi delle soluzioni contenenti NH₄HCO₃ in diverse concentrazioni e il confronto con i segnali ottenuti aggiungendo, invece, NH₄OH (30%). Anche se i segnali risultano meno intensi, le prove successive, effettuate per volumi maggiori (100 mL), hanno confermato la derivatizzazione dei composti. Infatti, dalle analisi strumentali effettuate è stato possibile estrarre un cromatogramma degli analiti ed uno spettro di massa con intensità paragonabili a quelle ottenute per soluzioni standard di 1 mL, mentre per quanto riguardava reazioni avvenute in presenza di idrossido di ammonio ciò non era possibile, l'analisi non ha evidenziato, infatti, alcun segnale relativo agli analiti.

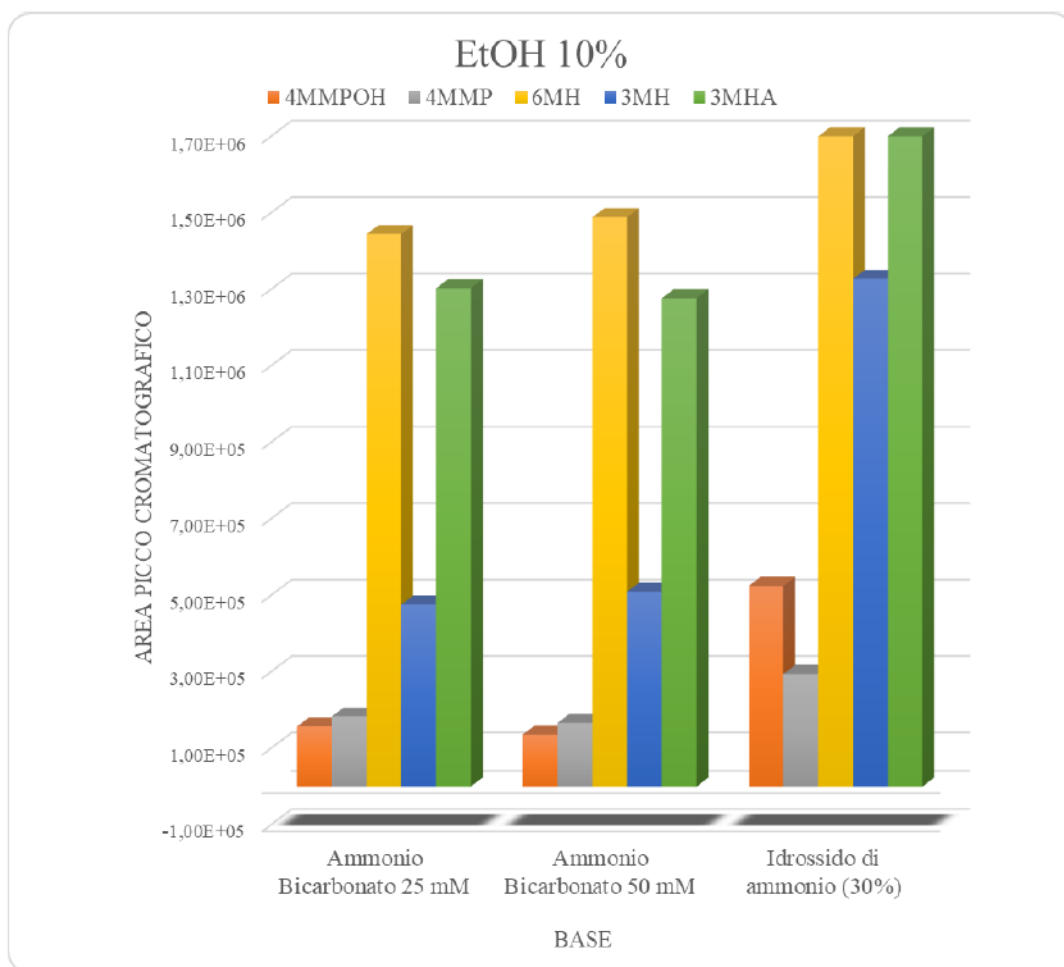


Figura 20. Grafico relativo ai segnali in corrente ionica estratta (EIC) dei 4 tioli varietali (3MH, 3MHA, 4MMP e 4MMPOH) e dello Standard Interni (6MH) ottenuti dalle analisi HPLC-MS dei composti in concentrazione 100 µg/L in una soluzione di 1 mL di EtOH 10%, per diverse basi aggiunte.

Tenuto conto dei risultati dati dal grafico in **Figura 20**, per la derivatizzazione è stato ritenuto opportuno utilizzare una quantità di 50 mM di NH_4HCO_3 in quanto è possibile ottenere segnali con risoluzione migliore. A questo punto, però, per la reazione in Scale Up sono stati presi in considerazione anche altri parametri. Se, infatti, la reazione in 1 mL veniva interrotta dopo 30 minuti, avendo aumentato il volume di soluzione, si è valutata la possibilità di allungare i tempi di reazione. Si è lavorato, inizialmente a concentrazioni di tioli pari a 50 µg/L, e la reazione è stata fatta andare per 24 ore, al termine delle quali è stato aggiunto l'Acido Formico. I risultati ottenuti sono stati accettabili, tuttavia, al fine di sviluppare un protocollo analitico efficace e vantaggioso per l'analisi dei tioli in matrice enologica, è necessario che la reazione di derivatizzazione sia il più veloce possibile e quantitativa. Tenuto conto di ciò, sono state svolte le reazioni diminuendo drasticamente il tempo ad 1 e 3 ore, ma aumentando leggermente la temperatura, evitando l'evaporazione dei composti, a 30°. Dal grafico in **Figura 21**, si evince che seppur inferiori rispetto a quelli ottenuti dopo 24 ore di reazione,

i segnali delle reazioni svolte a 30° per 3 ore sono più intensi rispetto a quelli di 1 ora nel caso di quelli che sono gli analiti più problematici e che rispondono meno all'analisi cromatografica, risultando così la scelta migliore per il metodo in questione. La stessa procedura è stata effettuata per una concentrazione di analiti dieci volte inferiore, ed i risultati sono riportati nel grafico in **Figura 22**. Per alcuni analiti l'andamento è simile a quello sopra descritto, mentre, per quanto riguarda lo Standard Interno e il 3MHA, diminuendo la concentrazione in soluzione, si hanno dei segnali più intensi per la reazione avvenuta a 30 °C per 3 ore. Tenuto conto di ciò, è stato ritenuto opportuno condurre la reazione di derivatizzazione a 30 °C per 3 ore, rendendo il metodo, in questo modo, più veloce e ottenendo, allo stesso tempo, dei buoni risultati. Dalle intensità dei segnali ottenuti per l'analisi a 5 µg/L, dell'ordine di 10⁵, è possibile stimare grossolanamente il LOD strumentale, ossia la possibilità di discriminare il segnale del nostro analita rispetto al rumore, che è valutato come pari a circa 0,5 µg/L.

