



Università degli Studi di Genova

Scuola di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in
SCIENZE CHIMICHE

Tesi di Laurea

**Sviluppo di un database di spettri di massa ad alta
risoluzione per il riconoscimento di metaboliti di
composti organici di interesse biologico e ambientale**

Primo relatore

Prof. Emanuele Magi

Seconda relatrice

Dott.ssa Chiara Lavarello

Candidata

Erica Risso

Prima correlatrice

Prof.ssa Marina Di Carro

Seconda correlatrice

Prof.ssa Serena De Negri

Anno Accademico

2024/2025

INDICE

<i>1. INTRODUZIONE</i>	5
1.1. Il gruppo di ricerca e il contesto scientifico	5
1.2. Sviluppo e acquisizione della libreria spettrale	6
1.3. Applicazione della libreria all'analisi di campioni reali	7
1.4. Preparazione dei campioni per analisi proteomica	8
1.4.1. Studio di proteomica su cellule Natural Killer	9
1.4.2. Studio di proteomica su microvescicole	9
1.5. Stato dell'arte	10
<i>2. TECNICHE ANALITICHE</i>	12
2.1. Cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC)	12
2.1.1. Colonne cromatografiche	13
2.1.1.1. Colonna C18	13
2.1.1.2. Colonna HILIC	14
2.2. Spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS)	15
2.2.1. Orbitrap Fusion	16
2.2.1.1. Sorgente di ionizzazione	17
2.2.1.2. S-Lens	18
2.2.1.3. Active Beam Guide	19
2.2.1.4. Quadrupolo	19
2.2.1.5. C-Trap	23
2.2.1.6. Ion Routing Multipole (IRM)	24
2.2.1.7. Dual-Pressure Linear Ion Trap	24
2.2.1.8. Orbitrap	26
<i>3. MATERIALI E METODI</i>	28
3.1. Materiali	28
3.1.1. Standard chimici	28
3.1.2. Solventi	29
3.1.3. Materiali per la preparazione dei campioni biologici	29
3.2. Preparazione degli standard	30
3.3. Condizioni sperimentali	31
3.3.1. Condizioni cromatografiche	31
3.3.1.1. Condizioni cromatografiche in modalità C18	31

3.3.1.2. Condizioni cromatografiche in modalità HILIC.....	32
3.3.2. Ottimizzazione dei metodi di acquisizione in spettrometria di massa.....	33
3.3.2.1. Parametri comuni a tutti i metodi	33
3.3.2.2. Parametri oggetto di ottimizzazione	34
3.4. Acquisizione della libreria spettrale (mzVault).....	36
3.4.1. Compilazione della Compound List	36
3.4.2. Processamento della Compound List.....	37
3.5. Applicazione della libreria spettrale a campioni biologici.....	38
3.5.1. Preparazione dei campioni di plasma di pazienti affetti da Lesch-Nyhan.....	38
3.5.2. Metodo Analitico	39
3.5.3. Test della libreria.....	40
3.6. Preparazione di campioni biologici per analisi proteomica.....	40
3.6.1. Preparazione dei campioni di cellule Natural Killer.....	40
3.6.1.1. Lisi cellulare	40
3.6.1.2. Dosaggio delle proteine	41
3.6.1.3. Digestione enzimatica delle proteine in peptidi.....	42
3.6.1.4. Preparazione dei puntali Evotip	43
3.6.2. Preparazione di campioni di microvescicole da plasma	44
4. <i>RISULTATI E DISCUSSIONE</i>	46
4.1. Metodo di acquisizione ottimizzato	46
4.2. Librerie spettrali.....	47
4.3. Applicazione della libreria spettrale a campioni biologici.....	50
4.3.1. Confronto tra libreria affidabile e meno affidabile	50
4.3.2. Confronto con il database di riferimento	54
4.4. Campioni biologici per l'analisi proteomica	54
<i>CONCLUSIONI</i>	56
<i>Bibliografia</i>	57
<i>Appendici</i>	60
Appendice 1	60
Appendice 2	75
Appendice 3	77
.....	78
Appendice 4	79

.....	80
.....	81
Appendice 5	82
.....	82
.....	83
.....	84

1. INTRODUZIONE

1.1. Il gruppo di ricerca e il contesto scientifico

La tesi è stata svolta presso il laboratorio di ricerca “Core Facilities”, all’interno dell’Istituto Giannina Gaslini, uno dei principali ospedali pediatrici italiani e un punto di riferimento a livello internazionale. L’Istituto accoglie pazienti provenienti da diverse aree del mondo e rappresenta una realtà in cui l’elevata specializzazione clinica si affianca a un forte impegno nella ricerca scientifica. Accanto all’attività assistenziale, infatti, una parte rilevante delle risorse dell’Istituto è dedicata allo sviluppo di progetti di ricerca, con l’obiettivo di approfondire i meccanismi biologici delle patologie pediatriche e favorire l’innovazione diagnostica e terapeutica.

Il gruppo di ricerca opera nell’ambito delle scienze omiche, che mirano a studiare un sistema biologico attraverso un approccio onnicomprensivo. Tale approccio non si limita all’identificazione di un numero ristretto di analiti noti, ma si propone di rilevare il maggior numero possibile di molecole presenti nel campione, incluse quelle sconosciute, al fine di ottenere una visione globale dell’organismo. L’esigenza delle scienze omiche è quella di comprendere le variazioni molecolari che distinguono le condizioni fisiologiche da quelle patologiche, attraverso il confronto tra soggetti sani, pazienti affetti da patologia o sottoposti a specifici trattamenti farmacologici.

L’attività di ricerca è focalizzata sulla metabolomica e sulla proteomica, discipline omiche che studiano rispettivamente i metaboliti e le proteine di un sistema biologico. Nella presente tesi l’attenzione è rivolta all’ambito metabolomico. I metaboliti sono molecole a basso peso molecolare, generalmente con massa inferiore a 1000 Da, che possono derivare dall’espressione genetica, dai processi fisiologici o dall’interazione con fattori esterni. Essi svolgono un ruolo fondamentale nei sistemi biologici, in quanto rappresentano unità di base per la sintesi di strutture essenziali quali proteine, DNA, RNA e componenti della parete cellulare. Inoltre, i metaboliti sono elementi centrali del metabolismo, ossia dell’insieme dei processi biochimici che mantengono in vita le cellule, fornendo energia e partecipando ai meccanismi di regolazione e comunicazione cellulare. Il vantaggio della metabolomica rispetto alle altre scienze omiche risiede nel fatto che lo stato metabolico di un organismo risponde rapidamente a stimoli esterni o a condizioni patologiche, riflettendo precocemente le alterazioni del fenotipo, ossia l’insieme delle caratteristiche osservabili di un organismo, spesso prima che esse risultino evidenti a livello proteico [1].

La tecnica impiegata è la spettrometria di massa ad alta risoluzione accoppiata alla cromatografia liquida ad alte prestazioni, che consente di adottare un approccio untargeted, ovvero uno studio non mirato volto a rilevare e caratterizzare l'intero profilo metabolico di un campione, senza limitarsi a metaboliti predefiniti. Nella fase di identificazione, gli ioni precursori e i corrispondenti ioni frammento vengono confrontati con un database di spettri MS/MS di riferimento ottenuti da standard chimici puri, ovvero composti di struttura nota, che può quindi essere utilizzato per restringere le ipotesi sulla struttura dei composti.

Uno degli ostacoli degli studi di metabolomica riguarda proprio l'identificazione dei metaboliti, dovuta alla limitata disponibilità di librerie spettrali, sia private sia pubbliche [2]. Il metaboloma di un organismo comprende infatti un'enorme varietà di molecole, e i database attualmente disponibili non coprono tutte le classi chimiche né tutte le specie biologiche [3]. Un'ulteriore difficoltà deriva dalla scarsa reperibilità, o dall'elevato costo, dei composti di riferimento necessari alla costruzione delle librerie [4]. Inoltre, anche quando le librerie spettrali sono disponibili, esse risultano spesso incomplete per quanto riguarda informazioni sperimentali fondamentali, come le condizioni cromatografiche, le energie di collisione o i tempi di ritenzione, rendendo complesso il confronto diretto con i propri dati [2].

1.2. Sviluppo e acquisizione della libreria spettrale

Lo scopo del lavoro è stato quello di sviluppare una libreria spettrale interna di 340 analiti, acquisita mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione accoppiata alla cromatografia liquida ad alte prestazioni, utilizzando differenti modalità cromatografiche e di ionizzazione. Uno dei principali vantaggi derivanti dall'acquisizione di un database interno consiste nella possibilità di ottenere spettri perfettamente compatibili con gli strumenti e i metodi impiegati dal gruppo di ricerca [4], [5]. Nelle tecniche di ionizzazione soft, come quella utilizzata in questo studio, gli spettri di massa risultano infatti fortemente dipendenti da numerose variabili sperimentali, nonché dalle caratteristiche dell'interfaccia e dello strumento impiegato; di conseguenza, spettri acquisiti in condizioni o su piattaforme differenti possono presentare lievi ma significative differenze. L'utilizzo di una libreria spettrale interna consente pertanto di ridurre tali variabilità e di aumentare l'affidabilità del processo di identificazione. Inoltre, gli analiti identificati attraverso il confronto con una libreria spettrale di standard noti possono essere considerati con confidenza di identificazione di livello 1, il più elevato previsto dalle linee guida della Metabolomics Standards Initiative (MSI). Di seguito viene riportata la

classificazione dei livelli di confidenza nell'identificazione dei metaboliti, che distingue i diversi gradi di certezza in base alle evidenze sperimentali disponibili, dal livello più alto (livello 1) al più basso (livello 5) [6].

Tabella 1. Descrizione dei livelli di confidenza nell'identificazione dei metaboliti.

Livello	Descrizione
1 – Identificazione confermata	Il composto è stato identificato con certezza mediante confronto diretto con uno standard chimico puro analizzato nelle stesse condizioni sperimentali.
2 – Identificazione putativa	Il composto è associato a una possibile struttura sulla base di un buon match spettrale o di accuratezza di massa, ma senza conferma con standard.
3 – Classe chimica assegnata	L'analita è attribuito a una classe chimica sulla base di pattern di frammentazione o caratteristiche note, ma la struttura specifica non è definita.
4 – Feature sconosciuta	È nota solo la massa esatta o la formula empirica; nessuna informazione strutturale.
5 – Feature rilevata	Picco rilevato nel dataset, ma senza informazioni affidabili su massa o composizione.

1.3. Applicazione della libreria all'analisi di campioni reali

Nel presente lavoro, oltre allo sviluppo e alla costruzione della libreria spettrale, è stata valutata la sua applicabilità all'analisi di campioni reali, al fine di verificarne l'utilizzo in contesti sperimentali concreti. I campioni selezionati per il test della libreria spettrale sono stati campioni di plasma provenienti da uno studio metabolomico condotto su pazienti affetti dalla sindrome di Lesch-Nyhan (Lesch-Nyhan disease, LND), una rara malattia genetica ereditaria causata da un deficit completo dell'enzima ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi (HPRT). Questo enzima è coinvolto nella via di recupero delle

purine; la sua assenza determina un'alterazione del metabolismo delle basi puriniche con conseguente accumulo di acido urico [7]. La malattia si manifesta clinicamente con iperuricemia, ossia un aumento patologico dei livelli di acido urico nel sangue, che può portare a complicanze come calcolosi renale e artrite gottosa. Sono inoltre presenti gravi manifestazioni neurologiche, tra cui ritardo dello sviluppo cognitivo e coreoatetosi, un disturbo del movimento caratterizzato da movimenti involontari, irregolari e incontrollati che combinano componenti coreiche (rapide e brusche) e atetosiche (lente e contorte). Un ulteriore tratto distintivo della sindrome è la presenza di comportamenti autolesionistici [8].

L'obiettivo del gruppo di ricerca e del team clinico coinvolto è stato quello di approfondire i meccanismi fisiopatologici alla base delle alterazioni neurocomportamentali caratteristiche della sindrome di Lesch-Nyhan, con la finalità di migliorare la comprensione della malattia e contribuire allo sviluppo di strategie terapeutiche mirate. La metabolomica rappresenta uno strumento particolarmente utile in questo contesto, in quanto consente di analizzare in modo globale i metaboliti prodotti, consumati o convertiti nelle diverse vie metaboliche, fornendo una fotografia dello stato fisiologico dell'organismo. Nello specifico, lo studio prevede un'analisi metabolomica non mirata su campioni di plasma provenienti da una coorte di pazienti affetti da LND seguiti presso l'Istituto Giannina Gaslini. I profili metabolici ottenuti saranno confrontati con quelli di soggetti sani, al fine di comprendere come il deficit dell'enzima HPRT influenzi i processi metabolici cellulari. È inoltre previsto un confronto con campioni di pazienti affetti da paralisi cerebrale infantile (PCI), che presentano manifestazioni neurologiche in parte sovrapponibili alla LND, ma in assenza del difetto genetico specifico, al fine di valutare se le eventuali alterazioni metaboliche osservate siano peculiari della sindrome di Lesch-Nyhan oppure comuni anche ad altre condizioni neurologiche.

1.4. Preparazione dei campioni per analisi proteomica

Sebbene il presente lavoro sia stato principalmente incentrato sull'acquisizione delle librerie spettrali, l'attività svolta all'interno del gruppo di ricerca ha incluso anche l'esecuzione di protocolli di preparazione di campioni biologici per studi di proteomica, al fine di acquisire una visione complessiva del flusso di lavoro sperimentale di un'analisi clinica. Tuttavia, l'analisi statistica dei dati non è stata approfondita nel dettaglio in questa tesi, sebbene siano stati forniti accenni all'utilizzo dei software impiegati dal gruppo per l'elaborazione dei dati e le indagini statistiche, quali MS-DIAL, MS-FINDER e Perseus.

A titolo esemplificativo, nella presente tesi sono descritti due progetti sviluppati all'interno del gruppo di ricerca, con lo scopo di illustrare l'applicazione pratica dei protocolli e delle metodologie adottate.

1.4.1. Studio di proteomica su cellule Natural Killer

Il presente lavoro ha avuto come oggetto di studio le cellule Natural Killer (NK), una popolazione di linfociti appartenenti al sistema immunitario innato, coinvolta in una risposta di difesa immediata ma non specifica. Questo tipo di risposta si caratterizza per la rapidità d'azione e per l'assenza di un riconoscimento mirato di un singolo bersaglio, consentendo alle cellule NK di intervenire contro cellule infette o tumorali [9]. In particolare, sono stati caratterizzati due sottogruppi di cellule NK distinti in base all'espressione della proteina di superficie CD11c, utilizzata come marcatore cellulare. Le cellule che presentano CD11c sulla membrana sono indicate come CD11c⁺, mentre quelle che ne sono prive vengono definite CD11c⁻ [10]. L'obiettivo dello studio è valutare se questi due sottogruppi differiscano nella loro capacità di contrastare le cellule del carcinoma polmonare non a piccole cellule (non-small cell lung cancer, NSCLC). A tal fine, è stata condotta un'analisi dei profili proteomici delle cellule NK CD11c⁺ e CD11c⁻, con lo scopo di individuare eventuali differenze nella loro composizione molecolare.

1.4.2. Studio di proteomica su microvescicole

Il presente studio ha previsto un'analisi proteomica delle microvescicole isolate dal plasma di bambini nati prematuramente, esaminando campioni raccolti in diversi momenti postnatali negli stessi neonati. Questo approccio longitudinale consente di distinguere i normali processi di maturazione dalle alterazioni molecolari associate a condizioni di stress o malattia [11]. Tuttavia, la realizzazione di studi omici longitudinali nei neonati molto pretermine è resa complessa dalla limitata disponibilità di campione, da considerazioni etiche e dalla necessità di adottare procedure di prelievo minimamente invasive. In tale contesto, le vescicole extracellulari (EVs) rappresentano una promettente fonte di informazioni sullo stato biologico neonatale, poiché possono essere isolate dal plasma mediante prelievi poco invasivi [12]. Le EVs sono piccole strutture delimitate da membrana, rilasciate dalla maggior parte delle cellule, che trasportano proteine e lipidi riflettendo le condizioni fisiologiche della cellula di origine [13], [14].

1.5. Stato dell'arte

Negli ultimi anni, la metabolomica basata su spettrometria di massa ad alta risoluzione accoppiata alla cromatografia liquida si è affermata come uno degli strumenti più potenti per lo studio sistemico dei metaboliti presenti nei sistemi biologici. Questo approccio consente di rilevare simultaneamente centinaia o migliaia di piccole molecole, fornendo una fotografia dello stato metabolico di cellule, tessuti o fluidi biologici. In particolare, le strategie untargeted permettono di acquisire dati senza una selezione preliminare degli analiti, risultando particolarmente utili negli studi esplorativi e nella scoperta di biomarcatori [6].

Nonostante i notevoli progressi tecnologici, l'identificazione dei metaboliti rappresenta ancora una delle principali sfide della metabolomica. A differenza delle proteine, che possono essere ricostruite a partire da sequenze peptidiche prevedibili, le piccole molecole mostrano un'elevata diversità strutturale e spesso generano pattern di frammentazione complessi o non univoci. Inoltre, un singolo segnale può corrispondere a più strutture chimiche candidate oppure non trovare corrispondenza nei database disponibili [6]. Per ottenere identificazioni affidabili è quindi necessario integrare diverse informazioni sperimentali, tra cui massa esatta, pattern di frammentazione MS/MS e tempo di ritenzione cromatografico.

In questo contesto, le librerie spettrali rappresentano uno strumento fondamentale per l'annotazione dei metaboliti. L'importanza delle librerie spettrali nella metabolomica moderna è ampiamente riconosciuta dalla comunità scientifica, poiché esse rappresentano un archivio strutturato della conoscenza metabolica condivisa. Librerie curate e ben documentate permettono di migliorare l'accuratezza delle identificazioni e di ridurre l'ambiguità nell'annotazione dei dati [2]. Tuttavia, la qualità e l'affidabilità delle librerie dipendono dalla completezza delle informazioni contenute, dalla corretta annotazione degli spettri e dalla documentazione delle condizioni sperimentali utilizzate per l'acquisizione.

