

Relazione tecnica relativa allo spettrometro di massa Orbitrap Exploris 240 con motivazione a supporto dell'acquisto

Premessa

Al fine dello svolgimento delle attività di ricerca, condotte presso il laboratorio Oenolab, Facoltà di Scienze agrarie, ambientali e alimentari, si rende necessaria l'acquisizione di uno spettrometro di massa ad alta risoluzione per analisi metabolomiche e lipidomiche.

Con comunicazione pervenuta il 24 luglio 2025 è stata approvata, da parte della Provincia Autonoma di Bolzano - Alto Adige, l'Infrastruttura per la valorizzazione totale degli scarti dell'industria agroalimentare "ZeroResidue" (CUP I53C25001580009), presentata dal sottoscritto, Prof. Boselli. La presente infrastruttura finanzia l'acquisizione di uno spettrometro di massa ad alta risoluzione.

Lo strumento che possiede le caratteristiche adatte alle specifiche ricerche per le quali si richiede la nuova apparecchiatura è lo **Spettrometro di massa a filtro quadrupolare accoppiato ad un sistema FT-MS basato sulla tecnologia Orbitrap, denominato Orbitrap Exploris 240**, di cui si chiede l'acquisto assieme al relativo sistema di cromatografia liquida ad ultra-prestazione (UHPLC) e ad altri accessori necessari per il suo funzionamento, come dettagliato di seguito.

Caratteristiche tecniche della strumentazione

Lo spettrometro di massa Orbitrap Exploris 240 presenta le seguenti caratteristiche tecniche:

- lo spettrometro di massa a Trasformata di Fourier (FTMS) con tecnologia Orbitrap funziona in base ad un nuovo concetto brevettato da Thermo Fisher, che si basa su una tecnica di spettrometria di massa ad altissima risoluzione. Tale tecnologia non prevede l'utilizzo di campi magnetici, generati da magneti a superconduzione con conseguenti sistemi criogenici, radiofrequenze o misura di tempi di volo (ToF) per separare gli ioni di diverso valore di massa/carica (m/z), come in altri spettrometri attualmente in commercio, ma si basa sull'impiego di un campo elettrostatico applicato ad un elettrodo centrale intorno al quale gli ioni ruotano in modo radiale ed assiale. La determinazione del rapporto m/z degli ioni avviene misurando nel tempo la corrente generata dal loro movimento assiale e applicando la trasformata di Fourier per convertire il segnale acquisito nel tempo in quello delle frequenze ed intensità che lo compongono, da cui vengono calcolate la massa e la quantità degli ioni. La risoluzione dello spettro di massa ottenuto dipende perciò dalla durata del tempo di osservazione senza perdita di intensità del segnale al suo aumentare.

- **Risoluzione:** l'analizzatore Orbitrap dell'Exploris 240 è in grado di garantire una Risoluzione massima di ≥ 240000 misurata a m/z 200.

Inoltre, lo Spettrometro di Massa Exploris 240 possiede le seguenti caratteristiche uniche aggiuntive: Possibilità diverse di frammentazione:

- HCD (Higher Energy Collision Dissociation) nella cella quadrupolare dell'Orbitrap con generazione di uno spettro di frammentazione.

Possibilità di isolamento dello ione precursore in alta risoluzione.

- HRI con isolamento pari a 0.4 amu

Possibilità di acquisire in contemporanea spettri MS-Full Scan e MS/MS.

- Data Dependent ScanTM

- **Velocità di scansione:** lo strumento Orbitrap Exploris 240 è in grado di abbinare elevate velocità di scansione in modalità MS (fino a 22 Hz) ad una elevata risoluzione nella selezione degli ioni precursori senza compromessi nella sensibilità strumentale. Cicli di acquisizione molto veloci consentono di ottenere un numero elevato di data points per picco senza compromettere il potere risolutivo dello

strumento. Tale requisito è molto importante per le analisi di screening sia *untargeted* (in cui gli analiti devono essere identificati) che *targeted* (in cui gli analiti sono noti e li si vuole quantificare).

- **Accuratezza di massa:** lo strumento Orbitrap Exploris 240 garantisce un'accuratezza di massa inferiore ai 3 ppm, con calibrazione esterna, ed inferiore ad 1 ppm con calibrazione interna (lock mass). La sorgente ionica EASY-IC, che può utilizzare ioni calibranti interni, garantisce il mantenimento di un'accuratezza di massa inferiore a 1 ppm per almeno 5 giorni. La stabilità nella rivelazione delle masse garantisce la robustezza delle analisi anche di lotti numerosi di campioni, caratteristici degli studi metabolomici e lipidomici.

- Capacità di acquisire spettri SIM (Single Ion Monitoring) in *modalità Multiplexing* con 20 ioni precursori per ciclo di acquisizione, caratteristica che consente allo strumento di ridurre la durata del ciclo di acquisizione completo (Duty Cycle) e di aumentare il numero di misurazioni all'interno del picco cromatografico in modalità SIM, per una maggiore accuratezza nell'analisi quantitativa *targeted*.