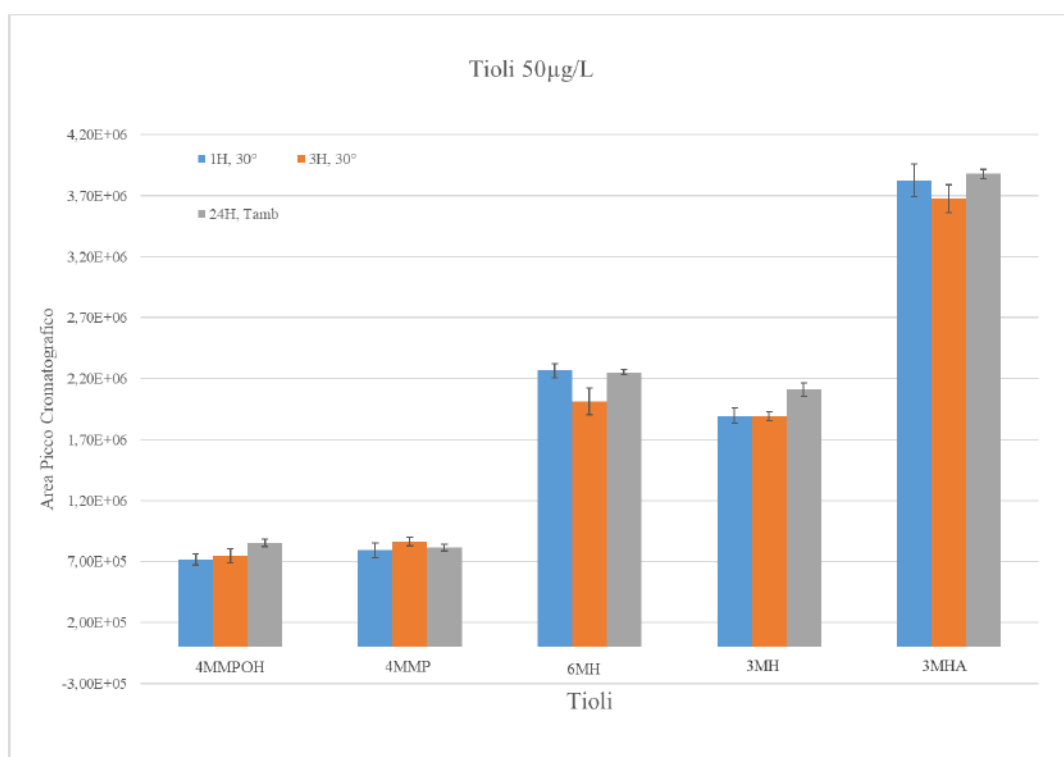


Figura 21. Grafico relativo ai segnali in corrente ionica estratta (EIC) dei 4 tioli varietali (3MH, 3MHA, 4MMP e 4MMPOH) e dello Standard Interni (6MH) ottenuti dalle analisi HPLC-MS dei composti in concentrazione 50 µg/L in una soluzione di 100 mL di EtOH 10%, per diversi tempi di reazione.

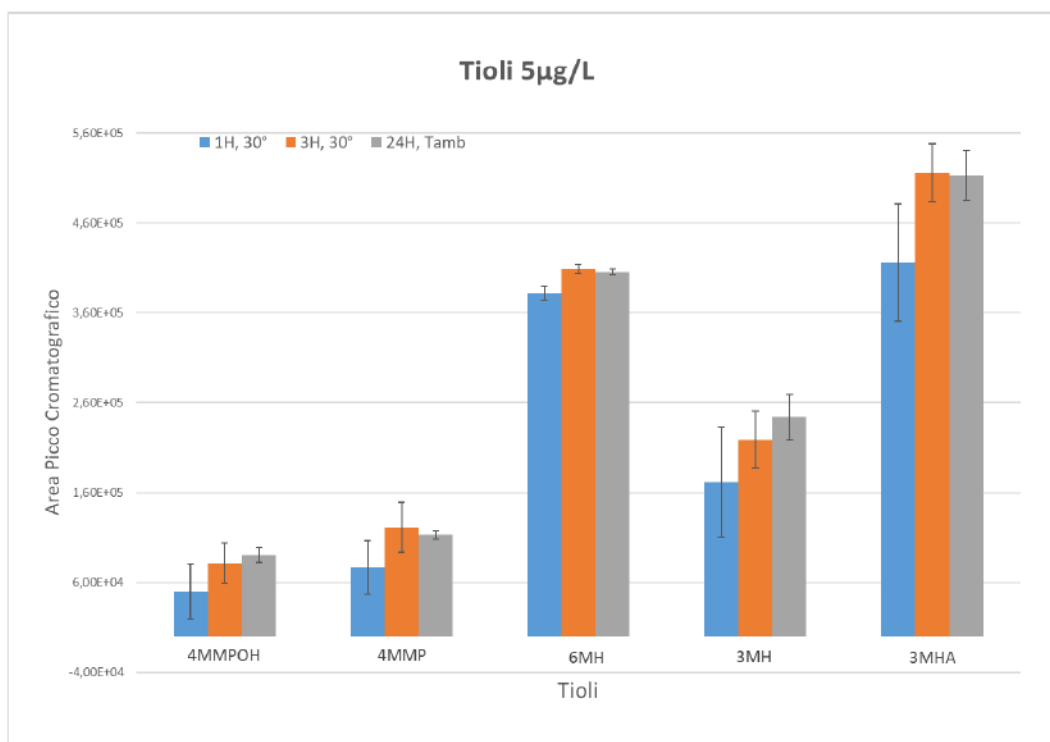


Figura 22. Grafico relativo ai segnali in corrente ionica estratta (EIC) dei 4 tioli varietali (3MH, 3MHA, 4MMP e 4MMPOH) e dello Standard Interni (6MH) ottenuti dalle analisi HPLC-MS dei composti in concentrazione 5 µg/L in una soluzione di 100 mL di EtOH 10%, per diversi tempi di reazione.

3.3. Estrazione in fase solida (SPE)

Parallelamente all'ottimizzazione della reazione di derivatizzazione, è stata valutata la procedura di estrazione in fase solida. I nostri analiti, infatti, essendo presenti in concentrazioni molto basse nel campione (ng/L) non sono rivelabili dallo strumento, per il quale il LOD è intorno ai µg/L.

In fase iniziale, l'SPE non è stata utilizzata per concentrare il campione, ma si sono valutati i recuperi e se la cartuccia e gli eluenti scelti per l'estrazione fossero efficaci per ottenere dei buoni recuperi. Per questo, sono state preparate delle soluzioni da 1 mL in cui è stata fatta avvenire la reazione di derivatizzazione, dopodichè queste soluzioni sono state diluite a 100 mL con H₂O milliQ e fatte passare in cartuccia. Sono state prese in considerazione due tipi di cartucce differenti, C18 e HLB. La prima è una cartuccia a fase inversa che ritiene composti non polari o moderatamente polari da matrici acquose⁴³; la seconda, a base polimerica, è formata da due monomeri, uno idrofilico e l'altro idrofobico (rispettivamente N-vinilpirrolidone e divinilbenzene), ed ha la capacità di ritenere composti moderatamente polari privi di carica netta⁴⁴. Entrambe sono state attivate e condizionate nello stesso modo (12 mL di MeOH + 12 mL di H₂O milliQ) il lavaggio è stato effettuato con 6 mL di H₂O milliQ e l'eluizione dei composti ritenuti è stato fatto con 6 mL di MeOH, prendendo come esempio il metodo di estrazione utilizzato da Capone³³. L'eluato è stato fatto evaporare a 32 °C e insufflando N₂, fino ad ottenere un residuo di circa 50 µL, dopodichè il campione è stato ricostituito con 950 µL di EtOH 10%, in modo da ottenere una soluzione da 1 mL in EtOH 10% confrontabile con una soluzione standard su cui non è stata svolta la procedura SPE. I recuperi sono riportati nella **Tabella 8**, e nel grafico in **Figura 23**, si può notare che le cartucce C18 forniscono, in generale, dei recuperi maggiori rispetto a quelli con fase polimerica (HLB).