Numerosi database pubblici sono attualmente disponibili e forniscono raccolte estese di spettri di riferimento. Tra questi, librerie sviluppate su piattaforme Orbitrap ad alta risoluzione hanno significativamente ampliato la copertura metabolica disponibile per l'identificazione [15]. Tuttavia, l'utilizzo esclusivo di database pubblici presenta alcune limitazioni. Gli spettri di frammentazione possono variare in funzione dello strumento, della sorgente di ionizzazione, dell'energia di collisione e delle condizioni cromatografiche impiegate; di conseguenza, differenze metodologiche possono ridurre la

comparabilità tra spettri di riferimento e dati sperimentali [16]. Per questo motivo, la costruzione di librerie spettrali interne rappresenta una strategia di grande interesse. Librerie acquisite utilizzando la stessa piattaforma strumentale e le stesse condizioni analitiche impiegate per l'analisi dei campioni garantiscono una maggiore compatibilità spettrale e un miglioramento dell'affidabilità delle identificazioni. Inoltre, librerie personalizzate consentono di includere composti di interesse specifico e di adattare il database alle esigenze del laboratorio o dello studio clinico.

Un ulteriore aspetto critico riguarda la qualità dei dati contenuti nelle librerie. Raccolte curate e validate permettono identificazioni robuste, mentre librerie meno controllate possono aumentare il rischio di falsi positivi o annotazioni errate. La comunità scientifica sottolinea quindi la necessità di sviluppare librerie di alta qualità, costantemente aggiornate e corredate da metadati completi, al fine di garantire l'affidabilità e la condivisione delle informazioni metabolomiche [2].

Negli ultimi anni sono stati sviluppati strumenti software dedicati alla gestione e all'utilizzo delle librerie spettrali, come piattaforme per la creazione, l'annotazione e la condivisione di spettri MS/MS, tra cui mzVault, MetaPro e MSⁿLib [16], [17], [18]. Questi strumenti facilitano l'integrazione dei dati, la validazione delle identificazioni e la diffusione delle librerie all'interno della comunità scientifica.

Nel complesso, l'integrazione tra dati LC-MS ad alta risoluzione e librerie spettrali curate rappresenta oggi una strategia chiave per migliorare l'identificazione dei metaboliti e rendere la metabolomica uno strumento sempre più affidabile per applicazioni biologiche e cliniche. In questo contesto, lo sviluppo di librerie spettrali interne e altamente curate costituisce un passo fondamentale per aumentare l'accuratezza delle annotazioni e per valorizzare il potenziale informativo dei dati metabolomici.

2. TECNICHE ANALITICHE

Lo strumento utilizzato per l'acquisizione della libreria spettrale è lo spettrometro di massa *Thermo Scientific Orbitrap Fusion* accoppiato al cromatografo *Thermo Scientific Vanquish Horizon*.



Figura 1. Strumentazione impiegata per l'analisi: cromatografo (a sinistra) e spettrometro (a destra).

2.1. Cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC)

La cromatografia è una tecnica di separazione basata sulla diversa interazione dei componenti di una miscela con una fase stazionaria e una fase mobile. Durante il processo cromatografico, gli analiti si distribuiscono in modo differente tra le due fasi in funzione delle loro proprietà chimico-fisiche, instaurando un equilibrio dinamico che determina velocità di migrazione diverse e, di conseguenza, tempi di ritenzione caratteristici. L'efficienza della separazione dipende da diversi parametri, tra cui la natura chimica della fase stazionaria, la composizione della fase mobile, il flusso e la temperatura della colonna. La possibilità di modulare tali parametri, ad esempio mediante l'impiego di gradienti di eluizione, consente di migliorare la risoluzione tra gli analiti e di affrontare l'analisi di miscele complesse contenenti composti con differenti caratteristiche di polarità.

La cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) rappresenta un'evoluzione della cromatografia liquida convenzionale, caratterizzata dall'impiego di fasi stazionarie costituite da particelle di dimensioni

micrometriche, significativamente più piccole rispetto a quelle utilizzate nei sistemi cromatografici tradizionali. La riduzione della dimensione delle particelle comporta un aumento dell'area superficiale disponibile per le interazioni analita-fase stazionaria e una diminuzione dei fenomeni di diffusione, con un conseguente miglioramento dell'efficienza e della risoluzione cromatografica. L'utilizzo di particelle di piccole dimensioni richiede l'impiego di sistemi in grado di operare ad alte pressioni, necessarie per garantire un flusso adeguato della fase mobile attraverso la colonna. In cambio, l'HPLC consente di ottenere separazioni più rapide, picchi più stretti e una maggiore riproducibilità rispetto alla cromatografia liquida classica, rendendola particolarmente adatta all'analisi quantitativa e qualitativa di miscele complesse e al successivo accoppiamento con tecniche di rivelazione avanzate.

2.1.1. Colonne cromatografiche

Nell'ambito delle analisi cromatografiche, la scelta della colonna riveste un ruolo fondamentale per la separazione dei composti in funzione delle loro caratteristiche chimico-fisiche. Diverse tipologie di colonne cromatografiche si basano su differenti meccanismi di ritenzione, permettendo di separare selettivamente molecole con polarità, dimensioni e interazioni differenti con la fase stazionaria. Tra le più comuni, le colonne a fase inversa C18 e le colonne a interazione idrofila (HILIC) rappresentano approcci complementari, ampiamente utilizzati per l'analisi di composti con differenti proprietà di polarità.

2.1.1.1. Colonna C18

Le colonne C18 rappresentano una delle fasi stazionarie più comunemente utilizzate nella cromatografia liquida a fase inversa (reversed-phase liquid chromatography, RP-LC). La fase stazionaria è costituita da particelle di silice funzionalizzate con catene alchiliche lineari a 18 atomi di carbonio, che conferiscono alla superficie un carattere fortemente idrofobico. Il meccanismo di separazione si basa prevalentemente su interazioni idrofobiche tra gli analiti e la fase stazionaria: composti meno polari mostrano una maggiore affinità per la fase C18 e vengono quindi trattenuti più a lungo, mentre molecole più polari eluiscono più rapidamente.

La fase mobile impiegata in cromatografia a fase inversa è generalmente costituita da una miscela di solvente acquoso e solvente organico miscibile con l'acqua, come

acetonitrile o metanolo, spesso addizionati con modificatori di pH o agenti ionizzanti. Variando la composizione della fase mobile, in particolare aumentando la percentuale di solvente organico, è possibile modulare la forza eluente e ottenere una separazione efficiente di un'ampia gamma di composti, in particolare molecole apolari o moderatamente polari. Grazie alla sua elevata robustezza, riproducibilità e versatilità, la fase stazionaria C18 è ampiamente utilizzata in numerose applicazioni analitiche, incluse analisi metabolomiche e biochimiche.

2.1.1.2. Colonna HILIC

Le colonne HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) rappresentano una valida alternativa alla cromatografia a fase inversa per la separazione di composti fortemente polari, che in RP-LC tendono a eluire con il volume morto a causa della scarsa interazione con la fase stazionaria idrofobica. La tecnica HILIC è stata sviluppata per superare i limiti della cromatografia a fase normale, mantenendone la capacità di ritenzione per molecole polari ma utilizzando fasi mobili compatibili con la spettrometria di massa, tipicamente miscele di acqua e acetonitrile ad alta percentuale di solvente organico.

La fase stazionaria HILIC è di natura polare e può essere costituita da silice nuda o da supporti funzionalizzati con gruppi polari, quali gruppi diolici, amminici, ammidici o zwitterionici. Il meccanismo di ritenzione si basa principalmente sulla formazione di uno strato arricchito in acqua sulla superficie della fase stazionaria, mentre la fase mobile risulta relativamente povera di acqua. In queste condizioni si instaura un sistema di ripartizione liquido/liquido, in cui gli analiti si distribuiscono tra lo strato acquoso associato alla fase stazionaria e la fase mobile ricca in solvente organico. I composti più polari mostrano una maggiore affinità per lo strato acquoso e risultano quindi maggiormente ritenuti, mentre quelli meno polari eluiscono a tempi di ritenzione più brevi.

Oltre al meccanismo di ripartizione, in HILIC possono contribuire alla ritenzione ulteriori interazioni, quali legami a idrogeno ed interazioni elettrostatiche, la cui entità dipende dalla natura della fase stazionaria e dalle caratteristiche chimiche degli analiti. Per questo motivo, la HILIC viene considerata una tecnica di separazione multimodale. L'elevata percentuale di solvente organico nella fase mobile rende inoltre la HILIC particolarmente adatta all'accoppiamento con la spettrometria di massa, garantendo una

ionizzazione più efficiente in sorgente elettrospray rispetto alla cromatografia a fase inversa, soprattutto per analiti polari.

2.2. Spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS)

La spettrometria di massa è una tecnica analitica che consente l'identificazione e la caratterizzazione delle specie chimiche in base al loro rapporto massa/carica (m/z). Il processo analitico prevede la conversione delle molecole neutre in ioni, la loro separazione in funzione del rapporto m/z all'interno di un analizzatore di massa e la successiva rivelazione. L'intensità del segnale associato a ciascun ione fornisce informazioni sulla sua abbondanza relativa, mentre la posizione del segnale nello spettro consente la determinazione del valore di m/z .

La spettrometria di massa ad alta risoluzione (High-Resolution Mass Spectrometry, HRMS) rappresenta un'evoluzione della spettrometria di massa convenzionale ed è caratterizzata da un'elevata risoluzione, definita come la capacità dell'analizzatore di massa, e quindi dello spettrometro, di distinguere tra ioni con valori di m/z differenti, anche molto vicini tra loro, e da un'elevata accuratezza di massa.

La risoluzione può essere definita formalmente come:

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad (1)$$

dove m è il valore di m/z dello ione considerato e Δm rappresenta la minima differenza di m/z tra due segnali distinguibili. In spettrometria di massa esistono due definizioni operative di Δm . La più comunemente utilizzata è quella secondo la quale due picchi sono considerati risolti se l'intensità della valle tra di essi non supera il 10% dell'altezza dei picchi stessi. In questo caso, Δm è la distanza in m/z tra i due picchi che soddisfano tale condizione.

Una seconda definizione utilizza la larghezza del picco a metà altezza (Full Width at Half Maximum, FWHM), considerando Δm come la larghezza del picco misurata al 50% dell'intensità massima. Entrambe le definizioni forniscono un valore di risoluzione che è un numero puro, sebbene i risultati possano differire leggermente a seconda del criterio adottato. Poiché la risoluzione dipende dal valore di m a cui viene calcolata, essa non è una proprietà assoluta dello strumento ma varia con la massa considerata.

L'accuratezza di massa, invece, esprime lo scostamento tra la massa misurata e quella teorica ed è generalmente riportata in parti per milione (ppm) secondo la relazione:

$$\text{errore di massa (ppm)} = \frac{m_{\text{misurata}} - m_{\text{teorica}}}{m_{\text{teorica}}} \cdot 10^6 \quad (2)$$

dove m_{misurata} rappresenta il valore di m/z ottenuto sperimentalmente in laboratorio, mentre m_{teorica} corrisponde al valore di m/z teorico calcolato per la specie ionica considerata.

Negli strumenti HRMS, le elevate risoluzioni, che possono raggiungere valori dell'ordine di decine o centinaia di migliaia, unite a errori di massa molto ridotti, generalmente nell'intervallo di pochi ppm o inferiori, consentono la determinazione accurata della massa degli analiti e la distinzione tra specie isobare o quasi-isobare. Questo livello di prestazioni permette di ridurre significativamente il numero di formule molecolari candidate associabili a un segnale e di aumentare la confidenza nell'identificazione delle specie analizzate, anche in matrici complesse.

Oltre all'elevata risoluzione e accuratezza di massa, un ulteriore vantaggio della spettrometria di massa moderna risiede nella possibilità di effettuare esperimenti di spettrometria di massa tandem (MS/MS). In tali esperimenti, uno ione precursore selezionato viene sottoposto a frammentazione controllata, generando uno spettro di ioni figli che fornisce informazioni strutturali aggiuntive. L'integrazione di dati di massa esatta e di frammentazione consente di aumentare significativamente la confidenza nell'identificazione degli analiti, risultando particolarmente utile nell'analisi di miscele complesse e in approcci non mirati.

2.2.1. Orbitrap Fusion

L'*Orbitrap Fusion* è caratterizzato da un'architettura ibrida che integra tre analizzatori di massa: un quadrupolo, una trappola ionica lineare e un analizzatore Orbitrap. Tale configurazione consente di ottenere elevate prestazioni in termini di selettività, sensibilità, risoluzione e accuratezza di massa.

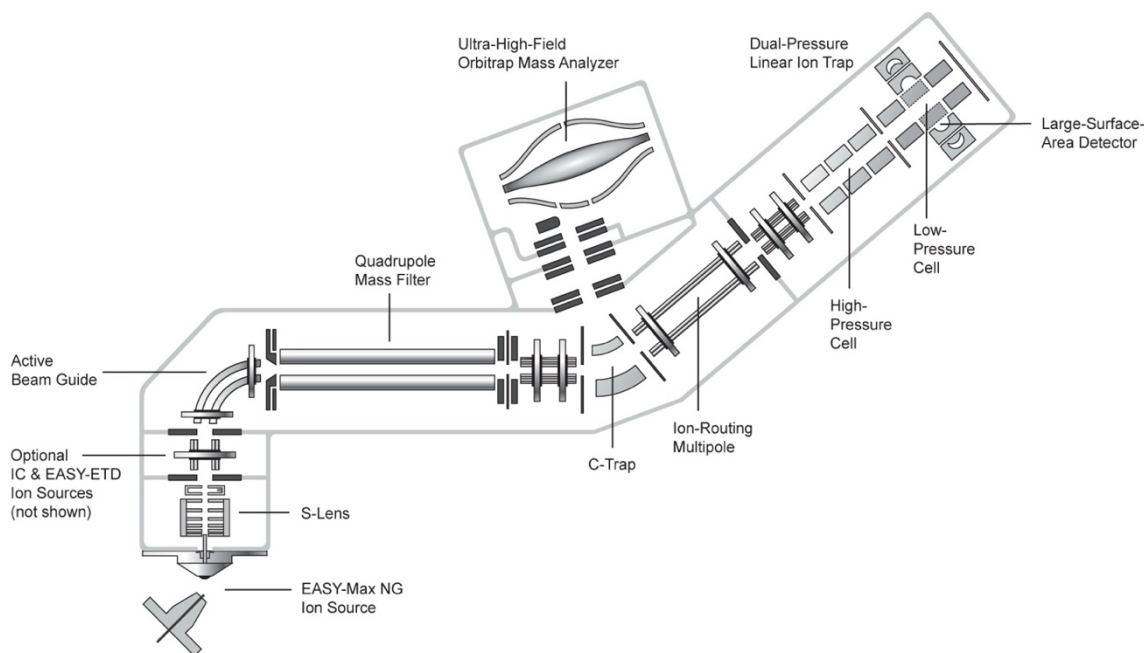


Figura 2. Rappresentazione schematica dell'Orbitrap Fusion.

La figura mostra il percorso degli ioni dal momento in cui vengono ionizzati a quando vengono rilevati tramite un'analisi con *Orbitrap Fusion*.

2.2.1.1. Sorgente di ionizzazione

La ionizzazione ha luogo a livello della sorgente EASY-Max NG Ion Source, appartenente alla classe delle sorgenti API (Atmospheric Pressure Ionization). Tale sistema opera la conversione delle specie molecolari neutre in ioni a pressione atmosferica, fungendo da interfaccia per il trasferimento degli ioni verso le regioni ad alto vuoto dello spettrometro di massa.

Nello specifico, la sorgente EASY-Max NG opera secondo il principio della Heated Electrospray Ionization (H-ESI), una variante della tecnica ESI in cui il processo di ionizzazione è assistito termicamente. Il meccanismo si basa sull'applicazione di un elevato potenziale elettrostatico a una soluzione liquida che fluisce attraverso un capillare; l'azione del campo elettrico induce la nebulizzazione della soluzione e la formazione di un aerosol di goccioline altamente cariche. Il riscaldamento del capillare e del gas ausiliario favorisce una desolvatazione più efficiente delle goccioline e il progressivo rilascio degli ioni in fase gassosa, che vengono successivamente convogliati verso l'ottica ionica dello strumento.

L'ESI è una tecnica di ionizzazione soft, che preserva l'integrità della molecola precursore e genera prevalentemente ioni pseudomolecolari; per questo motivo, l'ottenimento di informazioni strutturali richiede l'impiego di esperimenti di frammentazione (MS/MS). Il principale vantaggio di questa tecnica risiede nella sua elevata compatibilità con i sistemi di separazione in fase liquida, rendendola particolarmente adatta all'analisi di miscele complesse mediante LC-MS.