- **Polarity Switching:** l'analizzatore Orbitrap Exploris 240 consente di effettuare un ciclo completo di scansione (una scansione in ionizzazione positiva e una scansione in ionizzazione negativa) in 0,7 s ad una risoluzione di 60000 a $m/z = 200$. A differenza di quanto accade nel caso di altri spettrometri di massa ad alta risoluzione, il rapido ripristino della stabilità e della risoluzione passando da una polarità all'altra consente di guadagnare tempo per l'analisi successiva.

- **Acquisizione in contemporanea** di spettri di MS in modalità full scan e MS/MS, garantendo la possibilità di fare analisi di conferma contemporaneamente allo screening di analiti incogniti nel campione.

- **Frammentazione mediante HCD** (Higher Energy Collisional Dissociation) nella cella quadrupolare dell'analizzatore con generazione di un corrispondente spettro di frammentazione.

- Isolamento dello ione precursore in alta risoluzione attraverso una doppia modalità: *High Resolution Isolation (HRI)* con finestra di isolamento pari a 0,4 amu e *Data Dependent ScanTM*.

Lo spettrometro di massa ad alta risoluzione necessita di essere interfacciato con un sistema cromatografico ad ultra-prestazione (UHPLC) dotato di pompa binaria in grado di supportare separazioni rapide in gradiente, come richiesto dai metodi analitici UHPLC-MS, operare a flussi di fase mobile tra 0.001-8 mL/min e sostenere contropressioni fino a 1034 bar. Tale sistema dovrà essere corredato di autocampionatore in grado di supportare volumi di iniezione nell'intervallo 0.01-100 mL, sistema di termostatazione tra 4 e 40°C e racks porta-campioni. Dovrà essere presente un forno di termostatazione per le colonne cromatografiche dotato di due slots per le colonne e capacità di riscaldamento nell'intervallo tra i 5 e 85°C.

In aggiunta, la piattaforma strumentale UHPLC-quadrupolo-Orbitrap richiede una licenza del software **Xcalibur** per il controllo del sistema UHPLC e dello spettrometro di massa e per l'acquisizione dei dati di MS e di MS/MS in alta risoluzione, e di una licenza del software **Compound Discoverer** per l'identificazione degli analiti incogniti attraverso una suite integrata di strumenti informatici.

Motivazione a supporto dell'acquisto dello strumento

Nell'ambito delle attività di ricerca svolte presso il laboratorio Oenolab, Facoltà di Scienze agrarie, ambientali e alimentari, vengono condotte analisi metabolomiche e lipidomiche su matrici biologiche complesse. I campioni biologici di derivazione vegetale e dai processi agroindustriali di trasformazione vengono analizzati con lo scopo di caratterizzare profili metabolomici o loro alterazioni conseguenti, ad esempio, ad un determinato processo di trasformazione o trasformazione dei prodotti e sottoprodotti della filiera. L'analisi metabolomica fornisce una "impronta" molecolare complessa che permette la caratterizzazione dettagliata del profilo chimico in prodotti e sottoprodotti della filiera agroindustriale sin dalle materie prime fino agli scarti che questo progetto si prefigge di valorizzare. In aggiunta, tali profili chimici, sono soggetto di indagine all'interno del progetto, non solo per fornire valore aggiunto ma anche per un eventuale successivo test di bioattività per cui il tipo in informazione

che può produrre lo strumento che si propone di acquistare (Orbitrap Exploris 240) è essenziale ai fini di avere un profilo chimico accurato e quanto più dettagliato.

Le analisi metabolomiche si basano comunemente sull'utilizzo di sistemi di separazione cromatografica, quali la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), accoppiati a sistemi di rivelazione mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione. Gli spettrometri di massa ad alta risoluzione permettono di ottenere una elevata accuratezza e risoluzione di massa che sono necessari sia per profilazione ed identificazione degli analiti che per una loro accurata quantificazione.

Lo strumento che abbiamo individuato avere le caratteristiche adatte per gli studi sopra descritti è uno spettrometro di massa ad alta risoluzione dalla configurazione ibrida quadrupolo-Orbitrap, denominato **Exploris 240**.

L' **Exploris 240** è un'apparecchiatura di ultima generazione nella serie degli spettrometri ibridi quadrupolo-Orbitrap. Pur condividendo con i suoi precursori della serie Q-Exactive alcune caratteristiche peculiari, quali l'elevata risoluzione propria della trappola orbitale (240000 FWHM a $m/z=200$) ed il mantenimento di alcune componenti chiave, quali (i) high capacity ion transfer tube (ii) electrodynamic ion funnel (iii) analizzatore Orbitrap HF (High Field), si caratterizza per un design estremamente compatto, progettato con l'obiettivo di renderlo di agevole collocazione all'interno anche di piccoli laboratori, riducendo di conseguenza i relativi costi e tempi di manutenzione.