Tabella 8. Recuperi relativi all'estrazione in fase solida effettuata con due tipi di cartucce: a fase inversa, C18, e a base polimerica, HLB.

Analita	C18		HLB	
	Recupero	RSD%	Recupero	RSD%
MMBF	86%	11%	103%	6%
4MMPOH	104%	12%	85%	6%
4MMP	71%	27%	77%	2%
6MH	73%	9%	65%	7%
3MH	94%	5%	75%	5%
3MHA	83%	3%	73%	3%

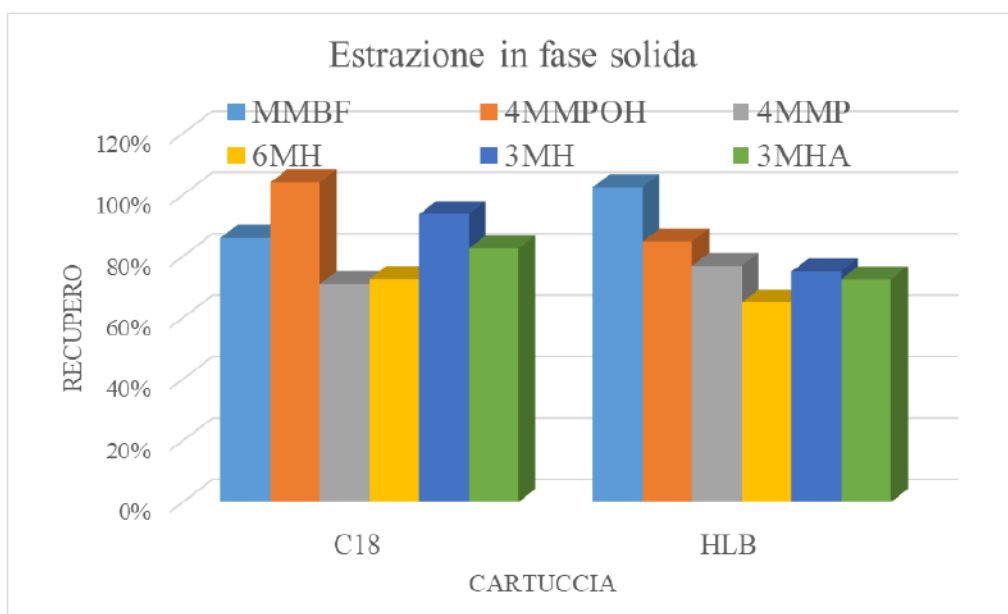


Figura 23. Grafico relativo ai recuperi con diverse cartucce SPE.

A questo punto, tenuto conto di questi risultati, sono state effettuate delle estrazioni sia su una soluzione standard di EtOH 10% sia sul vino modello, trattato con la stessa procedura descritta precedentemente, aggiungendo gli analiti in minore concentrazione (10 µg/L) (vedi **Figura 24.**)

Tabella 9. Confronto dei recuperi ottenuti dalle estrazioni con cartucce C18 in diverse matrici per le concentrazioni 10 µg/L.

Analita	EtOH 10%		Vino	
	Recupero	RSD%	Recupero	RSD%
MMBF	56%	7%	51%	20%
4MMPOH	62%	17%	17%	44%
4MMP	92%	21%	14%	57%
6MH	57%	16%	11%	54%
3MH	61%	13%	8%	75%
3MHA	67%	17%	5%	79%

Dalla **Tabella 9.** si vede che la variabilità aumenta passando dalla soluzione Standard di EtOH 10% alla matrice vino. Inoltre, al diminuire della concentrazione di analita, i recuperi ottenuti sono inferiori rispetto a quelli ottenuti per una concentrazione di 100 µg/L (vedi **Tabella 8.**). Si può notare come, oltre alla diminuzione generale dei recuperi diminuendo la concentrazione, c'è un drastico calo generale nei recuperi per quanto riguarda il vino, segnale che la matrice complessa può interferire nella ritenzione dei composti in cartuccia.

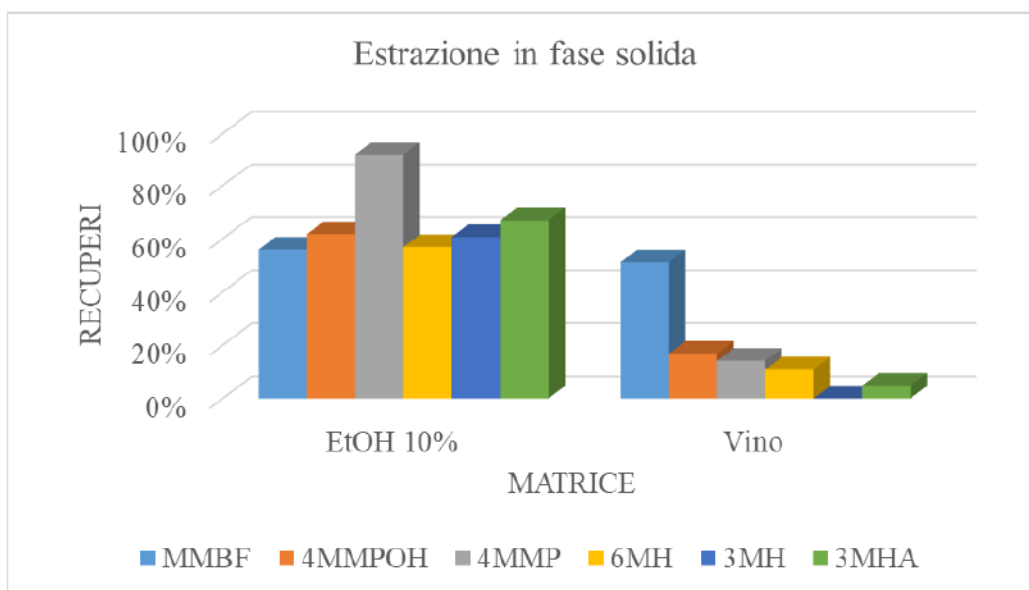


Figura 24. Grafico relativo ai recuperi SPE per tioli in concentrazione 10 µg/L.

A questo punto, sono state effettuate delle SPE per concentrare i campioni a partire da 100 mL di soluzione standard di EtOH 10% contenenti gli analiti in concentrazione 100 ng/L. La procedura di estrazione è stata mantenuta uguale alle precedenti prove, a parte l'aumento del volume di eluizione da 6 mL a 12 mL. I recuperi dell'estrazione così effettuata sono, però, di molto inferiori rispetto a quelli ottenuti precedentemente (<5%). È stato, quindi, ipotizzato che la causa di ciò possa essere la percentuale di fase organica presente in soluzione, la quale potrebbe eluire i composti derivatizzati. Per questo motivo, le soluzioni da 100 mL sono poi state diluite a 500 mL con H₂O milliQ, ma i recuperi ottenuti sono stati paragonabili a quelli ottenuti per soluzioni non diluite, e rimangono inferiori al 5%.

Questi recuperi potrebbero essere causati sia da una scarsa efficienza di reazione al diminuire della concentrazione di analiti in soluzione, sia dall'estrazione in fase solida, che potrebbe causare la perdita di analita durante la procedura. Ciò è problematico non solo per i bassi recuperi in questo caso specifico, una soluzione standard di EtOH 10%, ma anche perché, dai dati riportati in precedenza, l'SPE non riuscirebbe ad avere delle performance accettabili per quanto riguarda l'estrazione degli analiti dalla matrice vino.