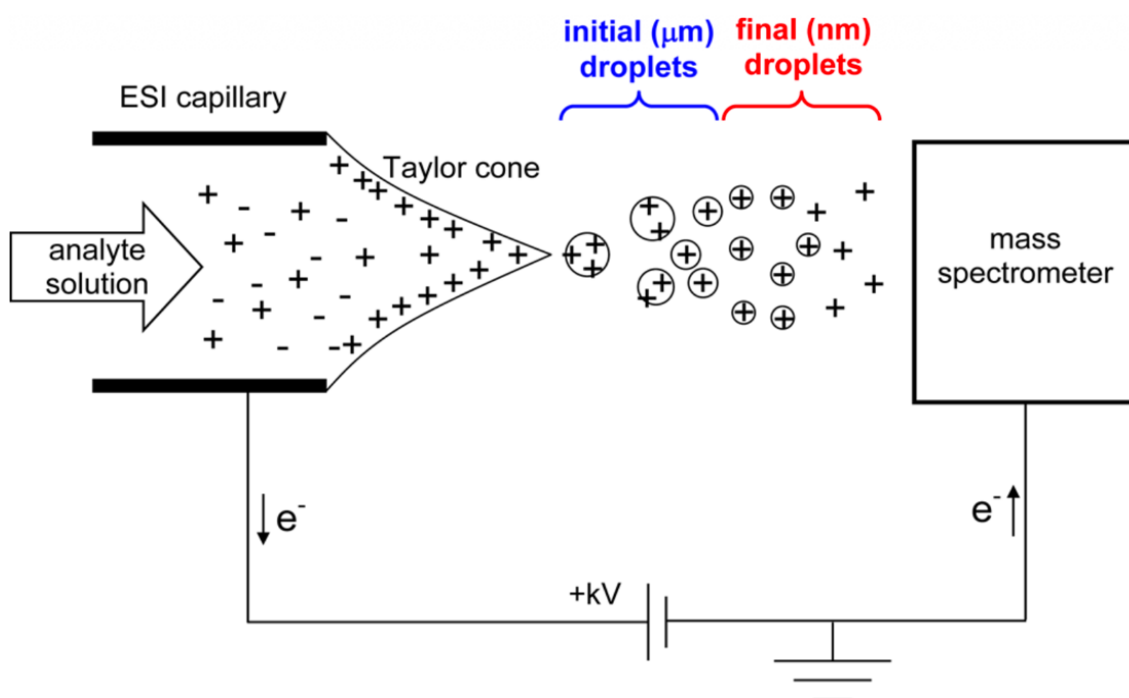


Figura 3. Rappresentazione schematica di una sorgente ESI in modalità ioni positivi [19].

2.2.1.2. S-Lens

Successivamente alla formazione, gli ioni vengono focalizzati dal sistema S-Lens. Il suo scopo principale è convogliare e concentrare gli ioni provenienti dalla sorgente verso le regioni ad alto vuoto dello spettrometro, massimizzando la trasmissione e minimizzando la perdita ionica. Il sistema S-Lens, posizionato subito dopo la sorgente, è costituito da una serie di elettrodi circolari disposti in sequenza, ai quali viene applicato un campo di radiofrequenza (RF) a fasi alternate. Tale configurazione genera un campo radiale oscillante che guida gli ioni lungo l'asse del sistema.

2.2.1.3. Active Beam Guide

Il fascio ionico entra quindi nell'Active Beam Guide, un multipolo RF operante a pressione intermedia. Le sue funzioni sono quelle di guidare gli ioni verso il quadrupolo, rimuovere le particelle neutre e stabilizzare il fascio ionico prima dell'ingresso nell'analizzatore. Le molecole non ionizzate, non rispondendo ai campi RF, vengono estratte tramite le pompe da vuoto. Questo sistema garantisce quindi una trasmissione più efficiente verso il quadrupolo, una riduzione del rumore di fondo e una diminuzione del rischio di contaminazione della strumentazione.

2.2.1.4. Quadrupolo

Gli ioni così focalizzati vengono introdotti nel quadrupolo, un analizzatore costituito da quattro barre metalliche parallele, alle quali viene applicata simultaneamente una differenza di potenziale continuo (DC) e un potenziale alternato a radiofrequenza (RF).

Il potenziale continuo divide le quattro barre in due coppie, una mediamente positiva e una mediamente negativa, mentre il potenziale alternato, che oscilla rapidamente, induce un moto oscillatorio degli ioni.

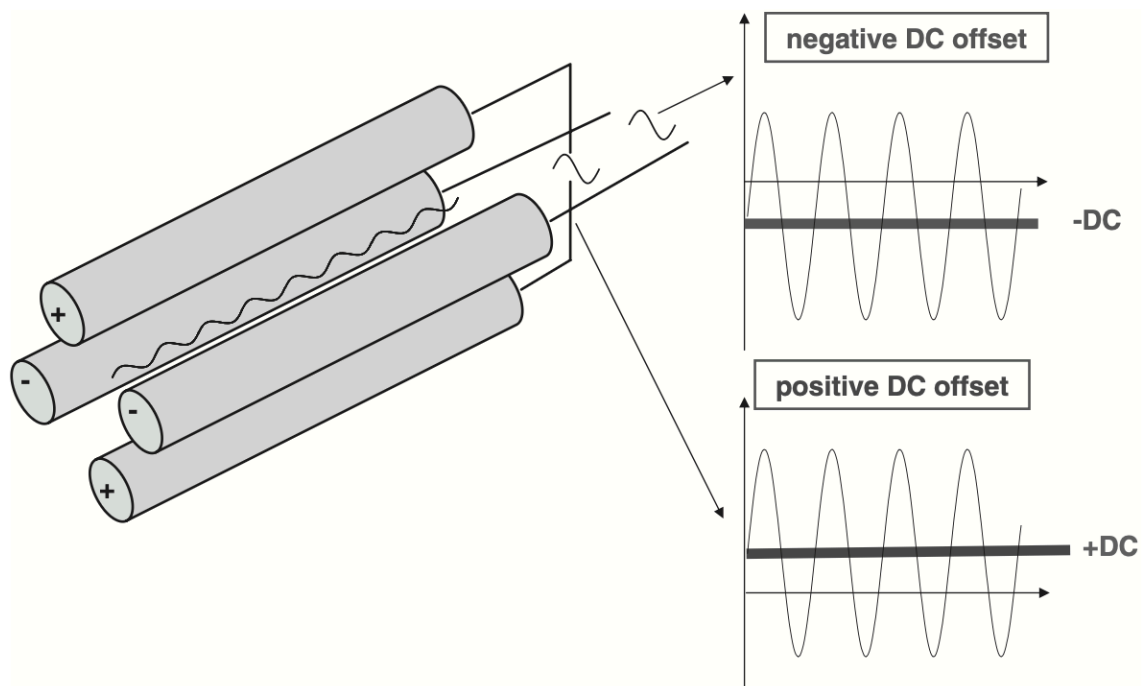


Figura 4. Rappresentazione schematica del quadrupolo [20].

Il potenziale risultante, assumendo una geometria ideale delle barre di tipo iperbolico, è descritto dall'espressione:

$$\phi_0 = U - V \cos \omega t \quad (3)$$

dove ϕ_0 rappresenta il potenziale applicato alle barre, U il potenziale continuo, V l'ampiezza del potenziale alternato, ω la frequenza angolare e t il tempo.

Gli ioni che entrano nel quadrupolo mantengono la loro velocità lungo l'asse z, corrispondente all'asse di volo, ma sono soggetti ad accelerazioni sugli assi trasversali x e y, descritte rispettivamente dalle equazioni:

$$F_x = ma = m \frac{d^2x}{dt^2} \quad (4)$$

$$F_y = ma = m \frac{d^2y}{dt^2} \quad (5)$$

La forza (F) esercitata su una particella carica è data dalla relazione:

$$F = qE = -zeE \quad (6)$$

dove E rappresenta il campo elettrico e q la carica della particella, pari al numero di cariche dello ione (z) moltiplicato per la carica dell'elettrone (e).

Poiché l'entità del campo elettrico all'interno del quadrupolo è spazio-dipendente, ovvero varia in funzione della distanza della particella dalle barre, essa può essere espressa come derivata parziale del potenziale rispetto alle coordinate spaziali. Si ottiene pertanto:

$$F_x = ma = m \frac{d^2x}{dt^2} = -ze \frac{\delta \phi}{\delta x} \quad (7)$$

$$F_y = ma = m \frac{d^2y}{dt^2} = -ze \frac{\delta \phi}{\delta y} \quad (8)$$

Introducendo opportune variabili adimensionali, è possibile ricondurre le equazioni del moto degli ioni a una forma più compatta e generale. In particolare, ponendo:

$$u = x \text{ o } y \quad (9)$$

$$\xi = \frac{\omega t}{2} \quad (10)$$

e definendo i parametri adimensionali:

$$a_u = \frac{8zeU}{mr_0^2\omega^2} \quad (11)$$

$$q_u = \frac{4zeV}{mr_0^2\omega^2} \quad (12)$$

le equazioni del moto lungo i due assi trasversali possono essere espresse nella forma dell'equazione differenziale di Mathieu:

$$\frac{d^2u}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\xi)u = 0 \quad (13)$$

Per un dato quadrupolo, il parametro r_0 , che rappresenta la distanza tra la superficie delle barre e l'asse centrale, è costante, così come la frequenza angolare ω , che viene fissata in fase di progettazione dello strumento. Ne consegue che i parametri a_u e q_u dipendono esclusivamente dal rapporto m/z dello ione e dai potenziali applicati, rendendo U e V le uniche variabili operative del sistema.

Le soluzioni dell'equazione di Mathieu mostrano che solo determinate combinazioni dei parametri a_u e q_u danno luogo a traiettorie stabili. Tali combinazioni definiscono le cosiddette zone di stabilità, all'interno delle quali lo ione, pur oscillando nei piani trasversali, mantiene un'oscillazione limitata che gli consente di attraversare il quadrupolo senza collidere con le barre. Al contrario, al di fuori di queste regioni l'ampiezza dell'oscillazione cresce progressivamente fino a determinare la perdita dello ione per collisione con una delle barre.

Le zone di stabilità sono diverse per ciascun piano trasversale (x e y) e presentano una forma caratteristica a cuspidi. Affinché uno ione possa attraversare il quadrupolo, è necessario che la sua traiettoria sia stabile simultaneamente in entrambi i piani. La selezione di massa avviene quindi nella regione di sovrapposizione delle zone di stabilità relative a x e y , che definisce una finestra operativa ben delimitata.

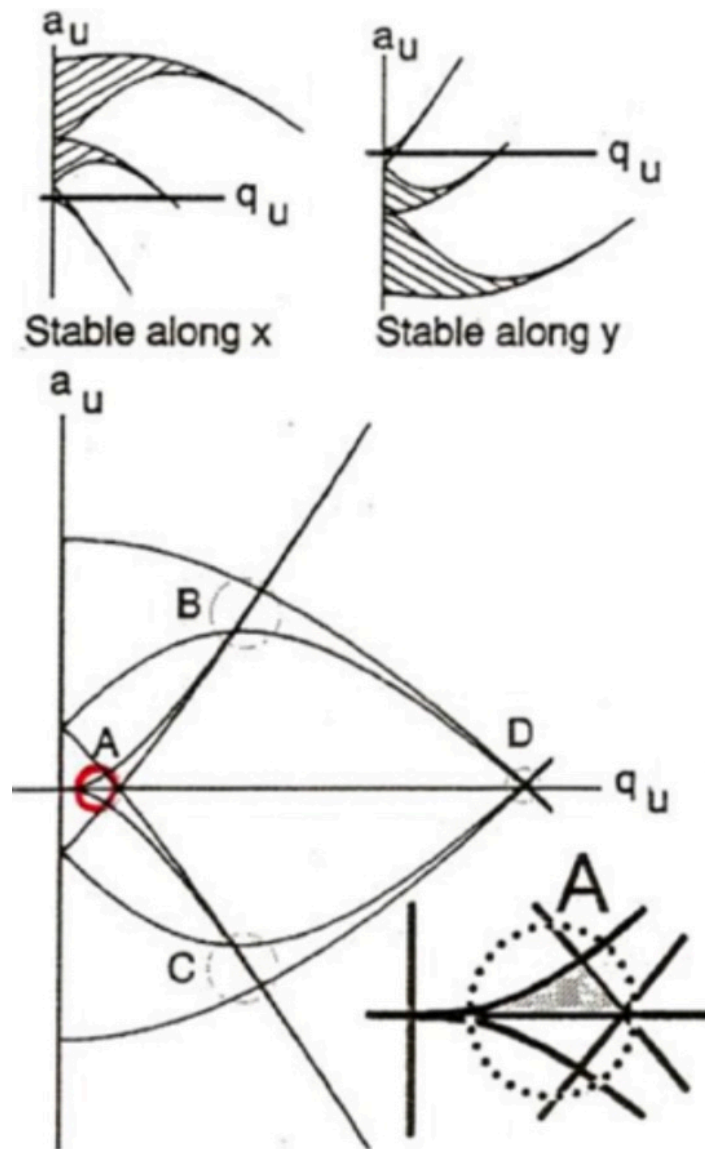


Figura 5. Zone di stabilità descritte dall'equazione di Mathieu lungo gli assi x e y (in alto) e la loro sovrapposizione (in basso).

Nel funzionamento pratico del quadrupolo, i potenziali continuo e alternato vengono fatti variare simultaneamente mantenendo costante il loro rapporto (U/V). In queste condizioni, il sistema opera lungo una retta nel diagramma (a, q) , detta “operating line”, che intercetta selettivamente le zone di stabilità associate ai diversi rapporti m/z , consentendo la trasmissione di uno ione per volta e la costruzione dello spettro di massa.

Come mostrato in Figura 6, l'estensione dell'area di stabilità aumenta all'aumentare della massa dello ione.

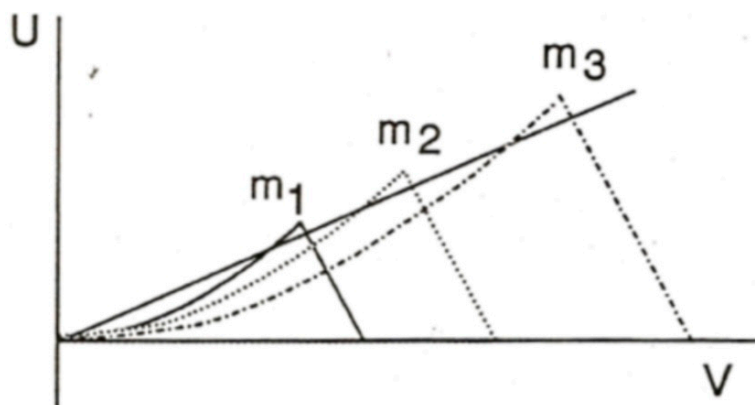


Figura 6. Aree di stabilità per ioni di diversa massa nel diagramma (U , V).

La pendenza della operating line determina il compromesso tra sensibilità e potere risolutivo: una pendenza minore favorisce una maggiore sensibilità, mentre una pendenza maggiore migliora la risoluzione a scapito dell'intensità del segnale. A causa della sovrapposizione delle zone di stabilità per masse vicine, il quadrupolo presenta una risoluzione intrinsecamente limitata all'unità di massa, risultando tuttavia estremamente efficiente come filtro rapido e selettivo.

2.2.1.5. C-Trap

Gli ioni trasmessi dal quadrupolo vengono convogliati nella C-Trap, una trappola ionica a geometria toroidale aperta che consente l'ingresso degli ioni da un lato, il loro accumulo nella regione centrale e il successivo rilascio verso l'Orbitrap o l'Ion Trap.

L'accumulo degli ioni avviene tramite l'applicazione combinata di potenziali continui e a radiofrequenza e ha lo scopo di uniformarne l'energia cinetica e di regolare la quantità totale di ioni raccolti attraverso il sistema di Automatic Gain Control (AGC). L'AGC è un meccanismo che regola automaticamente il numero di ioni da accumulare nella C-Trap: mediante un pre-scan, lo strumento stima la densità ionica in arrivo e modula il tempo di accumulo fino al raggiungimento di un numero prefissato di ioni (AGC target), garantendo l'acquisizione di spettri riproducibili.

Un numero eccessivo di ioni accumulati (overfilling) provoca repulsioni coulombiane all'interno della nuvola ionica, alterando l'energia e la traiettoria degli ioni. Questo

fenomeno determina una perdita di coerenza nelle oscillazioni all'interno dell'Orbitrap, con conseguente allargamento dei picchi e riduzione della risoluzione. Al contrario, un numero insufficiente di ioni (underfilling) comporta una diminuzione del rapporto segnale/rumore e, di conseguenza, della sensibilità analitica.

Al termine della fase di accumulo, gli ioni vengono concentrati verso una regione centrale più ristretta mediante l'applicazione di potenziali RF, al fine di ottenere un pacchetto ionico compatto e spazialmente omogeneo. Questo processo consente di ottimizzare l'efficienza di iniezione nell'analizzatore di massa e di migliorare la risoluzione e la riproducibilità delle misure.

2.2.1.6. Ion Routing Multipole (IRM)

L'Ion Routing Multipole (IRM) è uno stadio di instradamento ionico del sistema Orbitrap Fusion, posizionato tra la C-Trap e gli analizzatori di massa, che svolge un ruolo chiave nella gestione del fascio ionico. Si tratta di un multipolo a radiofrequenza operante a pressione intermedia, progettato per guidare efficientemente il pacchetto ionico verso l'analizzatore selezionato dal metodo.

Oltre alla funzione di trasmissione, l'IRM agisce come cella di frammentazione collisionale ad alta energia (Higher-energy Collisional Dissociation - HCD): gli ioni vengono accelerati e fatti collidere con un gas inerte, generalmente azoto, trasferendo rapidamente energia interna e generando un ampio spettro di frammenti, in particolare a bassa massa.

Grazie alla sua posizione strategica e alla flessibilità operativa, l'IRM consente di separare spazialmente le fasi di accumulo, frammentazione e analisi. Ciò consente l'acquisizione parallela dei dati e contribuisce a migliorare le prestazioni complessive dello strumento in termini di velocità, sensibilità e versatilità analitica.

2.2.1.7. Dual-Pressure Linear Ion Trap

Successivamente all'Ion Routing Multipole, il pacchetto ionico può essere indirizzato verso uno dei due analizzatori di massa disponibili nello strumento. In particolare, una frazione degli ioni può essere trasferita nella Dual-Pressure Linear Ion Trap, utilizzata per l'isolamento dei precursori, la scansione rapida degli ioni e la loro frammentazione in

modalità CID (Collision-Induced Dissociation). In questa modalità, gli ioni vengono confinati nella trappola e sottoposti a un'eccitazione risonante che favorisce collisioni con il gas presente, inducendo la dissociazione del precursore attraverso la rottura di legami più labili rispetto a quelli coinvolti nella frammentazione HCD.