L'altissima risoluzione di massa è il principale vantaggio fornito dallo spettrometro di massa quadrupolo-Orbitrap nello studio delle piccole molecole in matrici biologiche complesse. Infatti, l'altissima risoluzione consente di ottenere l'esatto profilo isotopico delle molecole di interesse con una elevata precisione nella definizione delle intensità relative dei vari isotopi. Questo aspetto, associato ad un'elevata accuratezza di massa, rende l'analizzatore Orbitrap lo strumento ideale per le applicazioni di profilazione chimica in quanto consente di massimizzare la capacità di identificazione degli analiti incogniti, per confronto con le banche dati, riducendo contemporaneamente il numero dei falsi positivi. Dal punto di vista dell'analisi quantitativa, l'elevata risoluzione di massa consente di separare un maggior numero di segnali a valori di m/z vicini, minimizzando i rischi di sovrapposizione dei segnali di massa che comprometterebbero l'accuratezza della determinazione quantitativa.

Una tecnologia alternativa è offerta dagli analizzatori ToF (Time of Flight). In questi analizzatori la risoluzione dello strumento è proporzionale al rapporto m/z , nel caso dell'Orbitrap invece la risoluzione cresce con il diminuire di tale rapporto. Questo è un altro aspetto di estrema importanza per le nostre ricerche che si basano sullo studio di analiti con rapporti m/z bassi (e.g., m/z 50–500), poiché permette una migliore discriminazione rispetto agli ioni interferenti, con una conseguente maggiore confidenza nella assegnazione dell'identità per confronto con banche dati.

Oltre alla più elevata risoluzione, requisito necessario per i nostri studi metabolomici e lipidomici, la configurazione ibrida quadrupolo-Orbitrap dell'Exploris 240 consente un'efficiente e veloce selezione degli ioni precursori per l'analisi MS/MS (velocità massima: 22 Hz), migliorando notevolmente le prestazioni per le applicazioni di tipo quantitativo. In termini di sensibilità e di intervallo dinamico di masse ($m/z = 40-6000$ amu) è possibile ottenere prestazioni paragonabili, e a volte superiori a quelle di strumenti a triplo quadrupolo di alta fascia, che rappresentano le configurazioni di riferimento in questo campo di analisi.

La tecnologia Orbitrap, su cui è basato lo spettrometro di massa Exploris 240, è tutelata dai seguenti brevetti:

Orbitrap Patent Number US 6,872,938 B2

Orbitrap Patent Number EP1900002B1

I due brevetti indicati (US 6,872,938 B2 ed EP1900002B1) tutelano il principio di funzionamento del sistema Orbitrap, ossia l'analizzatore di massa basato su campo elettrostatico e rilevazione del moto assiale degli ioni con trasformata di Fourier. Questa architettura brevettata costituisce il cuore

tecnologico esclusivo che distingue in modo sostanziale gli strumenti Thermo Fisher da tutti gli altri analizzatori HRMS attualmente sul mercato (es. TOF, FT-ICR con magneti superconduttivi, altri quadrupoli ibridi non-Orbitrap).

I brevetti inoltre coprono proprio la tecnologia che determina la differenza sostanziale rispetto agli altri costruttori:

- uso di un campo elettrostatico (senza magneti, criogenia o tempi di volo),
- rivelazione del segnale ionico tramite movimento assiale e analisi FT,
- relazione risoluzione-tempo di acquisizione propria dell'analizzatore Orbitrap

La tecnologia coperta da brevetto è esattamente quella che permette allo strumento di produrre i risultati scientifici indispensabili per il progetto ZeroResidue. In particolare:

- altissima risoluzione (≥ 240.000 a m/z 200) e accuratezza sub-ppm, fondamentali per la discriminazione di metaboliti a bassa massa (50–500 m/z),
- profilo isotopico perfettamente risolto, necessario per identificazione e riduzione dei falsi positivi,
- elevata velocità di scansione e capacità MS/MS (HCD, HRI 0.4 amu, DDA), indispensabili per metabolomica e lipidomica untargeted/targeted,
- stabilità del lock-mass per l'analisi di lotti ampi di campioni, requisito essenziale nei flussi analitici previsti dal progetto.

Questi risultati non sono ottenibili con tecnologie alternative (es. ToF), che presentano limiti intrinseci di risoluzione/accuratezza proprio nelle fasce di m/z di maggiore interesse per le matrici agroalimentari in studio.

Gli spettrometri di massa a filtro quadrupolare accoppiati ad un sistema FT-MS basati sulla tecnologia Orbitrap sono commercializzati unicamente ed esclusivamente da ThermoFisher Scientific S.p.a. Italia su tutto il territorio nazionale.

La ditta ha fornito una dichiarazione della unicità della strumentazione per privativa industriale, con un'offerta di acquisto nella configurazione descritta nel paragrafo precedente di €433869,96 + IVA. Questa offerta comprende anche l'imballo, il trasporto, le assicurazioni contro tutti i rischi, l'installazione ed il collaudo della strumentazione, nonché una estensione della garanzia a ulteriori 24 mesi rispetto al primo anno e alla formazione sull'utilizzo dell'apparecchiatura.

Bolzano 03/12/2025

Il proponente

Prof. Emanuele Boselli

(firmato digitalmente)