4. Conclusion

In questo lavoro di tesi si è voluto sviluppare un metodo innovativo basato sulla cromatografia liquida ad elevate prestazioni accoppiata alla spettrometria di massa per l'identificazione e la quantificazione di tioli in matrice enologica.

La loro importanza è dovuta alle caratteristiche organolettiche che questi conferiscono al vino, le quali, insieme ad altri fattori, determinano la qualità del prodotto finale e influenzano il consumatore nella sua scelta. Essendo questi composti rilasciati in matrice a seguito di reazioni enzimatiche, la possibilità di identificare i diversi tipi di tioli presenti in matrice, e soprattutto quantificarli, permette di scegliere il profilo enzimatico migliore da utilizzare durante la fermentazione per ottenere un prodotto che incontra maggiormente i gusti del consumatore.

I metodi fino ad ora utilizzati sono per lo più fini all'identificazione, non solo, oltretutto essi sfruttano reagenti e/o solventi rischiosi per la salute umana e dell'ambiente, costosi e talvolta non abbastanza selettivi.

Per questo motivo, in questo progetto si è voluto sviluppare un metodo che fosse economico, che utilizzi reagenti a basso rischio, veloce e selettivo. L'agente derivatizzante utilizzato è la iodoacetammide, già ampiamente impiegata nelle analisi in proteomica, che permette di derivatizzare tutti gli analiti considerati in questo studio, in condizioni blande e senza l'utilizzo di particolari e costosi reagenti.

L'analisi in cromatografia liquida e di spettrometria di massa (HPLC-MS) mediante ionizzazione ESI positiva ha dato dei buoni segnali; questi risultano abbastanza intensi e i picchi relativi ai composti isobari sono ben separati.

Data la presenza dei tioli in tracce nella matrice, per rendere il campione compatibile all'analisi in cromatografia liquida e in spettrometria di massa si rende necessario uno step di estrazione. La scelta di utilizzare un SPE nasce dal fatto che questa risulta più veloce e meno costosa, in quanto si ha meno utilizzo di solvente, e, inoltre, si riesce a concentrare il campione diminuendo drasticamente i volumi a seguito di un'evaporazione e a eliminare eventuali composti interferenti. In questo studio sono state valutate due tipi di cartucce, C18 e HLB, le quali, pur garantendo prestazioni buone per soluzioni standard di tioli derivatizzati, hanno tuttavia prodotto dei risultati non soddisfacenti ai livelli di concentrazione dei tioli varietali di interesse nel vino. La causa, si è ipotizzato, poter essere la quantitatività della reazione di derivatizzazione e la composizione della matrice. Per questo motivo è da valutare in studi futuri la possibilità di valutare i migliori parametri per la reazione nella matrice enologica, in modo da ottimizzare in seguito l'estrazione in fase solida e poter quantificare gli analiti ai

livelli di soglia di percettibilità olfattiva (ODT).

Si può concludere che dai risultati ottenuti, una volta ottimizzato, il metodo analitico basato su HPLC-MS per l'analisi di tioli derivatizzati con iodoacetammide può essere un'alternativa efficace, con costi e tempi inferiori ai metodi presentati fino ad ora in letteratura.

Appendice

5. Strumentazione

5.1. HPLC

La cromatografia liquida ad elevate prestazioni o elevate pressioni (HPLC) ci permette di separare diversi analiti presenti in una matrice complessa per poterli identificare e quantificare. Trattandosi di analiti presenti in tracce nella matrice e solitamente di massa inferiore ai 1000 Da, in generale, questo passaggio avviene a seguito di una fase di clean-up/estrazione del campione, al fine di eliminare eventuali interferenti e/o sostanze presenti che potrebbero diminuire l'efficienza dell'analisi. Questa tecnica cromatografica è costituita da una colonna, riempita da una *fase stazionaria*, su cui viene fatta scorrere la *fase mobile* con una polarità diversa e di conseguenza per la separazione degli analiti viene sfruttato il differente coefficiente di ripartizione che questi hanno. Durante il processo di eluizione sono diverse le interazioni coinvolte: forze di Van der Waals, i legami a idrogeno e le interazioni idrofobiche; e diversi sono i meccanismi di ritenzione che possono verificarsi:

- ❖ di adsorbimento, in cui la *fase stazionaria* è un solido che può adsorbire gli analiti mediante differenti tipi di interazioni intermolecolari;
- ❖ di partizione di fase, in cui la *fase stazionaria* è una sostanza legata covalentemente come un film sottile ad un supporto solido (es. le pareti interne del capillare, colonne capillari a silice fusa o piccole particelle di silice chimicamente trattate per facilitarne il legame con la fase stazionaria che vengono impaccate nella colonna). La *fase stazionaria* può essere un liquido o no, ad esempio le più comuni C18;
- ❖ a scambio ionico, in cui l'interazione principale è costituita dalle forze coulombiane tra l'analita ionizzato e la carica fissa situata su una *fase stazionaria* solida, generalmente una resina organica.

Un'importante distinzione per quanto riguarda la cromatografia liquida è se essa è a fase normale o inversa (la più diffusa), per le quali la *fase mobile* ha una polarità rispettivamente minore e maggiore rispetto alla *fase stazionaria*. Colonne per cromatografia a fase normale per soluti non polari sono costituite da silice, allumina, silicati di alluminio o magnesio, oppure polimeri idrofobici cross-linked (es. copolimeri di stirene e divinilbenzene). Tra queste, sicuramente la silice è la più ampiamente utilizzata grazie alla reattività dei gruppi idrossido presenti sulla superficie, che ne permettono la derivatizzazione. Le colonne

cromatografiche a fase inversa, infatti, sono generalmente in silice fusa derivatizzata con gruppi organici, ad esempio catene C18. Per quanto riguarda la *fase mobile*, spesso composta da due eluenti (es. acqua e metanolo/acetone), si deve tener conto di diversi fattori che potrebbero influenzare le prestazioni cromatografiche. I solventi utilizzati devono essere puri, privi di qualsiasi tipo di sostanza che potrebbe inquinare/intasare la colonna, per questo motivo è opportuno degassare i solventi prima di iniettarli nel sistema cromatografico, al fine di eliminare le possibili bolle di gas presenti. Siccome la pressione massima a cui arriva la strumentazione è 600 bar, si deve considerare la viscosità dei solventi utilizzati per evitare che le pressioni aumentino in modo elevato, con il rischio che l'analisi non proceda e lo strumento si blocchi. Inoltre, la *fase mobile* dev'essere scelta in modo che sia inerte, e non interagisca quindi, con la *fase stazionaria*, al fine di mantenere quest'ultima il più invariata possibile per la riproducibilità delle misure. Affinché l'efficienza dell'analisi sia elevata, inoltre, si devono considerare altri due parametri: la polarità e la forza di eluzione. Quest'ultima è la misura della capacità dell'eluente di liberare il sito attivo della *fase stazionaria* dall'analita, mediante l'energia di adsorbimento dell'eluente sul sito attivo; maggiore è questo valore, maggiore è l'affinità del solvente per il sito attivo e maggiore è la capacità di eluzione della *fase mobile*. Scegliendo questi opportunamente, e variando o meno la percentuale degli eluenti durante l'analisi (eluizione a gradiente di concentrazione o eluizione isocratica), possiamo modificare i tempi di ritenzione (i tempi con cui l'analita è ritenuto in colonna), dilatandoli o accorciandoli, riuscendo quindi a separare maggiormente i composti.