Questa trappola è suddivisa in due zone distinte, mantenute a pressioni differenti di gas di collisione, solitamente elio, per ottimizzare le diverse fasi dell'analisi:

1. Zona ad alta pressione: gli ioni in ingresso vengono raffreddati termicamente attraverso collisioni con l'elio, riducendone l'energia cinetica e favorendo un confinamento più efficiente al centro della trappola. Questa zona è ideale per l'isolamento dei precursori e per la loro frammentazione.
2. Zona a bassa pressione: gli ioni vengono poi trasferiti in questa seconda sezione per la fase di analisi. La pressione ridotta minimizza le collisioni indesiderate durante l'espulsione, garantendo una migliore risoluzione della massa e una scansione più rapida.

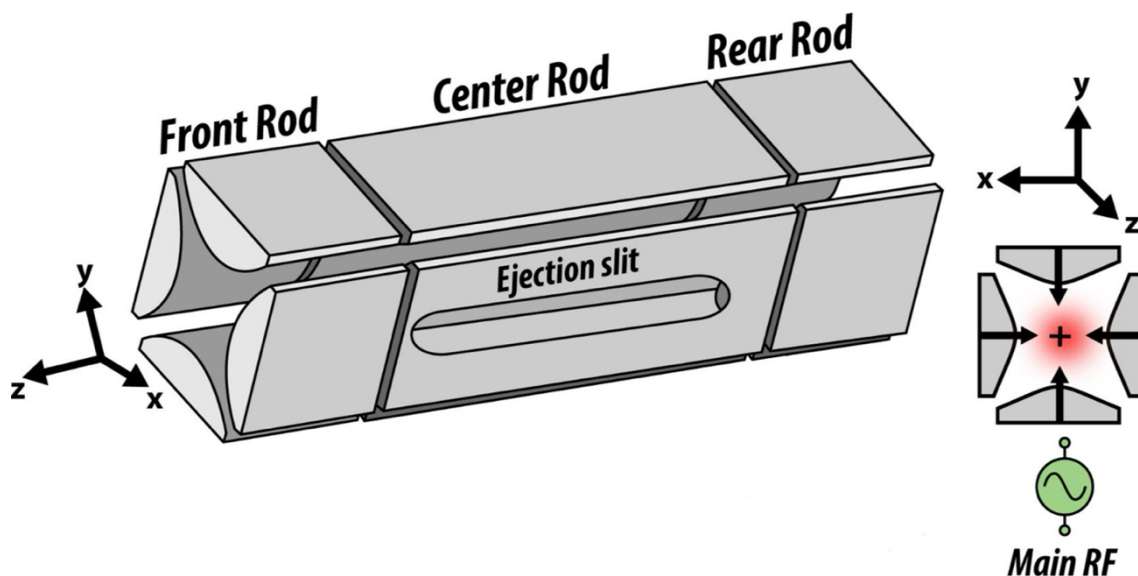


Figura 7. Rappresentazione schematica della trappola ionica lineare [21].

La struttura della Linear Ion Trap (LIT) all'interno di queste zone è costituita da quattro barre elettrodiche parallele, la cui geometria permette di generare un campo quadrupolare bidimensionale. L'applicazione del potenziale alternato a coppie di elettrodi opposti determina un confinamento radiale degli ioni nel piano x-y. A differenza della trappola ionica tridimensionale, il campo RF della LIT non esercita alcun confinamento nella direzione assiale: per questo motivo, il confinamento lungo z è ottenuto applicando

potenziali statici agli elettrodi terminali. Questa separazione tra confinamento radiale (RF) e assiale (DC) consente agli ioni di distribuirsi lungo la lunghezza della trappola, aumentando significativamente la capacità di accumulo e riducendo gli effetti di spazio di carica.

L'espulsione dalla trappola avviene mediante resonance ejection: oltre alla RF principale, viene applicata una tensione alternata supplementare (AC) ai due elettrodi dotati di fessure di uscita (exit rods). Quando la frequenza di questa eccitazione coincide con la frequenza secolare caratteristica di uno ione, si instaura una condizione di risonanza: lo ione assorbe energia, aumenta la sua ampiezza di oscillazione radiale e viene espulso dalla trappola.

La scansione di massa è realizzata incrementando progressivamente il voltaggio a radiofrequenza nel tempo. Poiché gli ioni con rapporto massa/carica minore sono più sensibili all'incremento del campo quadrupolare, sono i primi a raggiungere la condizione critica di risonanza. Di conseguenza, aumentando progressivamente il potenziale alternato si ottiene un'espulsione in ordine crescente di m/z [22].

2.2.1.8. Orbitrap

In alternativa alla Ion Trap, il sistema Orbitrap Fusion impiega l'Orbitrap come analizzatore di massa ad alta risoluzione, basato sull'intrappolamento elettrostatico degli ioni e sulla misura delle loro frequenze di oscillazione.

La trappola orbitale è costituita da due elettrodi concentrici: un elettrodo centrale a forma di fuso e un elettrodo esterno a geometria cilindrica, suddiviso in due semigusci elettricamente isolati da un anello di ceramica. Gli ioni vengono iniettati nella trappola attraverso un'apertura situata in corrispondenza dell'anello isolante e, una volta all'interno, si muovono lungo traiettorie elicoidali attorno all'elettrodo centrale. Il moto ionico è il risultato della combinazione di un movimento orbitale radiale e di un'oscillazione assiale lungo l'asse del sistema. La frequenza di oscillazione assiale dipende esclusivamente dal rapporto massa/carica (m/z) degli ioni ed è indipendente dalla loro energia cinetica iniziale, caratteristica che contribuisce all'elevata accuratezza di massa dello strumento. Ioni con m/z più basso oscillano a frequenze più elevate e con traiettorie più vicine all'elettrodo centrale, mentre ioni con m/z maggiore presentano oscillazioni più lente e orbite più distanti. Il movimento coerente dei pacchetti ionici induce una corrente di immagine sugli elettrodi esterni, generando un segnale nel dominio

del tempo. Questo segnale complesso viene successivamente elaborato mediante trasformata di Fourier, che consente di estrarre le frequenze caratteristiche e convertirle in valori di m/z , producendo lo spettro di massa finale.

Grazie a questo principio di funzionamento, l'Orbitrap è in grado di fornire spettri ad altissima risoluzione e accuratezza di massa, risultando particolarmente adatto ad applicazioni di analisi proteomica e metabolomica [23].

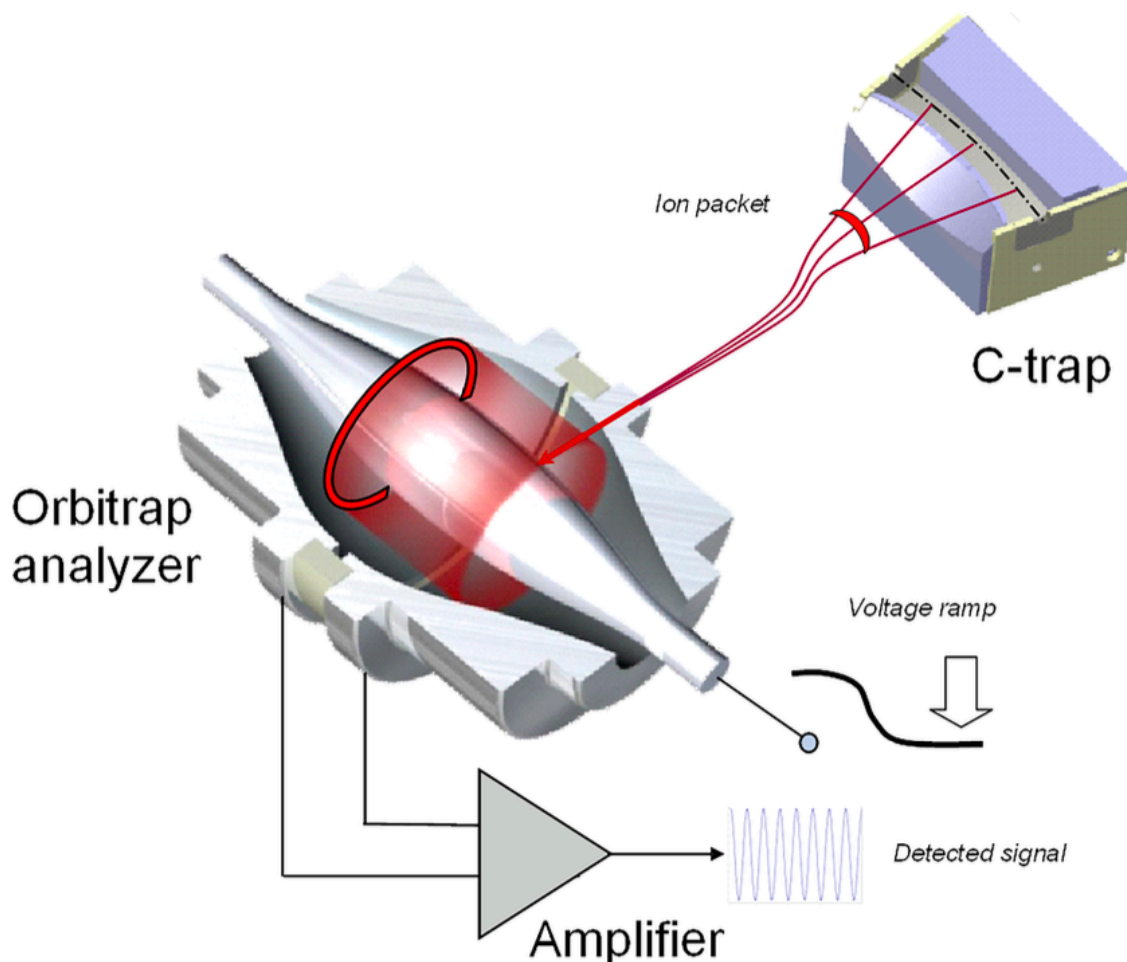


Figura 8. Rappresentazione schematica dell'Orbitrap [23].

3. MATERIALI E METODI

3.1. Materiali

3.1.1. Standard chimici

Standard chimici puri sono stati utilizzati per la costruzione della libreria spettrale. In particolare, sono stati impiegati kit di standard commerciali acquistati da *Sigma-Aldrich* (*Merck*), comprendenti metaboliti appartenenti a diverse classi chimiche, come descritto di seguito.

- V1-1KT: kit che comprende vitamine idrosolubili e liposolubili, selezionato per rappresentare metaboliti essenziali coinvolti in numerose vie metaboliche e processi di regolazione biochimica.
- BACSMS-1EA: kit costituito da acidi biliari primari e secondari, incluso per la caratterizzazione di metaboliti steroidei coinvolti nel metabolismo lipidico e nella regolazione metabolica.
- FAMLS-1EA: kit contenente acidi grassi saturi e insaturi di diversa lunghezza di catena, rappresentativi del metabolismo lipidico.
- OAMLS-1EA: kit comprendente acidi organici coinvolti nel ciclo di Krebs e in altre vie del metabolismo energetico centrale, selezionato per rappresentare metaboliti altamente polari.
- ML0010-1KT: kit contenente standard metabolici di composti appartenenti a differenti classi chimiche, utilizzata per ampliare la copertura del profilo metabolico.
- 47264: kit costituito da acidi organici coinvolti in differenti vie del metabolismo centrale, incluso per la caratterizzazione di metaboliti polari di rilevanza biologica.

Oltre ai kit commerciali, alcuni standard chimici puri, non inclusi nei kit, sono stati acquistati singolarmente da *Cayman Chemical* e utilizzati per ampliare la copertura della libreria spettrale.

Per completezza, in Appendice 1 è riportata una tabella contenente l'elenco degli analiti inclusi in ciascun kit, comprensivi anche di quelli acquistati singolarmente, corredati della relativa formula chimica e della massa monoisotopica neutra.

3.1.2. Solventi

Per la preparazione delle soluzioni di standard sono stati utilizzati diversi solventi di solubilizzazione, selezionati in base alle proprietà chimico-fisiche degli analiti. In particolare, sono stati impiegati dimetilsolfossido, etanolo, metanolo, isopropanolo, idrossido di sodio, idrossido d'ammonio e acqua Milli-Q, tutti di grado LC-MS e acquistati da *Sigma-Aldrich (Merck)*.

Le analisi cromatografiche sono state condotte utilizzando come fasi mobili acqua Milli-Q e acetonitrile, entrambi di grado LC-MS (*Sigma-Aldrich, Merck*), addizionati con acido formico di grado LC-MS (*LiChropur*) e formiato di ammonio in soluzione acquosa 10 M, di grado LC-MS (*BioUltra*), entrambi acquistati da *Sigma-Aldrich (Merck)*.

Per il lavaggio dell'ago dell'autocampionatore sono state utilizzate miscele di acqua e metanolo di grado LC-MS (*Sigma-Aldrich, Merck*).

Laddove specificato, l'acqua di grado Milli-Q è stata prodotta in situ mediante un sistema di purificazione *Millipore (Merck)*, garantendo una resistività di 18.2 M Ω ·cm a 25 °C.

3.1.3. Materiali per la preparazione dei campioni biologici

Per la preparazione e l'analisi dei campioni relativi alla sindrome di Lesch-Nyhan sono stati impiegati i materiali già descritti nel paragrafo precedente, con l'aggiunta di uno standard interno costituito dal kit MSK-QC-KIT sviluppato da *Cambridge Isotope Laboratories Inc.* (Tewksbury, MA, USA).

Per il processo di lisi cellulare è stato utilizzato il buffer *Lyse (PreOmics)*. Per il dosaggio delle proteine sono state impiegate soluzioni di urea e di triptofano, entrambe preparate a partire dalle rispettive polveri con grado di purezza $\geq 99.0\%$ acquistate da *Sigma-Aldrich*.

Per la digestione delle proteine sono stati utilizzati acetonitrile, etanolo e propanolo di grado LC-MS (*Sigma-Aldrich*). La digestione enzimatica è stata effettuata impiegando biglie magnetiche *MagReSyn Zr-IMAP HP* (*ReSyn Biosciences*) alla concentrazione di 20 mg/mL e come enzimi tripsina e Lys-C acquistati rispettivamente da *Promega* e *Fujifilm*.

Per la preparazione dei puntali *Evotip* sono stati utilizzati gli stessi solventi già impiegati nelle fasi di preparazione precedenti, con l'aggiunta di acido trifluoroacetico (TFA) di grado LC-MS (*Sigma-Aldrich*).

Per l'estrazione delle microvescicole dal plasma sono state utilizzate biglie magnetiche *MagReSyn SAX* (*ReSyn Biosciences*), polveri di Bis-Tris Propano e cloruro di sodio con grado di purezza $\geq 99,0\%$ (*Sigma-Aldrich*), tampone fosfato salino (PBS), anch'esso acquistato da *Sigma-Aldrich* e acido cloridrico al 35% di grado LC-MS (*Sigma-Aldrich*).

3.2. Preparazione degli standard

Le soluzioni di standard sono state preparate solubilizzando ciascun analita nel solvente più idoneo in funzione delle sue proprietà chimico-fisiche e delle indicazioni fornite dal produttore. Per ciascun kit, sono stati pertanto impiegati solventi di solubilizzazione differenti.

Gli standard forniti in piastre in polipropilene a 96 pozzetti, contenenti quantità prepesate di analita (5 μg per pozzetto), sono stati ricostituiti direttamente nel solvente appropriato, mentre gli standard forniti come polveri in boccettini singoli sono stati preliminarmente pesati e successivamente solubilizzati. A partire dalle soluzioni madri, ciascun analita è stato sottoposto a opportune diluizioni al fine di ottenere una concentrazione finale di 5 $\mu\text{g/mL}$ [15]. In particolare, per garantire la compatibilità cromatografica, la diluizione finale è stata effettuata utilizzando il solvente corrispondente alle condizioni iniziali della fase mobile impiegata per ciascun metodo cromatografico. Di conseguenza, per ogni standard sono state preparate separatamente soluzioni dedicate alle analisi in fase inversa e in modalità HILIC, assicurando condizioni di iniezione ottimali e una migliore qualità del profilo cromatografico per entrambe le separazioni.

Tutte le soluzioni di standard sono state preparate e analizzate singolarmente, senza miscelazione tra analiti, al fine di evitare fenomeni di co-eluzione, competizione e soppressione ionica, nonché possibili ambiguità di assegnazione associate a specie isobare [17]. Questo approccio consente una determinazione corretta e univoca dei tempi

di ritenzione e degli spettri di frammentazione. Nel complesso, l'analisi in entrambe le modalità cromatografiche e l'iniezione singola degli analiti ha comportato la preparazione di 680 soluzioni standard.

3.3. Condizioni sperimentali

Nel presente lavoro sono stati valutati dieci metodi di acquisizione in spettrometria di massa sull'Orbitrap Fusion, che differivano per specifici parametri di acquisizione MS, mentre le condizioni cromatografiche sono state mantenute costanti. L'attività di ottimizzazione sperimentale è stata pertanto concentrata esclusivamente sulla fase di acquisizione in spettrometria di massa.

3.3.1. Condizioni cromatografiche

Le condizioni cromatografiche adottate in questo studio, in particolare la composizione delle fasi mobili, derivano da un metodo già ottimizzato e validato in letteratura (Bonini et al.), che ha dimostrato un'elevata robustezza e riproducibilità per analisi LC-MS di tipo metabolomico e lipidomico [24]. Tutti gli analiti inclusi nello studio sono stati acquisiti in due modalità cromatografiche differenti, su colonna HILIC e cromatografia in fase inversa su colonna C18, al fine di ottenere l'informazione sul tempo di ritenzione in ciascuna condizione cromatografica.