Lo strumento è costituito da:

- un sistema di alimentazione della fase mobile, costituito da due contenitori per i liquidi che compongono la fase mobile e da un degassatore;
- un sistema di iniezione, costituito da un autocampionatore e un iniettore loop basato su una valvola a sei porte, che permette la riproducibilità nell'iniezione;
- un sistema di pompe, le quali devono provvedere ad un flusso costante della fase mobile per tutto il sistema cromatografico;
- una pre-colonna, con *fase stazionaria* simile a quella della colonna cromatografica, che permette di eliminare dal campione possibili interferenti che possono modificare e/o rovinare quest'ultima per l'analisi;
- una camera termostata per la colonna, che ci permette di mantenere costante o modificare opportunamente attraverso un gradiente la temperatura dell'analisi;
- la colonna cromatografica;

- un rivelatore, che può essere di diversa natura, ad esempio uno spettrometro di massa oppure un rivelatore UV-Vis;
- un computer collegato, che permette l'elaborazione dei dati e il set up dei parametri per l'analisi.⁴⁵



Figura 25. Strumento HPLC (cromatografo liquido ad alte prestazioni) 1260 Infinity II Agilent presente nel laboratorio di ricerca.

5.2. Spettrometro di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica che permette di identificare e quantificare atomi e composti presenti nella matrice in concentrazioni molto basse. Lo strumento è costituito da quattro parti principali:

- ❖ un sistema di introduzione del campione: poiché lo spettrometro lavora ad alto vuoto (raggiungendo anche pressioni di 10^{-10} millibar), essa è un'interfaccia necessaria nel caso questo sia accoppiato ad un HPLC da cui il campione esce a pressioni elevate e nella fase mobile. È inoltre utile affinché l'analita presente nella fase mobile sia quasi interamente immesso all'interno dello spettrometro;
- ❖ una sorgente ionica: il principio della spettrometria di massa si basa sulla separazione degli analiti in base alla differenza dei rapporti m/z , per questo motivo è fondamentale la presenza di una sorgente in cui gli analiti vengono ionizzati. Questa può generare gli ioni in diversi modi: per impatto elettronico (EI), per ionizzazione chimica (CI), per ionizzazione elettrospray (ESI) o altri;
- ❖ un analizzatore, il cui compito è quello di separare, selezionare ed escludere gli analiti in base al rapporto m/z ; anche questo può essere di differente natura: quadrupolo, settore magnetico, trappola ionica o a tempo di volo;
- ❖ un rivelatore: si tratta generalmente di moltiplicatori elettronici, costituiti da elettrodi a cascata, che amplificano il segnale della corrente prodotta dagli ioni. Questo segnale viene poi trasmesso ad un computer in cui si possono elaborare i dati e modificare i parametri di ionizzazione e analisi.



Figura 26. Schema di uno spettrometro di massa.

Il livello di informazione che possiamo ottenere dallo spettrometro di massa dipende dal limite massimo del rapporto m/z misurabile, dalla sensibilità e dal suo potere risolutivo. Questo determina la capacità di uno strumento di separare ioni con massa nominale uguale, ma differente massa esatta. Gli strumenti a bassa

risoluzione forniscono solo la massa nominale degli ioni, mentre quelli ad alta risoluzione forniscono la massa esatta degli ioni. È possibile, per avere una migliore separazione dei picchi, aumentare la risoluzione (fino ad un limite dato dallo strumento), perdendo però spesso di sensibilità, in quanto la quantità di ioni che arriva al rivelatore è minore.



Figura 27. Spettrometro di massa Agilent 6545 LC/Q-TOF presente nel laboratorio di ricerca.

5.2.1. Ionizzazione Elettrospray (ESI)

La ionizzazione elettrospray è una tra le più nuove tecniche di ionizzazione ed è stata ampiamente impiegata nell'ambito della biochimica e della biologia molecolare, poichè applicabile per molecole di scarsa volatilità, polari e con massa elevata. L'ESI, inoltre, è uno dei metodi di ionizzazione più facilmente accoppiabili all'HPLC, in quanto consiste nella formazione di ioni gassosi a pressione atmosferica degli analiti presenti in fase liquida. Il flusso entra all'interno della sorgente di ionizzazione mediante un capillare riscaldato circondato da un gas nebulizzante (azoto). La ionizzazione avviene tramite la nebulizzazione della soluzione che attraversa un ago tenuto ad alto potenziale elettrico, determinando così la formazione di piccole goccioline che trasportano una carica elettrica netta. Nella formazione di questi droplets si bilanciano le forze elettrostatiche, date dall'accumulo di carica, e la tensione superficiale. L'azoto è necessario per favorire l'evaporazione del solvente e per focalizzare il flusso di ioni, i quali, dopo aver raggiunto un punto critico nella repulsione elettrostatica delle cariche superficiali, superando le forze di coesione, esplodono (esplosione coulombiana) e questo si ripete fino a che non avviene il completo desorbimento in fase gassosa. Questo tipo di ionizzazione è detta *soft* in quanto è possibile ottenere il picco relativo allo ione molecolare con l'aggiunta o la perdita di un protone, evitando in questo modo la completa frammentazione dell'analita.⁴⁵

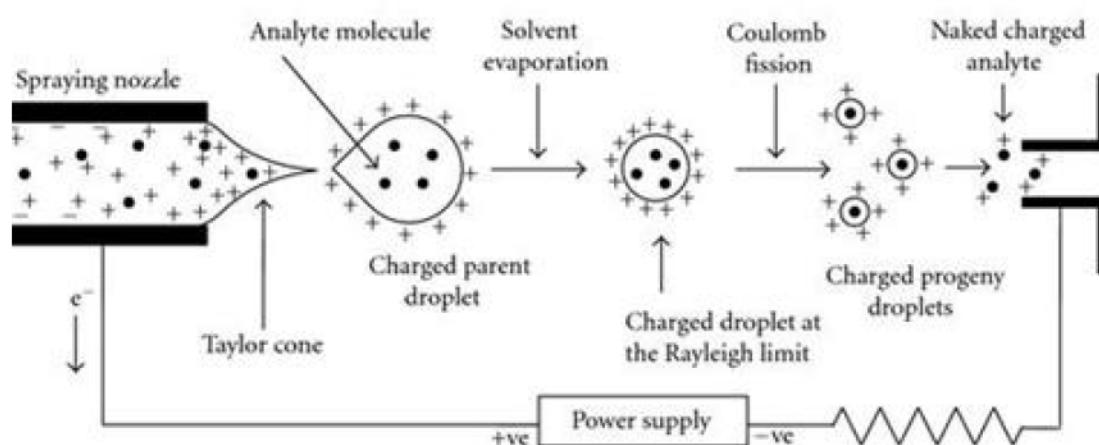


Figura 28. Schema di funzionamento della ionizzazione elettrospray (ESI).

5.2.2. Q-ToF

L'avvento dell'analizzatore a Quadrupolo Tempo di Volo (Q-ToF) ha rivoluzionato molti campi della ricerca, in particolare il campo biologico e farmaceutico. L'accoppiamento di questi due analizzatori permette l'analisi di molti ioni simultaneamente con grande accuratezza nella massa e un'alta risoluzione, permettendo l'analisi target e untarget di composti in matrici complesse. Gli ioni in fase gas entrano all'interno del quadrupolo che permette di isolare quelli con rapporto m/z di interesse (MS) e controllare le frammentazioni (MS/MS).

Il quadrupolo è formato da quattro barre metalliche cilindriche disposte a coppie sovrapposte; ad una coppia di barre diagonalmente opposte è applicato un potenziale positivo, mentre all'altra uno negativo. A queste barre è collegata una radiofrequenza che ne inverte la polarità generando un campo elettrico oscillante tra queste permettendo, così, di scegliere selettivamente gli ioni con un determinato rapporto m/z . Di per sé, questo analizzatore non ha un elevato potere risolutivo, ma permette di effettuare l'analisi in tempi brevi e a diminuire i costi della strumentazione.

L'analizzatore a tempo di volo, invece, non necessita di un campo elettrico per selezionare gli ioni, ma misura la diversa velocità con cui questi arrivano al rivelatore. Questi provengono da una sorgente in cui vengono accelerati da un campo elettrico ed hanno la stessa energia cinetica, ma diverse velocità, in dipendenza dalla loro massa; è importante per l'analisi che ci sia una produzione pulsata degli ioni e non un flusso continuo. Attraversando una traiettoria nota, pertanto, impatteranno con il moltiplicatore elettronico in tempi diversi, di conseguenza, gli ioni più veloci, ossia quelli a con massa minore, arriveranno prima al rivelatore e viceversa. Inizialmente, i ToF erano di "modalità lineare", e, pur comprendo un ampio range di massa con elevata sensibilità, avevano scarse risoluzioni. Per ovviare a questo problema, i moderni ToF si avvalgono di un reflectron o riflettore elettrostatico, il cui compito è quello di compensare le differenze dei tempi di volo di ioni con uguale rapporto m/z ma con differenti energie traslazionali nella traiettoria di volo. Questo dispositivo, posto all'estremità opposta rispetto al detector, introduce un campo elettrico crescente attraverso una serie di griglie o anelli, dello stesso segno degli ioni, che rallenta e ferma questi ultimi e poi ne inverte la direzione di volo (repulsione elettrostatica); gli ioni che avranno un'energia traslazionale maggiore, data ad esempio dalla posizione di partenza dello ione al momento dell'impulso iniziale nella regione di accelerazione, penetreranno maggiormente nel campo ritardante nel reflectron, rispetto a quelli più lenti, e quindi aumenteranno il percorso totale per arrivare al rivelatore. Oltre a ciò, il compito del riflettore è quello di

focalizzare il flusso di ioni correggendo la divergenza angolare degli ioni provenienti dalla sorgente. In questo modo gli ioni con uguale m/z impatteranno sul rivelatore simultaneamente, aumentando di molto la risoluzione dello strumento e mantenendo l'accuratezza nella determinazione della massa.

L'accoppiamento di questi due analizzatori ci permette di avere uno strumento ad alta risoluzione, che registra gli spettri in tempi brevi, con un ampio range di masse (rapporti m/z) e dall'elevata accuratezza, di registrare spettri MS/MS, e quindi indagare non solo lo ione molecolare, ma selezionarlo e valutare le sue frammentazioni; infine, ci permette anche di abbassare i costi per quanto riguarda la strumentazione.⁴⁵

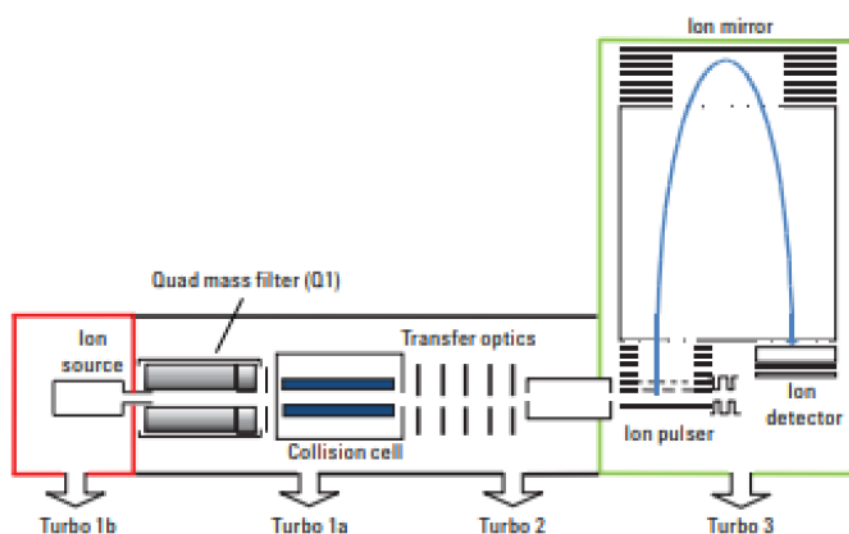


Figura 29. Schema dello spettrometro di massa Agilent 6545 LC/Q-TOF presente nel laboratorio di ricerca.

5.3. Estrazione in fase solida

L'estrazione in fase solida è una tecnica analitica impiegata nel pretrattamento del campione, al fine di renderlo compatibile con l'analisi cromatografica e con la rivelazione. Oltre a ciò, questa ci permette anche di diminuire gli effetti della matrice durante l'analisi, in quanto eventuali interferenti vengono rimossi durante la procedura.

Ci sono, in generale, due diversi metodi di estrazione in fase solida (SPE) utilizzabili: l'estrazione selettiva e concentrazione di analiti target presenti in una matrice complessa su una fase solida che non lega gli eventuali interferenti, seguita da eluizione con un solvente, e l'eluizione selettiva degli analiti attraverso una fase solida che ritiene fortemente gli interferenti. La prima è quella a cui si fa comunemente riferimento parlando di SPE ed è utilizzata nel caso in cui gli analiti di interesse siano presenti in tracce o a basse concentrazioni in una matrice complessa, mentre la seconda è utile nel caso gli analiti siano ad alte concentrazioni in soluzione.

Il principio di funzionamento è sostanzialmente uguale a quello cromatografico in cui è presente una *fase stazionaria*, in questo caso la fase solida, che può essere di diversa natura in dipendenza del composto che dobbiamo ritenere, sulla quale viene fatta scorrere una *fase mobile*, la matrice complessa in cui sono contenuti gli analiti. La *fase stazionaria* è immobilizzata in una siringa (cartuccia), dal volume variabile, nella quale è immesso il campione (SPE in colonna) oppure viene dispersa nella *fase mobile*, e dopo l'adsorbimento dei composti viene separata per centrifugazione o sedimentazione (SPE dispersiva). Nel caso dell'utilizzo di una cartuccia SPE, la *fase mobile* viene fatta scorrere sul materiale adsorbente per gravità, mediante l'utilizzo di una linea da vuoto oppure applicando la pressione di testa, ad esempio insufflando un gas inerte come azoto. I passaggi da seguire per l'estrazione in fase solida sono i seguenti:

- ❖ pre-condizionamento: lavare la cartuccia SPE con il solvente utilizzato per l'eluizione degli analiti e poi con il solvente (non eluente) simile alla matrice del campione (in volumi uguali);
- ❖ caricamento: un volume appropriato di campione è caricato all'interno della cartuccia. È opportuno scegliere la cartuccia più adatta in modo da non rischiare la saturazione della *fase stazionaria* con conseguente perdita di analita o non ritenzione di eventuali impurezze/interferenti;
- ❖ lavaggio: con lo stesso solvente non eluente utilizzato nel pre-condizionamento (e pari volume) per rimuovere eventuali impurezze non ritenute;
- ❖ eluizione: recupero dell'analita utilizzando lo stesso solvente con elevata forza eluente utilizzato nel pre-condizionamento;

- ❖ preparazione dell'estratto finale: questo passaggio è fondamentale per rendere il campione compatibile con l'analisi cromatografica. Il solvente in cui è presente l'analita non deve avere maggiore potere eluente rispetto a quello dell'analisi HPLC, ad esempio; quindi, è opportuno far evaporare il solvente e ricostituire il campione con l'eluente utilizzato nella cromatografia liquida.