3.3.1.1. Condizioni cromatografiche in modalità C18

Le analisi in fase inversa sono state eseguite utilizzando una colonna *ACQUITY UPLC BEH C18 (Waters)*, con particelle da 1,7 μm e dimensioni 2,1 $\times$ 50 mm, mantenuta a una temperatura di 45 °C. La fase mobile era costituita da fase A, composta da acqua con 10 mM di formiato di ammonio e 0,1% di acido formico, e fase B, costituita da una miscela acetonitrile/acqua (95:5, v/v) contenente 10 mM di formiato di ammonio e 0,1% di acido formico. L'impiego di ammonio formiato e acido formico come additivi di fase mobile è stato scelto al fine di garantire condizioni cromatografiche e di ionizzazione ottimali e riproducibili. In modalità di ionizzazione positiva, la presenza di acido formico contribuisce a stabilizzare il pH e a migliorare la forma dei picchi cromatografici, favorendo al contempo un'efficiente protonazione degli analiti, mentre l'ammonio formiato, agendo come sale volatile, aumenta la disponibilità di specie ioniche nella fase

mobile, favorendo una ionizzazione elettrospray stabile e riproducibile. In modalità di ionizzazione negativa, l'ammonio formiato favorisce una deprotonazione efficiente degli analiti e una buona stabilità del segnale, mentre l'acido formico, impiegato a bassa concentrazione, contribuisce principalmente alla stabilità cromatografica e alla qualità dei profili di eluizione. L'utilizzo combinato di questi additivi consente pertanto di ottenere separazioni cromatografiche robuste e pienamente compatibili con la ionizzazione elettrospray in entrambe le modalità [24]. La separazione cromatografica è stata ottenuta mediante un gradiente di eluizione della durata complessiva di 7 minuti. Il gradiente partiva da una bassa percentuale di fase organica (1% B), seguita da un rapido incremento fino al 99% B, al fine di favorire l'eluizione dei composti meno polari. Successivamente, la composizione iniziale è stata ristabilita (1% B) e mantenuta fino al termine della corsa per consentire il ribilanciamento della colonna. Il flusso della fase mobile è stato mantenuto costante a 0,4 mL/min per tutta la durata dell'analisi. La temperatura dell'autocampionatore è stata impostata a 5 °C, al fine di garantire la stabilità delle soluzioni analizzate.

In Appendice 2 è riportato il file contenente le impostazioni strumentali relative alla modalità C18.

3.3.1.2. Condizioni cromatografiche in modalità HILIC

Le analisi in modalità HILIC sono state eseguite utilizzando una colonna *ACQUITY UPLC BEH Amide (Waters)*, con particelle da 1,7 µm e dimensioni 2,1 × 50 mm, mantenuta a una temperatura di 45 °C. Le fasi mobili utilizzate sono le stesse descritte per le analisi in fase inversa (C18). La separazione cromatografica è stata ottenuta mediante un gradiente di eluizione della durata complessiva di 8,5 minuti. Il gradiente partiva da un'elevata percentuale di fase organica (100% B), seguita da una progressiva diminuzione della frazione organica fino al 30% B, al fine di favorire l'eluizione degli analiti più polari. Successivamente, la composizione iniziale è stata ristabilita (100% B) e mantenuta fino al termine della corsa per consentire il ribilanciamento della colonna. Il flusso della fase mobile è stato mantenuto costante a 0,4 mL/min per tutta la durata dell'analisi. La temperatura dell'autocampionatore è stata impostata a 5 °C, al fine di garantire la stabilità delle soluzioni analizzate.

In Appendice 3 è riportato il file con il dettaglio delle impostazioni strumentali relative alla modalità cromatografica HILIC.

3.3.2. Ottimizzazione dei metodi di acquisizione in spettrometria di massa

Nel presente lavoro è stata condotta una fase di ottimizzazione dei parametri di acquisizione degli ioni in spettrometria di massa, con l'obiettivo di individuare le condizioni sperimentali in grado di massimizzare il numero di analiti rilevati e garantire una buona qualità dei profili cromatografici. Poiché, in generale, la cromatografia in fase inversa su colonna C18 consente di ottenere profili cromatografici più stabili e ben definiti rispetto alla modalità HILIC, l'ottimizzazione dei metodi di acquisizione è stata effettuata esclusivamente in tale configurazione cromatografica. A tale scopo, sono stati testati dieci diversi metodi di acquisizione sul kit V1, contenente 11 analiti, scelto come modello per la valutazione comparativa delle diverse configurazioni strumentali.

3.3.2.1. Parametri comuni a tutti i metodi

In tutti i metodi di acquisizione testati sono state mantenute costanti le principali condizioni di acquisizione in spettrometria di massa, al fine di consentire un confronto diretto e significativo tra le diverse configurazioni. L'analisi è stata condotta in modalità Data-Dependent Acquisition (DDA). In questa modalità di acquisizione, a ciascun ciclo analitico viene inizialmente eseguita una scansione MS¹ full scan, che consente di rilevare tutti gli ioni presenti all'interno di un ampio intervallo di massa. Sulla base dell'intensità del segnale, il software di acquisizione seleziona quindi un numero prestabilito di ioni precursori, che vengono isolati mediante il quadrupolo. Gli ioni selezionati sono successivamente sottoposti a frammentazione collisionale in modalità HCD, e i frammenti generati vengono infine rivelati dall'analizzatore di massa selezionato. La ionizzazione è stata effettuata mediante sorgente H-ESI, operando sia in modalità positiva sia in modalità negativa. In modalità positiva è stata applicata una tensione di spray pari a +3,3 kV, mentre in modalità negativa la tensione di spray è stata impostata a -3,0 kV. In entrambi i casi, il gas di nebulizzazione (sheath gas) è stato impostato a 35 Arb, il gas ausiliario a 15 Arb, senza utilizzo dello sweep gas. La temperatura del transfer tube e del vaporizzatore è stata mantenuta rispettivamente a 275 °C e 300 °C. L'acquisizione MS¹ è stata eseguita nell'Orbitrap, con risoluzione pari a 30.000 (FWHM), intervallo di massa m/z 100-600 (in accordo con il peso molecolare degli analiti considerati), un singolo microscan per scansione e modalità di acquisizione profile. Il target AGC e il tempo massimo di iniezione sono stati gestiti automaticamente dallo strumento. L'isolamento dei precursori è stato effettuato mediante quadrupolo, con una finestra di isolamento pari a 1,5 m/z. La frammentazione è stata condotta mediante HCD, utilizzando energie di collisione normalizzate applicate in modalità stepped (20, 40 e 60% NCE). L'energia di

collisione normalizzata (NCE) permette di modulare automaticamente l'energia di frammentazione in funzione del rapporto m/z del precursore. La modalità stepped prevede l'applicazione sequenziale di più livelli di energia all'interno della stessa scansione MS/MS, consentendo la generazione simultanea di frammenti prodotti a basse e alte energie e aumentando la ricchezza informativa dello spettro di frammentazione. Nei metodi che prevedevano l'acquisizione MS/MS in Orbitrap, la risoluzione è stata fissata a 15.000 (FWHM). La risoluzione impiegata per l'acquisizione MS¹ è stata impostata su valori più elevati rispetto a quella utilizzata per le scansioni MS/MS, al fine di garantire un'elevata accuratezza di massa nella selezione dei precursori. Per le acquisizioni MS/MS è stata invece adottata una risoluzione inferiore, che consente tempi di scansione più rapidi e una maggiore sensibilità, risultando più adeguata alla generazione di spettri di frammentazione informativi. Nei metodi che includevano l'Ion Trap l'acquisizione MS/MS è stata eseguita con scan rate normale, che consente una scansione in m/z sufficientemente rapida mantenendo un'adeguata risoluzione e intensità dei segnali dei frammenti. In tutti i casi sono stati utilizzati un singolo microscan, in modo da massimizzare la velocità di acquisizione mantenendo un adeguato rapporto segnale/rumore. I dati MS/MS sono stati acquisiti in modalità profile per l'Orbitrap e centroid per l'Ion Trap. L'acquisizione in modalità profile consente di registrare l'intera forma dei picchi spettrali, preservando le informazioni di risoluzione e accuratezza di massa, mentre la modalità centroid prevede un'elaborazione del segnale in cui ciascun picco viene rappresentato da un singolo valore di m/z e intensità. Quest'ultima modalità è tipicamente adottata per l'Ion Trap, in quanto questo analizzatore opera a risoluzione inferiore e privilegia velocità e sensibilità, rendendo superflua l'acquisizione della forma completa dei picchi e favorendo una gestione più efficiente dei dati.

3.3.2.2. Parametri oggetto di ottimizzazione

I valori dei parametri testati nei diversi metodi sono stati selezionati all'interno di intervalli comunemente utilizzati per acquisizioni DDA su strumenti Orbitrap Fusion, sulla base di impostazioni standard, indicazioni presenti in letteratura e dell'esperienza maturata in laboratorio. L'obiettivo non era individuare un singolo valore ottimale per ciascun parametro, ma confrontare strategie di acquisizione differenti e realistiche, rappresentative dei principali compromessi tra velocità di acquisizione, copertura degli analiti e qualità spettrale.

La scelta dell'analizzatore per l'acquisizione MS/MS è stata inclusa tra i parametri oggetto di ottimizzazione, confrontando configurazioni basate esclusivamente

sull'Orbitrap con configurazioni che prevedevano l'utilizzo combinato di Orbitrap e Ion Trap, al fine di valutare differenti strategie di acquisizione in termini di risoluzione, velocità e sensibilità. Nella tabella seguente sono riportate le principali differenze tra i metodi testati.

Tabella 2. Confronto tra i metodi di acquisizione testati.

Method	Detector type	Number of Dependent Scans	Dynamic exclusion	Exclude after n times	If occurs within (s)	Exclusion duration (s)
1	Orbitrap	3	No	-	-	-
2	Orbitrap	3	Sì	1	-	2
3	Orbitrap	3	Sì	2	2	2
4	Orbitrap	3	Sì	2	30	2
5	Orbitrap	5	Sì	1	-	2
6	Orbitrap + Ion Trap	3	No	-	-	-
7	Orbitrap + Ion Trap	3	Sì	1	-	2
8	Orbitrap + Ion Trap	3	Sì	2	2	2
9	Orbitrap + Ion Trap	3	Sì	2	30	2
10	Orbitrap + Ion Trap	5	Sì	1	-	2

In modalità DDA, il parametro *Number of Dependent Scans* rappresenta il numero massimo di ioni precursori, selezionati in base all'intensità del segnale, che vengono sottoposti a frammentazione dopo ogni scansione MS¹. L'opzione *Dynamic Exclusion* consente di evitare la frammentazione ripetuta degli stessi precursori particolarmente abbondanti, permettendo l'analisi di specie meno intense. Il parametro *Exclude after n times* stabilisce il numero massimo di volte in cui uno stesso ione può essere selezionato per la frammentazione. Il parametro *If occurs within* indica l'intervallo di tempo entro il quale tali frammentazioni devono avvenire affinché venga attivata l'esclusione dinamica, mentre *Exclusion duration* definisce il periodo di tempo durante il quale lo ione viene temporaneamente escluso dalla selezione MS/MS una volta raggiunto il numero massimo di frammentazioni consentite.

3.4. Acquisizione della libreria spettrale (mzVault)

3.4.1. Compilazione della Compound List

Per l'acquisizione e la gestione della libreria spettrale è stato utilizzato il software mzVault, sviluppato da *Thermo Fisher Scientific*. Tale piattaforma consente l'acquisizione, l'archiviazione e l'organizzazione di spettri di frammentazione MS/MS associati a composti di riferimento, integrando le informazioni di massa esatta, tempo di ritenzione e pattern di frammentazione.

La costruzione di una libreria spettrale mediante mzVault prevede come primo passaggio la compilazione di una Compound List, ovvero un elenco strutturato degli analiti contenente tutte le informazioni necessarie, che viene successivamente elaborato dal software per l'acquisizione dei dati spettrali. Per ciascun composto vengono inserite informazioni quali il nome dell'analita, la formula molecolare, la modalità di ionizzazione, la carica e il tipo di addotto considerato; sulla base di tali parametri, il software calcola automaticamente il valore teorico di m/z dello ione precursore. A ciascun composto devono inoltre essere associati i raw data, ovvero i file grezzi generati dallo strumento di spettrometria di massa durante l'acquisizione LC-MS/MS, che contengono l'intero set di informazioni sperimentali relative agli spettri MS¹ e MS². L'inserimento delle informazioni precedentemente elencate e l'associazione ai rispettivi raw data all'interno delle Compound List sono stati effettuati manualmente, al fine di garantire una corretta corrispondenza tra ciascun analita e i dati spettrali acquisiti.

Questa procedura è stata ripetuta per tutti i 340 analiti inclusi nello studio e per ciascuna delle quattro modalità di analisi considerate (C18 in modalità positiva e negativa, HILIC in modalità positiva e negativa). Lo stesso approccio è stato applicato agli addotti ionici. In particolare, in modalità positiva sono stati considerati gli addotti $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ e $[M+NH_4]^+$, mentre in modalità negativa gli addotti $[M-H]^-$ e $[M+HCOO]^-$. Ne è derivata la compilazione manuale di un totale di cinque compound list, ciascuna contenente 340 analiti.

Status	T	R	A	Compound	Raw File	Raw File URL	Formula Or Precursor	Formula	Adduct	Charge
No Spectrum Found				Butanoylcarnitine	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C11H21NO4	NH4	1
No Spectrum Found				Adipoyl-L-carnitine	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C13H23NO6	NH4	1
No Spectrum Found				Decadienoylcarnitine	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C17H29NO4	NH4	1
No Spectrum Found				Decanoyl-L-carnitine	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C17H33NO4	NH4	1
No Spectrum Found				Dodecenoylcarnitine	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C19H35NO4	NH4	1
No Spectrum Found				Dodecanoylcarnitine	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C19H37NO4	NH4	1
No Spectrum Found				Ursodeoxycholic acid	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C24H40O4	NH4	1
No Spectrum Found				27-Hydroxycholesterol	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C27H46O2	NH4	1
Entry added to library				Ursolic acid	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C24H40O5	NH4	1
No Spectrum Found				Tauroursodeoxycholic acid	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C26H45NO6S	NH4	1
No Spectrum Found				Arachidonyl-L-carnitine	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C31H54NO4	NH4	1
Entry added to library				Tauromuricholic acid	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C26H45NO7S	NH4	1
No Spectrum Found				L-Carnitine	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C7H15NO3	NH4	1
No Spectrum Found				Isobutyryl-L-carnitine	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C11H21NO4	NH4	1
No Spectrum Found				Isovaleryl-L-carnitine	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C12H23NO4	NH4	1
No Spectrum Found				Glutaryl-carnitine	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C12H21NO6	NH4	1
No Spectrum Found				3-hydroxydodecanoyl carnitine	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C19H37NO5	NH4	1
No Spectrum Found				Propionyl-L-carnitine	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C10H19NO4	NH4	1
No Spectrum Found				Hexadecanoylcarnitine	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C23H45NO4	NH4	1
No Spectrum Found				7α-Hydroxycholesterol	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C27H46O2	NH4	1
No Spectrum Found				3-Hydroxyhexadecanoylcarnitine	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C23H45NO5	NH4	1
No Spectrum Found				Linoleyl carnitine	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C25H45NO4	NH4	1
Entry added to library				Glycohyodeoxycholic acid	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C26H43NO5	NH4	1
Entry added to library				Taurochenodesoxycholic acid	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C26H45NO6S	NH4	1
No Spectrum Found				Propanoylcarnitine	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C10H19NO4	NH4	1
No Spectrum Found				Tiglylcarnitine	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C12H21NO4	NH4	1
No Spectrum Found				Valeryl-L-carnitine	Raw File	F:\Metabolomica\RAW_DATA_2025\Erica_Rissi	Formula Or Precursor	C12H23NO4	NH4	1

Figura 9. Esempio di Compound List utilizzata per la gestione degli analiti e dei relativi raw data nel software mzVault.

3.4.2. Processamento della Compound List

Al fine di ottenere una libreria spettrale contenente esclusivamente spettri rappresentativi degli analiti di interesse, ed evitare l'inclusione di segnali attribuibili al rumore di fondo o a features non affidabili, la Compound List è stata sottoposta a una fase di processamento mediante l'applicazione di specifici criteri di selezione. In particolare, è stata definita una soglia di intensità (threshold), al di sotto della quale i segnali non vengono presi in considerazione dal software. Inoltre, per l'inclusione di un composto

nella libreria è stata richiesta la presenza non solo dello spettro MS¹, ma anche di uno spettro di frammentazione MS/MS associato. Nel caso in cui un analita fosse presente nel file raw esclusivamente a livello di MS¹, e quindi se il precursore non fosse risultato sufficientemente intenso da essere selezionato per la frammentazione in modalità DDA, tale composto non sarebbe stato considerato idoneo per l'inserimento in libreria.

Il processamento della Compound List è stato quindi eseguito mediante la funzione Process List, attraverso la quale il software elabora automaticamente le informazioni inserite e valuta, per ciascun composto, il rispetto dei criteri definiti. Come illustrato in Figura 9, gli analiti per i quali sono soddisfatte sia la soglia di intensità sia la disponibilità di uno spettro MS/MS vengono inclusi nella libreria spettrale (*Entry added to library*). Al contrario, i composti che non soddisfano tali requisiti vengono esclusi dal processo (*No spectrum found*), in quanto non ritenuti sufficientemente affidabili ai fini della costruzione della libreria.