Nelle variabili di cui tener conto per l'estrazione in fase solida, oltre alla forza eluente dei solventi, è appunto fondamentale la tipologia di fase solida (adsorbente o resina) con cui lavorare. Potendo contare su svariati adsorbenti e condizioni di eluizione per diversi analiti e matrici essa risulta essere una tecnica molto versatile e selettiva. Comuni fasi stazionarie SPE sono:

- a base di silice: fase inversa (C18, C8, ciano, fenil), fase normale (silice, dioli, NH₂) e scambio ionico (SAX, WCX, SCX);
- a base di carbonio;
- a base polimerica, con varie formulazioni e diverse funzionalità (HLB);
- altre, come Florisil® (silicato di magnesio) o allumina;
- a letto misto: combinazioni di quasi tutte le fasi sopraelencate in strati successivi.

Inoltre, la loro classificazione varia in base alla tipologia di gruppo attivo con cui sono funzionalizzate: idrofobiche (gruppi apolari), idrofile (gruppi polari), a scambio ionico o miste.

Le due tipologie di SPE sopra discusse sono dette "off-line", è possibile, però, avere un sistema "on-line" che permette l'estrazione in fase solida e la diretta iniezione del campione nel cromatografo. Quest'ultimo sistema, seppur riduce la possibilità di errori, aumenta notevolmente i costi della procedura, che generalmente è utilizzata in un protocollo analitico perché economica dal punto di vista della strumentazione e dei solventi utilizzati.⁴⁵

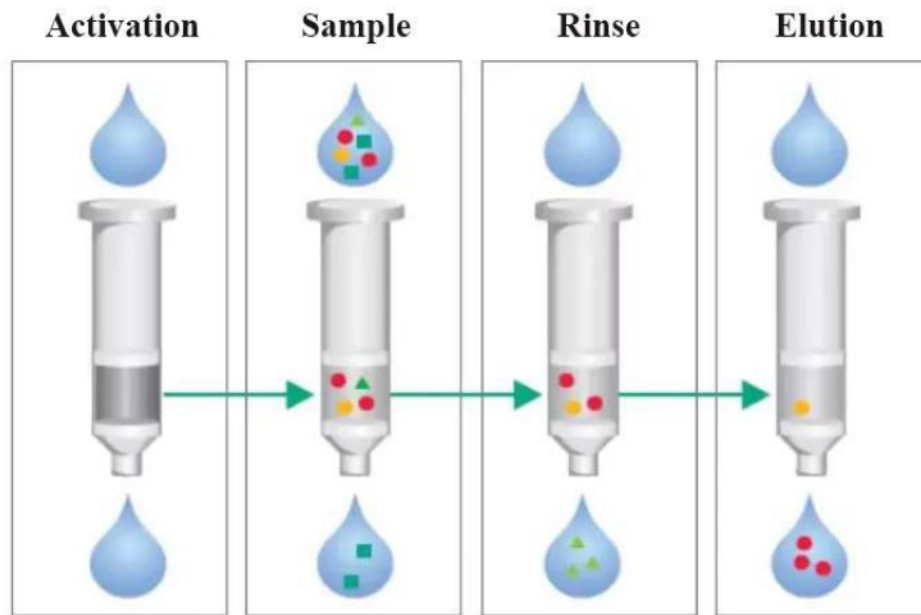


Figura 30. Schema di funzionamento della procedura di estrazione in fase solida (SPE).

Bibliografia

1. Anderson, K. & Pinilla, V. Wine's belated globalization, 1845–2025. *Appl. Econ. Perspect. Policy* (2021) doi:10.1002/aep.13174.
2. Belitz, H. D., Grosch, W. & Schieberle, P. *Food chemistry. Food Chemistry* (Springer Berlin Heidelberg, 2009). doi:10.1007/978-3-540-69934-7.
3. Maicas, S. Advances in wine fermentation. *Fermentation* **7**, (2021).
4. Petronilho, S., Lopez, R., Ferreira, V., Coimbra, M. A. & Rocha, S. M. Revealing the usefulness of aroma networks to explain wine aroma properties: A case study of Portuguese wines. *Molecules* **25**, (2020).
5. Hartley, I. E., Liem, D. G. & Keast, R. Umami as an 'Alimentary' taste. A new perspective on taste classification. *Nutrients* vol. 11 (2019).
6. Amoore, J. . Specific anosmia and the concept of primary odors. . *Chem. Senses* **2**, 267–281 (1977).
7. <http://www.vcf-online.nl/VcfHome.cfm> .
8. Roland, A., Schneider, R., Razungles, A. & Cavelier, F. Varietal thiols in wine: Discovery, analysis and applications. *Chemical Reviews* vol. 111 7355–7376 (2011).
9. Bruice, P. Y. *Chimica Organica*. (EdiSes, 2017).
10. Chen, L., Capone, D. L. & Jeffery, D. W. Analysis of potent odour-active volatile thiols in foods and beverages with a focus on wine. *Molecules* vol. 24 (2019).
11. Silano, V. *et al.* Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation 74, Revision 4 (FGE.74Rev4): Consideration of aliphatic sulphides and thiols evaluated by JECFA (53rd and 61st meeting) structurally related to aliphatic and alicyclic mono-, di-, tri- and polysulphides wi. *EFSA J.* **16**, (2018).
12. Piano, F. *et al.* Development of a novel liquid/liquid extraction and ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the assessment of thiols in South African Sauvignon Blanc wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* **21**, 40–48 (2015).
13. McGorin, R. J. The significance of volatile sulfur compounds in food flavors. *ACS Symp. Ser.* **1068**, 3–31 (2011).
14. Hebditch, K. R., Nicolau, L. & Brimble, M. A. Synthesis of isotopically labelled thiol volatiles and cysteine conjugates for quantification of Sauvignon Blanc wine. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **50**, 237–243 (2007).
15. Swiegers, J. H. & Pretorius, I. S. Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 954–960 (2007).
16. Howell, K. S. *et al.* Genetic determinants of volatile-thiol release by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5420–5426 (2005).
17. Cerreti, M. *et al.* Evolution of S-cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors during grape ripening of *Vitis vinifera* L. cvs Grechetto, Malvasia del Lazio and Sauvignon Blanc. *Aust. J. Grape Wine Res.* **21**, 411–416 (2015).
18. Cordente, A. G., Capone, D. L. & Curtin, C. D. Unravelling glutathione conjugate catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of glutathione/dipeptide transporters and vacuolar function in the release of