3.5. Applicazione della libreria spettrale a campioni biologici

3.5.1. Preparazione dei campioni di plasma di pazienti affetti da Lesch-Nyhan

Ai campioni appartenenti alle tre popolazioni in studio (LND, PCI e controlli sani) è stato aggiunto metanolo, al fine di favorire la precipitazione della componente proteica e la separazione dei metaboliti presenti nel plasma. In seguito ad agitazione mediante vortex, si è osservata la formazione di un precipitato proteico, mentre la frazione di interesse è risultata costituita dal surnatante, contenente i metaboliti. Il surnatante è stato quindi essiccato mediante *Concentrator Plus (Eppendorf)*, un sistema che combina vuoto, calore e rotazione per favorire l'evaporazione dei solventi presenti nel campione [25]. I residui secchi sono stati successivamente risospesi in un solvente avente composizione corrispondente alla fase mobile iniziale del metodo cromatografico, al fine di garantire la compatibilità con l'analisi strumentale. Al fine di monitorare la stabilità e la riproducibilità dello strumento durante le analisi, sono stati preparati campioni di quality control (QC), ottenuti miscelando aliquote di tutti i campioni in studio per generare un campione composito rappresentativo dell'intero set analitico. I QC sono stati analizzati a intervalli regolari nel corso della sequenza cromatografica per valutare la variabilità strumentale. Idealmente, tali campioni dovrebbero fornire risultati sovrapponibili; eventuali variazioni sistematiche vengono successivamente corrette in fase di elaborazione dei dati mediante procedure di normalizzazione e correzione dell'effetto batch.

Per un ulteriore controllo della variabilità analitica, a ciascun campione è stato aggiunto uno standard interno costituito da una miscela di metaboliti marcati isotopicamente con ^{13}C . Questo standard consente di monitorare eventuali variazioni nella risposta strumentale, nei tempi di ritenzione e nell'efficienza di ionizzazione, garantendo una maggiore affidabilità e comparabilità dei dati ottenuti.

3.5.2. Metodo Analitico

I campioni di plasma dei pazienti affetti da sindrome di Lesch-Nyhan sono stati analizzati in modalità HILIC sia in ionizzazione positiva che negativa, utilizzando le stesse condizioni cromatografiche e di ionizzazione impiegate per l'acquisizione degli standard della libreria. Tuttavia, trattandosi di un'analisi metabolomica untargeted, il range di massa acquisito è stato esteso nell'intervallo m/z 100-1000, al fine di consentire la rilevazione del maggior numero possibile di analiti.

Il sistema cromatografico è stato inoltre equipaggiato con una precolonna *VanGuard ACQUITY UPLC BEH Amide* (5 mm $\times$ 2,1 mm; 1,7 μm) acquistata da *Waters*, utilizzata per proteggere la colonna trattenendo particolato e contaminanti provenienti dalla matrice biologica, prolungandone la durata e migliorando la riproducibilità delle analisi.

Infine, l'acquisizione dei dati è stata effettuata impiegando esclusivamente l'analizzatore Orbitrap, al fine di garantire elevata risoluzione e accuratezza di massa, caratteristiche essenziali per l'identificazione affidabile dei metaboliti in analisi untargeted.

Oltre all'analisi dei campioni biologici e dei campioni QC, la sequenza analitica è stata progettata includendo acquisizioni in modalità identificativa sui soli QC. In tali acquisizioni il range di massa complessivo è stato suddiviso in più finestre di massa parzialmente sovrapposte, analizzate in sequenze separate, al fine di aumentare la sensibilità di rilevazione e migliorare la qualità degli spettri di frammentazione, facilitando l'identificazione dei metaboliti. L'ordine di iniezione dei campioni è stato randomizzato per minimizzare eventuali effetti sistematici dovuti alla deriva strumentale, a variazioni di sensibilità o a fenomeni di contaminazione progressiva della colonna.

3.5.3. Test della libreria

Per valutare le prestazioni della libreria di standard acquisita, i file grezzi generati dall'analisi strumentale sono stati elaborati mediante il software MS-DIAL, nel quale sono state importate come database di riferimento le librerie spettrali costruite durante il presente lavoro. In particolare, è stato effettuato un confronto tra gli analiti identificati utilizzando la libreria considerata più affidabile e quelli ottenuti impiegando una libreria con minore livello di affidabilità, al fine di valutare l'impatto della qualità della libreria sull'accuratezza dell'identificazione.

È stato inoltre effettuato un confronto con un database spettrale di riferimento impiegato dal gruppo di ricerca, aggiornato annualmente, al fine di verificare se gli analiti in comune venissero identificati anche mediante la libreria costruita nel presente lavoro. Il confronto è stato eseguito esclusivamente a livello degli spettri di massa, senza considerare i tempi di ritenzione, poiché i metodi cromatografici di acquisizione risultavano differenti.

3.6. Preparazione di campioni biologici per analisi proteomica

3.6.1. Preparazione dei campioni di cellule Natural Killer

Sono stati analizzati 14 campioni di cellule Natural Killer, forniti sotto forma di pellet cellulari, suddivisi in 7 campioni CD11c⁺ e 7 campioni CD11c⁻.

3.6.1.1. Lisi cellulare

I pellet cellulari sono stati sottoposti a lisi cellulare, processo che consiste nella rottura delle membrane cellulari e nella conseguente liberazione del contenuto intracellulare, comprendente proteine, acidi nucleici e altri componenti citosolici. La lisi è stata effettuata mediante un opportuno buffer di lisi contenente detergenti, quali il dodecil solfato di sodio (SDS), in grado di favorire la solubilizzazione delle proteine e la dissociazione delle strutture di membrana, e agenti riducenti, come il ditione (DTT) o il β -mercaptoetanolo, capaci di rompere i ponti disolfuro (S-S) presenti nelle proteine. La successiva alchilazione impedisce la riformazione casuale di tali legami, assicurando che le proteine rimangano in uno stato completamente denaturato. Al fine di garantire una lisi efficiente e una completa denaturazione proteica, i campioni sono stati incubati su

Thermomixer G (Eppendorf) a 95 °C per 10 minuti. Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati centrifugati su *Centrifuge 5427 R (Eppendorf)* per raccogliere eventuali gocce residue sulle pareti dei pozzetti delle piastre contenenti il campione.

3.6.1.2. Dosaggio delle proteine

Nell'ambito dello studio di proteomica condotto su cellule Natural Killer, una fase preliminare fondamentale è stata la determinazione del contenuto proteico totale. Questo passaggio ha consentito di quantificare con precisione la concentrazione proteica di ciascun campione, permettendo la normalizzazione delle quantità di proteine impiegate nelle successive analisi e garantendo la confrontabilità tra campioni provenienti da diverse condizioni sperimentali. Il dosaggio proteico consente infatti di evitare che eventuali differenze osservate siano attribuibili a variazioni nella quantità di materiale biologico e di operare all'interno di un intervallo di concentrazione adeguato alla digestione enzimatica e per le successive analisi di spettrometria di massa.

In questo contesto, la quantificazione delle proteine è stata effettuata mediante la misura della fluorescenza intrinseca del triptofano, amminoacido aromatico che presenta un'elevata resa quantica di fluorescenza rispetto agli altri residui aromatici e risulta pertanto il principale responsabile del segnale fluorescente delle proteine. La fluorescenza del triptofano è fortemente influenzata dal microambiente; pertanto, la misura è stata condotta in condizioni di completa denaturazione proteica, al fine di esporre uniformemente i residui di triptofano al solvente e rendere il segnale indipendente dalla struttura tridimensionale delle proteine. Poiché il contenuto di triptofano risulta relativamente costante tra le proteine di differenti tessuti e tipi cellulari, la fluorescenza misurata in condizioni di completa denaturazione proteica è proporzionale alla quantità totale di proteine presenti nel campione. In particolare, è stato stimato che a 0,0177 g di triptofano corrisponde 1 g di proteine totali, consentendo di utilizzare il triptofano come standard universale per la quantificazione proteica. A partire da una curva di calibrazione ottenuta utilizzando soluzioni di triptofano libero a concentrazione nota, è stato quindi possibile determinare il contenuto di triptofano nei campioni analizzati e, applicando il fattore di conversione sopra riportato, risalire alla concentrazione proteica totale [26].

Per la determinazione del contenuto proteico totale mediante fluorescenza del triptofano, le misure sono state eseguite in apposite piastre, allestendo pozzetti distinti per i campioni, per gli standard e per i bianchi. In tutti i pozzetti è stata aggiunta urea 8 M, al fine di garantire condizioni di completa denaturazione proteica. L'urea ha il ruolo di

rompere i legami a idrogeno responsabili della struttura secondaria e terziaria delle proteine. In questo modo i residui di triptofano risultano uniformemente esposti al solvente e immersi in un ambiente chimico omogeneo, rendendo il segnale di fluorescenza indipendente dalla conformazione tridimensionale delle proteine e proporzionale esclusivamente al loro contenuto di triptofano. I pozzetti contenenti solo urea sono stati utilizzati come campioni di bianco per la sottrazione del segnale di fondo. In pozzetti separati sono state allestite soluzioni standard di triptofano libero a concentrazione crescente, preparate nello stesso mezzo contenente urea, al fine di costruire una curva di calibrazione. La misura dell'intensità di fluorescenza degli standard, effettuata con eccitazione a 295 nm ed emissione a 350 nm mediante *Infinite M200 (Tecan)*, ha permesso di ottenere una retta di calibrazione, dalla quale è stato possibile ricavare il contenuto di triptofano dei campioni analizzati e, di conseguenza, determinarne la concentrazione proteica totale.

3.6.1.3. Digestione enzimatica delle proteine in peptidi

La digestione enzimatica dei campioni proteici rappresenta un passaggio imprescindibile nello studio di proteomica, in quanto la spettrometria di massa non consente l'analisi diretta delle proteine integre, ma richiede la loro conversione in peptidi. A tal fine, i campioni sono stati sottoposti a digestione mediante sistema *KingFisher (Thermo Fischer Scientific)* secondo protocollo PAC (Protein Aggregation Capture), che permette una preparazione standardizzata ed efficiente. Questo approccio consente la rimozione efficace di contaminanti quali detergenti e sali, potenzialmente interferenti con l'analisi, e garantisce una digestione controllata e riproducibile delle proteine in peptidi di dimensioni e cariche idonee all'analisi mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa.

I peptidi ottenuti dalla digestione vengono successivamente separati e analizzati, generando spettri di massa che forniscono informazioni sulla loro sequenza amminoacidica. L'identificazione delle proteine avviene attraverso il confronto degli spettri sperimentali con database proteici di riferimento, mediante algoritmi di ricerca che associano ciascun peptide a una specifica sequenza proteica. Poiché ogni proteina è caratterizzata da un insieme unico di peptidi (peptidi unici), la combinazione delle informazioni derivanti da più peptidi consente di risalire in modo affidabile alle proteine di origine e di procedere alla loro identificazione e quantificazione [27].

Nella prima fase, i campioni precedentemente lisati vengono sottoposti a trattamento con acetonitrile, che induce l'aggregazione e la precipitazione delle proteine, consentendo la loro separazione dalle altre componenti del lisato. Le proteine aggregate vengono quindi catturate su biglie magnetiche, dotate di un nucleo magnetico e di una superficie funzionalizzata che permette l'interazione con le proteine precipitate, rendendo possibile la loro immobilizzazione. L'immobilizzazione delle proteine consente l'esecuzione di lavaggi sequenziali con acetonitrile, etanolo al 70% e propanolo, finalizzati alla rimozione di detergenti, lipidi, acidi nucleici e altre sostanze contaminanti che potrebbero interferire con l'efficienza della digestione enzimatica e con l'analisi in spettrometria di massa. Successivamente, le proteine immobilizzate sulle biglie magnetiche vengono sottoposte a digestione enzimatica diretta (on-bead digestion) mediante l'azione combinata di endoproteinasi Lys-C e tripsina. Lys-C effettua una scissione specifica a valle dei residui di lisina ed è particolarmente stabile in condizioni denaturanti, facilitando l'accesso della tripsina, che completa la digestione clivando i legami peptidici a valle di arginina. Le diverse fasi del protocollo sono state predisposte manualmente preparando piastre separate contenenti i differenti solventi e le soluzioni necessarie, successivamente caricate nel sistema automatizzato *KingFisher*, che ha eseguito in modo sequenziale e standardizzato i passaggi di aggregazione, lavaggio e digestione. Questo processo porta alla generazione di peptidi di dimensioni e caratteristiche chimico-fisiche idonee all'analisi LC-MS/MS.

3.6.1.4. Preparazione dei puntali Evotip

I puntali *Evotip* (*Evosep*) sono dispositivi monouso per l'introduzione del campione nei protocolli di proteomica basata su cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa. Essi integrano in un unico supporto le fasi di pulizia, concentrazione e normalizzazione dei peptidi, consentendo di standardizzare la quantità di campione analizzata e di ridurre la variabilità tecnica introdotta nelle fasi pre-analitiche. Durante l'analisi, i peptidi di interesse vengono eluiti dal puntale e trasferiti al sistema cromatografico, mentre contaminanti e molecole indesiderate restano trattenuti ed eliminati con il puntale stesso, che viene scartato dopo ogni iniezione. Questo meccanismo riduce in modo significativo la contaminazione tra campioni consecutivi e contribuisce a preservare il sistema cromatografico, garantendo un'elevata riproducibilità tra analisi successive e una maggiore robustezza dell'intero sistema, anche nell'analisi di numerosi campioni [28].

Prima dell'utilizzo, i puntali sono stati attivati mediante trattamento con acetonitrile contenente 0,1% di acido formico (soluzione B), seguito da un passaggio con soluzione acquosa contenente 0,1% di acido formico (soluzione A) per il condizionamento della fase stazionaria. I campioni digeriti sono stati quindi caricati sui puntali, consentendo l'adsorbimento selettivo dei peptidi sulla fase solida. Dopo il caricamento, i puntali sono stati sottoposti a lavaggi con soluzione acquosa acidificata, al fine di rimuovere sali e contaminanti. Dopo ogni aggiunta di solvente, la frazione in eccesso è stata rimossa mediante centrifugazione, che consente il passaggio controllato dei liquidi attraverso il puntale senza perdita significativa di analita. I peptidi sono stati successivamente eluiti con una soluzione 80:20 di acetonitrile/acqua contenente 0,1% di acido trifluoroacetico, raccolti, portati a secco e congelati.

Per l'analisi strumentale, i campioni normalizzati sono stati caricati su nuovi puntali *Evotip*, distinti da quelli utilizzati nella fase di normalizzazione. I puntali sono stati pre-condizionati con propanolo, soluzione A e soluzione B, quindi utilizzati per il caricamento della quantità normalizzata di campione, ripresa in un opportuno volume di soluzione A. Infine, i puntali, compresi quelli di bianco, sono stati lavati con soluzione A e impiegati come dispositivo di introduzione del campione nel sistema di cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa.

3.6.2. Preparazione di campioni di microvescicole da plasma

Per l'isolamento delle microvescicole è stato utilizzato il protocollo Mag-Net, applicabile a campioni di plasma e, se necessario, di siero. Il metodo si basa su un sistema di scambio anionico che sfrutta la carica superficiale negativa delle vescicole extracellulari. A tale scopo vengono impiegate biglie magnetiche funzionalizzate con gruppi a scambio anionico forte (SAX), in grado di legare selettivamente le vescicole presenti nel campione. Dopo la fase di legame, le biglie magnetiche vengono separate mediante magnete, consentendo il recupero della frazione arricchita in microvescicole e la rimozione dei componenti plasmatici non legati.

Analogamente al protocollo PAC, sono state predisposte diverse piastre successivamente inserite nel sistema automatizzato *KingFisher*, che ha eseguito i passaggi previsti dal programma impostato. Due piastre sono state allestite con tampone di lavaggio costituito da Bis-Tris Propano (BTP), cloruro di sodio e acqua Milli-Q, regolato a pH 6,3 mediante aggiunta di acido cloridrico e verifica con pHmetro. Tale valore di pH è stato scelto per determinare la carica netta delle superfici delle vescicole

extracellulari e dei gruppi funzionali presenti sulla matrice magnetica, favorendone l'interazione elettrostatica. In una delle due piastre sono state inoltre aggiunte le biglie magnetiche a scambio anionico. Una terza piastra è stata preparata con i campioni di plasma, precedentemente diluiti con tampone fosfato salino (PBS) e con il tampone di lavaggio. L'aggiunta del PBS ha lo scopo di mantenere le condizioni fisiologiche di forza ionica e pH, garantendo la stabilità delle vescicole extracellulari e favorendo una diluizione controllata della matrice plasmatica prima della fase di legame con le biglie magnetiche. Le tre piastre successive sono state allestite contenendo esclusivamente il tampone di lavaggio, per consentire la rimozione sequenziale dei componenti plasmatici non vescicolari. Nell'ultima piastra, destinata a contenere le biglie magnetiche con le vescicole legate, è stato aggiunto il buffer di lisi, al fine di procedere successivamente con il protocollo PAC, secondo quanto già descritto per le cellule Natural Killer. Prima di avviare la digestione enzimatica delle proteine in peptidi, al termine del protocollo Magnet la piastra è stata incubata a 95 °C per 10 minuti in *Thermomixer*, per garantire la completa denaturazione, riduzione e alchilazione delle proteine, in modo analogo a quanto effettuato per le cellule NK.

Al termine del protocollo PAC, analogamente a quanto descritto per le cellule NK, i campioni sono stati sottoposti a normalizzazione e successivo caricamento su puntali *Evotip*.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Metodo di acquisizione ottimizzato

Tra i dieci metodi di acquisizione dello spettrometro di massa valutati, è stato selezionato quello che ha consentito di ottenere il numero più elevato di analiti acquisiti e il profilo cromatografico complessivamente migliore. Sebbene le prestazioni dei diversi metodi fossero in gran parte comparabili, il metodo 7 (si veda Tabella 2) è risultato il più soddisfacente. Questa configurazione prevede l'utilizzo combinato di Orbitrap e Ion Trap come analizzatori, l'impostazione di tre scansioni dipendenti e, per quanto riguarda la *Dynamic Exclusion*, un numero massimo di una selezione dello ione per la frammentazione e un tempo di esclusione pari a 2 secondi.

La scelta di impiegare simultaneamente Orbitrap e Ion Trap come analizzatori di massa rappresenta un vantaggio significativo in quanto consente di sfruttare le caratteristiche complementari dei due sistemi. L'Orbitrap è un analizzatore ad alta risoluzione e ad elevata accuratezza di massa, fondamentale per l'identificazione affidabile degli analiti e la determinazione della massa esatta, ma con tempi di acquisizione più lunghi. Al contrario, l'Ion Trap, pur presentando una risoluzione e un'accuratezza di massa decisamente inferiori, è caratterizzato da una maggiore sensibilità e da una velocità di scansione più elevata, risultando particolarmente efficace per l'acquisizione degli spettri di frammentazione. La combinazione dei due analizzatori permette quindi di ottenere un compromesso ottimale tra qualità dell'informazione analitica e velocità di acquisizione, massimizzando il numero di analiti identificati e migliorando l'efficienza complessiva dell'analisi cromatografica-spettrometrica. L'unico parametro variato tra i diversi metodi di acquisizione è stato il range di massa, che è stato adattato in modo specifico al kit analizzato e alle masse degli ioni di interesse, consentendo di escludere segnali non rilevanti e di migliorare l'efficienza di acquisizione, la selezione dei precursori e la qualità complessiva degli spettri.

Al fine di fornire una descrizione completa delle condizioni sperimentali adottate, si riportano in Appendice 4 e Appendice 5 i riassunti del metodo di acquisizione in modalità positiva e negativa, rispettivamente, comprensivi di tutte le impostazioni strumentali.

4.2. Librerie spettrali

Sono state acquisite due categorie di librerie spettrali, una considerata più affidabile e una meno affidabile, differenziate in base al valore di soglia impostato durante l'acquisizione. In particolare, per la prima categoria è stato applicato un threshold pari a $NL = 30.000$, mentre per la seconda un valore pari a $NL = 5.000$. Il parametro NL (Normalized Level) rappresenta una soglia di intensità normalizzata del segnale, utilizzata per discriminare gli ioni acquisiti in base alla loro intensità.

L'impostazione di una soglia più elevata comporta l'acquisizione di un numero inferiore di features, ma caratterizzate da una maggiore affidabilità; per questo motivo, le librerie ottenute con threshold più alto sono state considerate come librerie di livello di identificazione 1. Le librerie con threshold più basso, pur includendo un numero maggiore di features, risultano meno selettive e vengono utilizzate come supporto nei casi in cui sia necessario approfondire o chiarire identificazioni dubbie, eventualmente mediante ulteriori verifiche.

In entrambe le categorie, le librerie sono state ulteriormente suddivise in base alle condizioni cromatografiche e alla modalità di ionizzazione, distinguendo quattro librerie per ciascuna categoria: C18 in modalità positiva, C18 in modalità negativa, HILIC in modalità positiva e HILIC in modalità negativa.

Le librerie acquisite in modalità di ionizzazione positiva includono gli addotti $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$, poiché il sodio è un elemento ubiquitario, frequentemente presente anche nei materiali della strumentazione, nonché l'addotto $[M+NH_4]^+$, in quanto tra gli additivi della fase mobile è stato impiegato ammonio formiato. Per quanto riguarda la modalità di ionizzazione negativa, sono stati considerati gli addotti $[M-H]^-$ e $[M+HCOO]^-$, in relazione all'utilizzo di ammonio formiato e acido formico come additivi della fase mobile.

Le librerie spettrali consentono di ricavare diverse informazioni relative agli analiti acquisiti, tra cui il nome del composto, la formula chimica, il tempo di ritenzione, il numero di scansione, il rapporto m/z dello ione precursore, l'energia di collisione utilizzata per la frammentazione, la polarità, la modalità di frammentazione, la modalità di ionizzazione, l'analizzatore di massa impiegato, il nome dello strumento utilizzato per l'acquisizione e lo spettro di frammentazione, come mostrato in Figura 10.

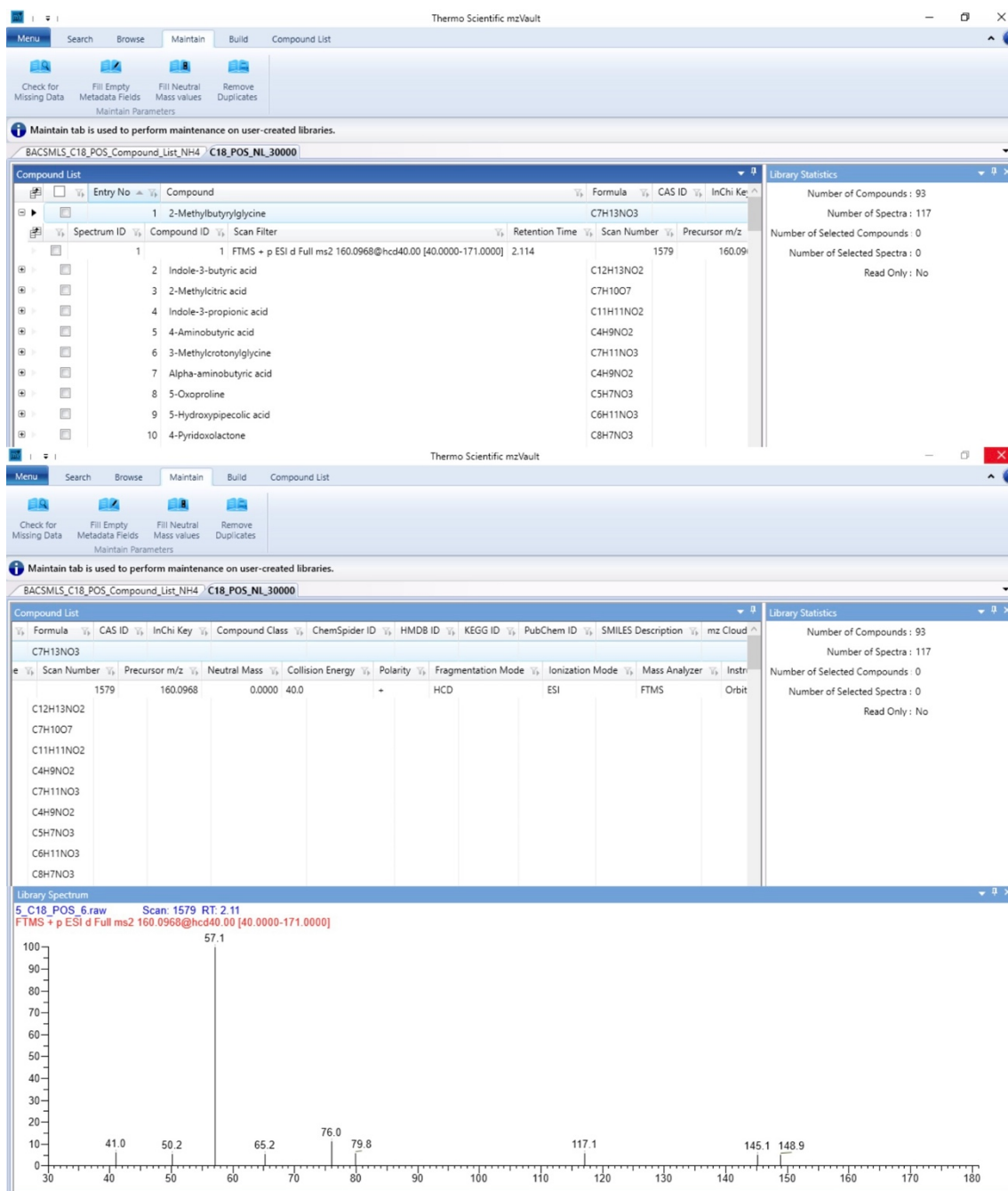


Figura 10. Esempio di visualizzazione delle informazioni di un analita all'interno della libreria nel software mzVault.

In Figura 10 è inoltre possibile osservare come il numero di spettri risulti superiore rispetto al numero di composti (117 contro 93). Ciò è dovuto al fatto che uno stesso analita può essere acquisito con più addotti. Mediante la funzione *Remove Duplicates* del software mzVault, tali spettri vengono accorpati in un'unica voce di libreria, evitando ridondanze.

Non tutti i composti sono stati acquisiti in tutte le modalità analitiche, e ciò può essere attribuito a diversi fattori. Tra questi rientrano una preferenza intrinseca dell'analita a ionizzare in modalità positiva o negativa, una generale difficoltà di ionizzazione, nonché l'esclusione di alcune features dalla libreria a causa di un'intensità del segnale inferiore al threshold impostato. Ulteriori motivazioni includono una possibile instabilità dell'analita nel tempo o nel solvente di solubilizzazione, la presenza esclusiva di segnali MS¹ non selezionati per la frammentazione in base ai criteri di acquisizione data-dependent e alla dynamic exclusion, oltre a eventuali interazioni indesiderate con la fase stazionaria cromatografica.

Di seguito è riportata una tabella riassuntiva delle librerie spettrali acquisite, contenente informazioni relative alle modalità cromatografiche e di ionizzazione impiegate, al valore di threshold, al numero di composti acquisiti e al numero totale di spettri ottenuti.

Tabella 3. Elenco delle librerie spettrali acquisite.

Modalità cromatografica e di ionizzazione	Threshold	Numero di composti	Numero di spettri
C18 POS	30000	93	117
C18 NEG	30000	87	102
HILIC POS	30000	91	129
HILIC NEG	30000	141	157
C18 POS	5000	113	166
C18 NEG	5000	105	130
HILIC POS	5000	97	149
HILIC NEG	5000	157	186

Le librerie spettrali acquisite sono state salvate in formato *.msp*, un formato standard ampiamente utilizzato in ambito metabolomico e proteomico per l'archiviazione di spettri di massa e delle relative informazioni associate. Tali librerie possono essere importate e utilizzate da software di elaborazione dati, come MS-DIAL, per l'identificazione dei

composti presenti nei campioni biologici reali. L'identificazione avviene mediante il confronto tra i picchi sperimentali rilevati nei campioni e gli spettri presenti nel database, tenendo conto di parametri quali la massa accurata, il tempo di ritenzione e il pattern di frammentazione, consentendo l'annotazione dei composti in modo automatizzato e riproducibile.

4.3. Applicazione della libreria spettrale a campioni biologici

4.3.1. Confronto tra libreria affidabile e meno affidabile

L'elaborazione dei dati mediante MS-DIAL, come si può osservare in Figura 11, ha restituito un numero elevato di composti annotati, tra cui diverse voci apparentemente duplicate. Questa situazione è comune nelle analisi metabolomiche non mirate e riflette la complessità dei segnali ottenuti mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione.

Peak spot table

Num of rows: 42 Name filter Ontology filter Adduct filter Comment filter 70.0129 m/z range 999.9020 0.0290 Retention time 8.4907

Tag filter: ☒ L ☒ M ☒ C ☐ O ☐ Exclude tagged peaks

ID	m/z	RT(min)	Type	Fill %	Metabolite name	Ontology	Comment	Tag	Annotation method	Match score	S/N	ANOVA P-value	Fold change (Max/Min)	BarChart
937	130.0861	2.2995	[M+H] ⁺	0.03	Pipecolic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5009	107.5	3.12E-01	2.47	
941	130.0864	2.1452	[M+H] ⁺	0.19	Pipecolic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5681	178.2	4.56E-05	4.69	
942	130.0864	1.8041	[M+H] ⁺	0.12	Pipecolic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5690	51.2	4.22E-01	25.58	
943	130.0865	1.9022	[M+H] ⁺	0.10	Pipecolic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5716	102.0	5.31E-01	44.00	
945	130.0865	2.0658	[M+H] ⁺	0.62	Pipecolic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5715	121.4	1.46E-07	7.82	
946	130.0866	0.6361	[M+H] ⁺	0.89	Pipecolic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5897	34.0	1.01E-01	4.87	
947	130.0866	0.7842	[M+H] ⁺	0.06	Pipecolic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5630	13.2	4.29E-01	3.37	
1310	146.0604	0.4946	[M+H] ⁺	0.12	Indole-3-aldehyde			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5978	30.9	1.05E-01	5.69	
1311	146.0605	0.6160	[M+H] ⁺	0.92	Indole-3-aldehyde			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.6361	77.4	1.19E-12	6.70	
2706	202.1798	3.8832	[M+H] ⁺	0.02	Undecylenic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5630	6.8	3.40E-08	3.72	
2707	202.1799	0.2974	[M+H] ⁺	0.12	Undecylenic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5741	20.8	4.08E-17	3.95	
2708	202.1799	2.6407	[M+H] ⁺	0.01	Undecylenic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.4840	5.7	4.05E-14	3.63	
2709	202.1799	5.9785	[M+H] ⁺	0.02	Undecylenic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5382	7.0	5.58E-17	3.98	
2710	202.1800	6.8934	[M+H] ⁺	0.02	Undecylenic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5050	3.8	2.74E-17	3.89	
2711	202.1800	3.5864	[M+H] ⁺	0.05	Undecylenic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5280	8.2	6.00E-11	4.33	
2712	202.1800	6.6528	[M+H] ⁺	0.02	Undecylenic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5194	4.9	5.72E-18	4.27	
2713	202.1801	5.8072	[M+H] ⁺	0.02	Undecylenic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5419	5.2	8.31E-15	3.91	
2714	202.1801	3.5105	[M+H] ⁺	0.02	Undecylenic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5182	11.2	3.93E-13	4.74	
2715	202.1801	4.6946	[M+H] ⁺	0.01	Undecylenic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5433	6.6	1.67E-10	3.52	
2716	202.1801	3.9927	[M+H] ⁺	0.07	Undecylenic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5804	4.9	1.42E-10	3.44	
2717	202.1801	3.7232	[M+H] ⁺	0.02	Undecylenic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5497	1.3	2.27E-08	3.99	
2718	202.1801	1.2993	[M+H] ⁺	0.38	Undecylenic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5838	4.4	4.30E-11	3.70	
2719	202.1801	2.0250	[M+H] ⁺	0.02	Undecylenic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5449	2.4	9.51E-11	3.73	
2720	202.1801	3.3315	[M+H] ⁺	0.03	Undecylenic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5268	8.4	3.92E-11	4.25	
2721	202.1802	4.4686	[M+H] ⁺	0.02	Undecylenic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5715	4.8	2.85E-13	3.32	
2722	202.1802	1.0402	[M+H] ⁺	0.60	Undecylenic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5872	8.5	1.32E-19	3.73	
2723	202.1803	2.9622	[M+H] ⁺	0.02	Undecylenic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5804	8.7	1.15E-18	6.16	
2724	202.1803	0.9476	[M+NH4] ⁺	0.16	Undecylenic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5687	9.1	2.16E-10	3.56	
2725	202.1803	1.1953	[M+H] ⁺	0.06	Undecylenic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5548	5.5	1.17E-07	3.69	
2726	202.1804	2.8136	[M+H] ⁺	0.04	Undecylenic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5834	12.2	5.33E-14	4.21	
2727	202.1806	0.5339	[M+H] ⁺	0.94	Undecylenic acid			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5464	92.2	8.28E-06	2.74	
3126	218.1286	0.4055	[M+H] ⁺	0.05	Propionyl-L-carnitine			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.4046	139.5	4.49E-01	65.72	
3127	218.1392	0.5348	[M+H] ⁺	0.93	Propionyl-L-carnitine			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.6107	3774.4	1.03E-02	2.74	
3495	232.1545	0.4980	[M+H] ⁺	0.93	Butanoyl-carnitine			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.6469	2767.2	7.41E-02	3.36	
3920	246.1702	0.4772	[M+H] ⁺	0.93	2-Methylbutyrylcar			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.6318	1502.4	1.09E-01	3.29	
3989	248.1136	1.1413	[M+H] ⁺	0.14	Malonyl-carnitine			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.6396	61.9	6.09E-01	33904.42	
4391	260.1857	0.4589	[M+H] ⁺	0.93	Hexanoyl-carnitine			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5931	406.2	3.52E-01	3.42	
4451	262.1291	0.6500	[M+H] ⁺	0.88	Succinyl-carnitine			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.6528	137.5	4.62E-03	2.98	
4957	276.1448	0.6077	[M+H] ⁺	0.93	Glutaryl-carnitine			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.6325	376.4	4.48E-03	3.11	
5378	288.2171	0.3874	[M+H] ⁺	0.83	Octanoyl-L-carnitine			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.6637	228.3	1.45E-01	1.86	
6490	316.2484	0.3791	[M+H] ⁺	0.84	Decanoyl-L-carnitine			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5928	534.9	6.87E-02	2.92	
7412	342.2641	0.3763	[M+H] ⁺	0.93	Dodecenoyl-carnitine			☒ L ☒ M ☒ C ☐ O	HLIC_POS_NL_30000	1.5913	377.1	9.97E-02	3.05	

Figura 11. Lista dei metaboliti rilevati mediante MS-DIAL.

Uno stesso metabolita può essere rilevato più volte per diverse ragioni. Durante il processo di ionizzazione, la stessa molecola può associarsi a differenti specie ioniche presenti nel solvente o nel tampone, generando ioni distinti che vengono registrati come segnali separati. Inoltre, la presenza naturale di isotopi determina la comparsa di picchi aggiuntivi a massa leggermente diversa rispetto allo ione principale. Inoltre, lievi variazioni del tempo di ritenzione o segnali parzialmente sovrapposti possono contribuire alla generazione di annotazioni multiple per lo stesso composto. Per tali motivi, i risultati forniti dal software richiedono una verifica manuale, finalizzata a confermare l'identificazione attraverso l'ispezione degli spettri di massa, dei tempi di ritenzione e della qualità del segnale, nonché alla rimozione di eventuali duplicati o assegnazioni non affidabili.

Il primo passaggio di verifica ha riguardato il confronto dei tempi di ritenzione osservati con quelli di riferimento riportati nella libreria sviluppata. I segnali che mostravano lievi scostamenti, compatibili con normali fluttuazioni strumentali, sono stati mantenuti, mentre quelli caratterizzati da differenze marcate sono stati esclusi dalla lista. A titolo esemplificativo, in Figura 12 sono riportati i cromatogrammi estratti e i relativi tempi di ritenzione di due metaboliti acquisiti in modalità HILIC positiva: l'acido pipecolico, per il quale si osserva una scarsa corrispondenza rispetto ai valori attesi, e l'indolo-3-aldeide, che mostra invece un buon accordo tra tempo di ritenzione e segnale rilevato.