- volatile sulfur compounds 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 9709–9722 (2015).
19. Bonnaffoux, H. *et al.* Revisiting the evaluation strategy of varietal thiol biogenesis. *Food Chem.* **268**, 126–133 (2018).
 20. Blanchard, L., Tominaga, T. & Dubourdieu, D. Formation of furfurylthiol exhibiting a strong coffee aroma during oak barrel fermentation from furfural released by toasted staves. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4833–4835 (2001).
 21. Tominaga, T., Guimbertau, G. & Dubourdieu, D. Contribution of benzenemethanethiol to smoky aroma of certain *Vitis vinifera* L. wines. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1373–1376 (2003).
 22. Darriet, P.; Tominaga, T.; Lavigne, V.; Boidron, J.-N.; Dubourdieu, D. Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour Fragrance J.* **10**, 385–392 (1995).
 23. Tominaga, T., Murat, M. L. & Dubourdieu, D. Development of a Method for Analyzing the Volatile Thiols Involved in the Characteristic Aroma of Wines Made from *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon Blanc. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1044–1048 (1998).
 24. Schneider, R., Kotseridis, Y., Ray, J. L., Augier, C. & Baumes, R. Quantitative determination of sulfur-containing wine odorants at sub parts per billion levels. 2. Development and application of a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3243–3248 (2003).
 25. Mateo-Vivaracho, L., Cacho, J. & Ferreira, V. Selective preconcentration of volatile mercaptans in small SPE cartridges: Quantitative determination of trace odor-active polyfunctional mercaptans in wine. *J. Sep. Sci.* **32**, 3845–3853 (2009).
 26. Takazumi, K., Takoi, K., Koie, K. & Tuchiya, Y. Quantitation Method for Polyfunctional Thiols in Hops (*Humulus lupulus* L.) and Beer Using Specific Extraction of Thiols and Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **89**, 11598–11604 (2017).
 27. Mateo-Vivaracho, L., Cacho, J. & Ferreira, V. Improved solid-phase extraction procedure for the isolation and in-sorbent pentafluorobenzyl alkylation of polyfunctional mercaptans. Optimized procedure and analytical applications. *J. Chromatogr. A* **1185**, 9–18 (2008).
 28. Rodríguez-Bencomo, J. J., Schneider, R., Lepoutre, J. P. & Rigou, P. Improved method to quantitatively determine powerful odorant volatile thiols in wine by headspace solid-phase microextraction after derivatization. *J. Chromatogr. A* **1216**, 5640–5646 (2009).
 29. Mateo-Vivaracho, L., Ferreira, V. & Cacho, J. Automated analysis of 2-methyl-3-furanthiol and 3-mercaptohexyl acetate at ng L⁻¹ level by headspace solid-phase microextraction with on-fibre derivatization and gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometric determination. *J. Chromatogr. A* **1121**, 1–9 (2006).
 30. Herbst-Johnstone, M., Piano, F., Duhamel, N., Barker, D. & Fedrizzi, B. Ethyl propiolate derivatization for the analysis of varietal thiols in wine. *J. Chromatogr. A* **1312**, 104–110 (2013).

31. Zuman, P. Reactions of orthophthalaldehyde with nucleophiles. *Chem. Rev.* **104**, 3217–3238 (2004).
32. Vichi, S., Cortés-Francisco, N. & Caixach, J. Analysis of volatile thiols in alcoholic beverages by simultaneous derivatization/extraction and liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Food Chem.* **175**, 401–408 (2015).
33. Capone, D. L., Ristic, R., Pardon, K. H. & Jeffery, D. W. Simple quantitative determination of potent thiols at ultratrace levels in wine by derivatization and high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (hplc-ms/ms) analysis. *Anal. Chem.* **87**, 1226–1231 (2015).
34. Fedrizzi, B. *et al.* Hyphenated gas chromatography-mass spectrometry analysis of 3-mercaptohexan-1-ol and 3-mercaptohexyl acetate in wine. Comparison with results of other sampling procedures via a robust regression. *Anal. Chim. Acta* **621**, 38–43 (2008).
35. Schardon, C. L., Tuley, A., Er, J. A. V., Swartzel, J. C. & Fast, W. Selective Covalent Protein Modification by 4-Halopyridines through Catalysis. *ChemBioChem* **18**, 1551–1556 (2017).
36. Chen, X. *et al.* Discovery of Heteroaromatic Sulfones As a New Class of Biologically Compatible Thiol-Selective Reagents. *ACS Chem. Biol.* **12**, 2201–2208 (2017).
37. Qi, B. L. *et al.* Derivatization for liquid chromatography-mass spectrometry. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **59**, 121–132 (2014).
38. Takkis, K. *et al.* Signal Enhancement in the HPLC-ESI-MS/MS analysis of spironolactone and its metabolites using HFIP and NH₄F as eluent additives. *Anal. Bioanal. Chem.* **409**, 3145–3151 (2017).
39. Gonzalez-Riano, C., Gradillas, A. & Barbas, C. Exploiting the formation of adducts in mobile phases with ammonium fluoride for the enhancement of annotation in liquid chromatography-high resolution mass spectrometry based lipidomics. *J. Chromatogr. Open* **1**, 100018 (2021).
40. Pesek, J. J. & Matyska, M. T. Ammonium fluoride as a mobile phase additive in aqueous normal phase chromatography. *J. Chromatogr. A* **1401**, 69–74 (2015).
41. Yang, Z. & Attygalle, A. B. LC/MS characterization of undesired products formed during iodoacetamide derivatization of sulfhydryl groups of peptides. *J. Mass Spectrom.* **42**, 233–243 (2007).
42. Yamasaki. 基因的改变 NIH Public Access. *Bone* **23**, 1–7 (2014).
43. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/60108-301>.
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/60108-301>.
44. Waters corporation. Oasis HLB Cartridges and 96-Well Plates. *Care use Man.* 1–4 (2014).
45. Boyd, R. K., Basic, C. & Bethem, R. A. *Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry. Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry* (2008). doi:10.1002/9780470727140.

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare, anzitutto, la professoressa Sara Bogialli per avermi accettato come laureanda e avermi permesso di svolgere il progetto di tesi nel suo gruppo di ricerca. La ringrazio per l'aiuto e per le conoscenze che mi ha trasmesso che mi hanno permesso di portare a termine il progetto.

Ringrazio il ricercatore Marco Roverso per gli innumerevoli consigli e per avermi aiutata durante tutto il tempo trascorso nel gruppo, non solo praticamente ai fini del progetto, ma anche per una crescita personale.

Ringrazio Raghav, Silvia, Tecla, Francesca, Chiara, Samuele e Francesca, i compagni di laboratorio che mia hanno supportata, fatta ridere ed hanno reso questo percorso più divertente.

Un particolare ringraziamento a mio padre Francesco, a mia madre Giuseppina senza i quali non avrei potuto essere qui ora. Grazie a mia sorella Alice e a mio cognato Marco, il mio fratellone. Tutti loro mi hanno sopportato e supportato sia nei momenti di crisi che nei momenti di gioia, non solo durante questo periodo universitario, ma per tutta la mia vita.

Grazie a zio Pino e a zia Giovanna, grazie a zio Romeo e a zia Agnese perché ci sono sempre stati, anche se lontani.

Grazie a Ludovica, Ilaria e Roberto che hanno saputo rendere speciale la pausa pranzo sulla muretta o sulle scale, che mi hanno fatta ridere, che mi hanno spronato a non mollare e che hanno avuto sempre una parola di conforto quando ne avevo bisogno.

Grazie alle ragazze, Valentina, Monica e Valentina, le nostre serate all'insegna del divertimento hanno saputo alleggerirmi l'animo e mi hanno aiutato a ricaricarmi.

Infine, vorrei ringraziare una persona speciale, Camilla, a cui questa tesi è dedicata. È stata, nei momenti più bui, la luce che ha illuminato la strada, grazie a lei ho avuto la forza di dare il massimo, nello studio, come nella vita.