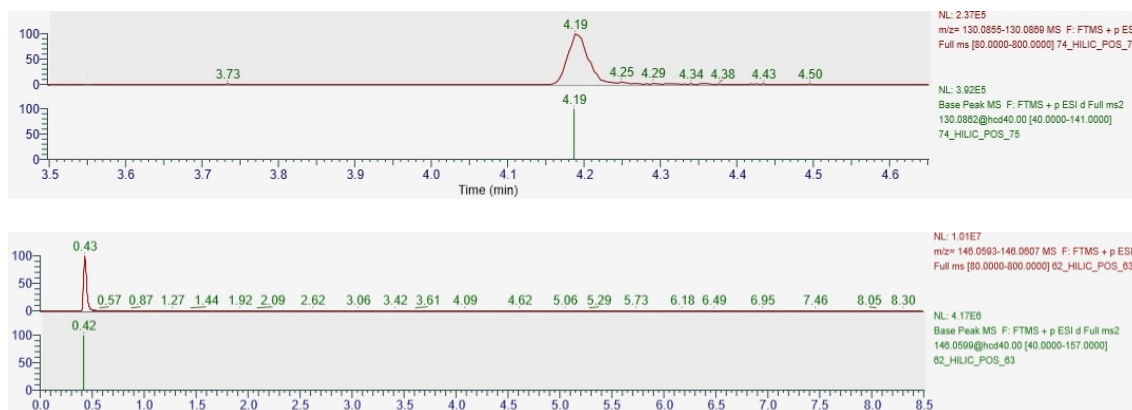


Figura 12. Cromatogrammi estratti in modalità HILIC positiva per acido pipecolico (in alto) e indolo-3-aldeide (in basso). I segnali MS¹ sono mostrati in rosso, mentre i segnali MS² in verde.

Dalla lista dei metaboliti rilevati (Figura 11) si osserva che nessuno dei tempi di ritenzione associati all'acido pipecolico corrisponde al valore riportato nella libreria di

riferimento, mentre il tempo di ritenzione dell'indolo-3-aldeide risulta comparabile a quello atteso.

Successivamente, è stato effettuato il confronto tra gli spettri di massa misurati e quelli attesi. Nei casi in cui uno o più picchi presentassero un errore di massa superiore a 5 ppm, tali segnali sarebbero stati considerati non affidabili ed esclusi dall'annotazione. A titolo esemplificativo, in Figura 13 sono riportati gli spettri attesi e quelli sperimentali degli stessi due metaboliti considerati in precedenza, acquisiti in modalità HILIC positiva: l'acido pipercolico, che mostra una scarsa corrispondenza tra spettro teorico e misurato, e l'indolo-3-aldeide, che presenta invece un buon accordo tra i dati attesi e quelli acquisiti.

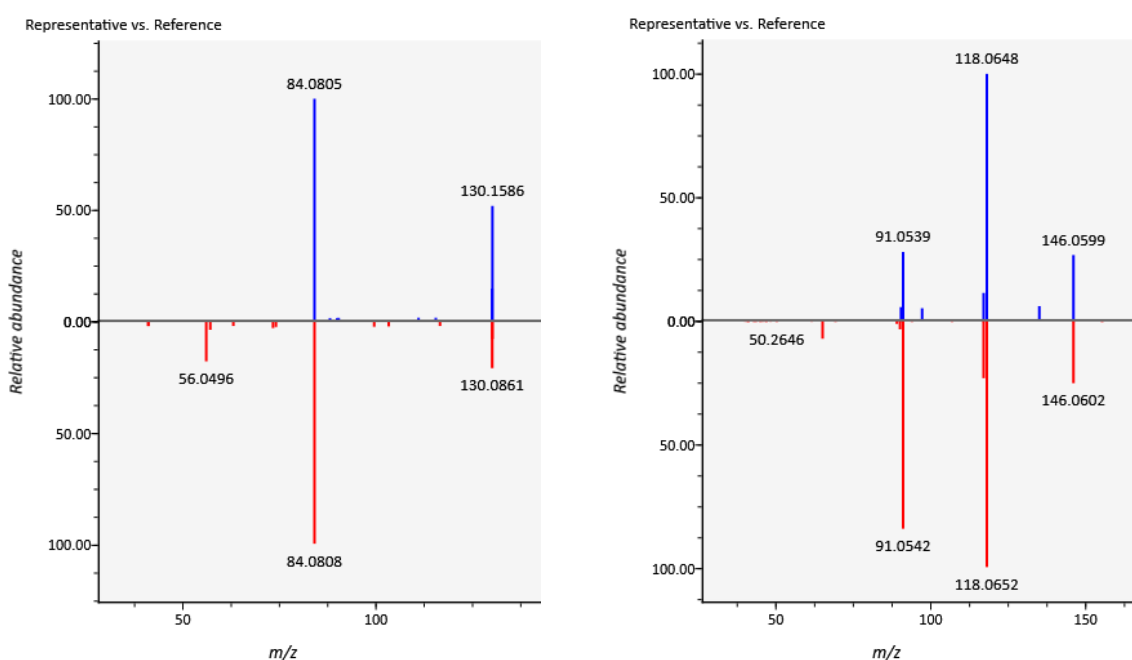


Figura 13. A sinistra gli spettri dell'acido pipercolico; a destra quelli dell'indolo-3-aldeide. In blu lo spettro sperimentale; in rosso quello atteso.

Si può osservare come, nel caso dell'indolo-3-aldeide, i principali frammenti presentino valori di massa e intensità comparabili tra spettro atteso e spettro sperimentale, indicando una buona corrispondenza e confermando l'affidabilità dell'identificazione. Al contrario, per l'acido pipercolico si rileva una marcata discrepanza tra il picco dello ione precursore atteso e quello misurato, con un errore di massa pari a 557 ppm, valore incompatibile con una corretta assegnazione e indicativo di un'errata identificazione. È comunque importante anche tenere in considerazione che frammenti a basso rapporto m/z sono spesso meno specifici, in quanto possono derivare da strutture comuni a numerose molecole, mentre i frammenti con m/z più elevato, più vicini allo ione precursore, tendono

a conservare una porzione più ampia della struttura originale e risultano generalmente più caratteristici del composto analizzato.

Nei casi in cui fossero ancora presenti duplicati, la selezione della feature più rappresentativa è stata effettuata valutando il rapporto segnale/rumore (signal/noise, S/N) e il valore di fill %. Il rapporto S/N consente di stimare la qualità del segnale analitico, privilegiando i picchi meglio definiti rispetto al rumore di fondo. Il fill % indica invece la percentuale di campioni nei quali il metabolita è stato rilevato: valori più elevati riflettono una presenza più consistente e riproducibile all'interno del set analitico.

I metaboliti rilevati in modalità HILIC positiva e negativa sono risultati pari a 8 utilizzando la libreria considerata più affidabile, e pari a 9 impiegando la libreria meno affidabile. Tali metaboliti sono riportati in Tabella 4, insieme alle informazioni relative alla formula chimica, al tipo di addotto, ai rapporti m/z, ai tempi di ritenzione (retention time, RT) e alla libreria spettrale utilizzata per l'identificazione.

Tabella 4. Metaboliti dei campioni di Lesch-Nyhan identificati mediante le librerie spettrali acquisite.

Metabolita	Formula	Addotto	m/z	RT (min)	Match libreria
Indole-3-aldehyde	C ₉ H ₇ NO	[M+H] ⁺	146,0605	0,62	Affidabile + Meno affidabile
Undecylenic acid	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	[M+H] ⁺	202,1801	3,51	Affidabile + Meno affidabile
Urocanic acid	C ₆ H ₆ N ₂ O ₂	[M-H] ⁻	137,0356	0,51	Affidabile + Meno affidabile
Adipic acid	C ₆ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	145,0506	0,46	Affidabile + Meno affidabile
3-Methyladipic acid	C ₇ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	159,0663	0,45	Affidabile + Meno affidabile
d-Pantothenic Acid	C ₉ H ₁₇ NO ₅	[M-H] ⁻	218,1029	0,51	Affidabile + Meno affidabile
2'-Deoxyguanosine 5'-monophosphate	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	[M-H] ⁻	346,0542	4,24	Affidabile + Meno affidabile
Phenyllactic acid	C ₉ H ₁₀ O ₃	[M-H] ⁻	165,0557	0,46	Meno affidabile

Nonostante la libreria considerata meno affidabile contenesse un numero maggiore di metaboliti, l'utilizzo di quest'ultima ha portato all'identificazione di un solo composto aggiuntivo rispetto alla libreria più affidabile. Questo risultato può essere spiegato dal fatto che l'identificazione non dipende esclusivamente dal numero di voci presenti nella libreria, ma anche dalla qualità degli spettri di riferimento, dalla coerenza dei tempi di ritenzione e dalla corrispondenza degli spettri di frammentazione. Una libreria più ampia ma meno curata può includere spettri meno rappresentativi o ridondanti, che non soddisfano i criteri di qualità richiesti per un'identificazione affidabile. Al contrario, una libreria più selezionata e validata consente identificazioni più robuste, limitando i falsi positivi.

Tra i metaboliti identificati, la 2'-deossiguanosina 5'-monofosfato potrebbe rappresentare un potenziale marker della sindrome di Lesch-Nyhan, in quanto direttamente coinvolta nel metabolismo delle purine, via metabolica alterata nella patologia.

4.3.2. Confronto con il database di riferimento

Il caricamento dei raw data su MS-DIAL è stato ripetuto utilizzando, come database di riferimento, quello impiegato dal gruppo di ricerca. L'obiettivo era verificare se gli analiti individuati (vedi Tabella 4) fossero presenti anche nella nuova lista ottenuta. Dal confronto è emerso che l'unico composto in comune risultava essere l'acido adipico. Questo risultato mette in evidenza l'importanza della libreria da me costruita: nonostante sia meno estesa rispetto al database di riferimento, essa ha permesso di riconoscere ulteriori features non precedentemente identificate. La costruzione della libreria si è quindi rivelata un passaggio cruciale del lavoro, contribuendo in modo concreto ad ampliare le informazioni ottenute dall'analisi.

4.4. Campioni biologici per l'analisi proteomica

I campioni di cellule Natural Killer e quelli delle microvescicole preparati secondo il protocollo descritto nella sezione Materiali e Metodi sono stati successivamente sottoposti ad analisi mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione su piattaforma *Orbitrap Exploris 480* (Thermo Fisher Scientific). Rispetto all'*Orbitrap Fusion*, l'*Orbitrap Exploris 480* presenta un'architettura strumentale più lineare, basato su un unico analizzatore Orbitrap accoppiato a una sorgente di frammentazione ad alta energia,

riducendo la complessità del percorso ionico e il numero di componenti coinvolti nell'analisi. Questa configurazione consente una maggiore stabilità operativa, una riduzione delle regolazioni strumentali necessarie e una maggiore riproducibilità delle acquisizioni nel tempo, risultando particolarmente indicato per studi proteomici.

I dati grezzi ottenuti sono stati quindi elaborati e analizzati dai membri del gruppo di ricerca mediante procedure dedicate di processamento e analisi statistica, al fine di valutare le differenze biologiche. Tali analisi esulano dagli obiettivi del presente lavoro, che si è focalizzato principalmente sulla preparazione dei campioni e sull'impostazione metodologica del workflow sperimentale.

CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi ha rappresentato per me un'esperienza estremamente stimolante e formativa, non solo dal punto di vista scientifico ma anche umano e professionale. L'attività svolta mi ha permesso di confrontarmi con il funzionamento reale di un contesto lavorativo e di ricerca, offrendo una prospettiva concreta e diversa rispetto all'esperienza prevalentemente teorica vissuta durante il percorso universitario. Questo confronto diretto mi ha aiutata a sviluppare maggiore autonomia, spirito critico e capacità di risolvere problemi, contribuendo ad ampliare la mia visione e ad aprire la mente verso nuove modalità di apprendimento e collaborazione.

La libreria sviluppata in questo lavoro rappresenta uno strumento utile per analisi future. Essa potrà essere integrata in MS-DIAL affiancandosi al database di riferimento già utilizzato dal software, permettendo così di ampliare le possibilità di identificazione e facilitare il riconoscimento di nuovi metaboliti. Inoltre, la libreria potrà essere ulteriormente espansa attraverso l'analisi di nuovi standard, consentendo di estendere progressivamente la copertura dei metaboliti e di migliorare la capacità di identificazione nelle indagini successive.

La fase di preparazione dei campioni reali mi ha permesso di comprendere concretamente il funzionamento di un laboratorio di ricerca in ambito clinico e di approfondire nuove conoscenze, sia teoriche sia pratiche. Parallelamente, il lavoro svolto sulla sindrome di Lesch-Nyhan mi ha consentito di osservare da vicino la collaborazione con il team medico coinvolto, evidenziando l'importanza di un confronto continuo per individuare le strategie più appropriate. Questo scambio interdisciplinare si è rivelato particolarmente stimolante e arricchente, contribuendo ad ampliare la mia visione del lavoro di ricerca.

In conclusione, questa esperienza ha rappresentato un passaggio fondamentale nel mio percorso di crescita, permettendomi di integrare conoscenze teoriche e competenze pratiche e consolidando la mia motivazione a proseguire nel campo della ricerca scientifica con maggiore consapevolezza, responsabilità ed entusiasmo.

Bibliografia

- [1] W. B. Dunn et al., “Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry,” *Nat. Protoc.*, vol. 6, no. 7, pp. 1060–1083, Jun. 2011, doi: 10.1038/nprot.2011.335.
- [2] W. Bittremieux, M. Wang, and P. C. Dorrestein, “The critical role that spectral libraries play in capturing the metabolomics community knowledge,” Dec. 01, 2022, Springer. doi: 10.1007/s11306-022-01947-y.
- [3] C. Frainay et al., “Mind the gap: Mapping mass spectral databases in genome-scale metabolic networks reveals poorly covered areas,” *Metabolites*, vol. 8, no. 3, Sep. 2018, doi: 10.3390/metabo8030051.
- [4] E. W. Deutsch et al., “Expanding the Use of Spectral Libraries in Proteomics,” Dec. 07, 2018, American Chemical Society. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00485.
- [5] C. Lavarello et al., “Development of an accurate mass retention time database for untargeted metabolomic analysis and its application to plasma and urine pediatric samples,” *Molecules*, vol. 26, no. 14, Jul. 2021, doi: 10.3390/molecules26144256.
- [6] A. C. Schrimpe-Rutledge, S. G. Codreanu, S. D. Sherrod, and J. A. McLean, “Untargeted Metabolomics Strategies—Challenges and Emerging Directions,” *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 27, no. 12, pp. 1897–1905, Dec. 2016, doi: 10.1007/s13361-016-1469-y.
- [7] J. E. Seegmiller, F. M. Rosenbloom, and W. N. Kelley, “Enzyme Defect Associated with a Sex-Linked Human Neurological Disorder and Excessive Purine Synthesis,” *Science (1979).*, vol. 155, no. 3770, pp. 1682–1684, Mar. 1967.
- [8] M. Lesch B.A. and W. L. Nyhan M.D., “A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function,” *Am. J. Med.*, vol. 36, no. 4, pp. 561–570, Apr. 1964.
- [9] Vivier Eric, Tomasello Elena, Baratin Myriam, Walzer Thierry, and Ugolini Sophie, “Functions of natural killer cells,” *Nat Immunol*, Mar. 2008, doi: 10.1038/ni1582.
- [10] L. Hou, S. Koutsogiannaki, and K. Yuki, “Multifaceted, unique role of CD11c in leukocyte biology,” 2025, *Frontiers Media SA*. doi: 10.3389/fimmu.2025.1556992.
- [11] A. H. Lee et al., “Dynamic molecular changes during the first week of human life follow a robust developmental trajectory,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-08794-x.

- [12] C. A. Murphy et al., “Unique Patterns of Circulating Extracellular Vesicles in Preterm Infants During Adaptation to Extra-Uterine Life,” *J. Extracell. Vesicles*, vol. 14, no. 4, Apr. 2025, doi: 10.1002/jev2.70064.
- [13] A. Rai et al., “Multi-omics identify hallmark protein and lipid features of small extracellular vesicles circulating in human plasma,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 27, no. 12, pp. 2167–2185, Dec. 2025, doi: 10.1038/s41556-025-01795-7.
- [14] K. Young, M. Benny, A. Schmidt, and S. Wu, “Unveiling the Emerging Role of Extracellular Vesicle–Inflammasomes in Hyperoxia-Induced Neonatal Lung and Brain Injury,” Dec. 01, 2024, Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). doi: 10.3390/cells13242094.
- [15] P. Phapale, A. Palmer, R. M. Gathungu, D. Kale, B. Brügger, and T. Alexandrov, “Public LC-Orbitrap-MS/MS Spectral Library for Metabolite Identification,” Nov. 22, 2020. doi: 10.1101/2020.11.21.392266.
- [16] C. Brungs et al., “MSnLib: efficient generation of open multi-stage fragmentation mass spectral libraries,” *Nat. Methods*, vol. 22, no. 10, pp. 2028–2031, Oct. 2025, doi: 10.1038/s41592-025-02813-0.
- [17] Y. Li et al., “Creation of a Plant Metabolite Spectral Library for Untargeted and Targeted Metabolomics,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 3, Feb. 2023, doi: 10.3390/ijms24032249.
- [18] S. An et al., “MetaPro: a web-based metabolomics application for LC-MS data batch inspection and library curation,” *Metabolomics*, vol. 19, no. 6, Jun. 2023, doi: 10.1007/s11306-023-02018-6.
- [19] L. Konermann, E. Ahadi, A. D. Rodriguez, and S. Vahidi, “Unraveling the mechanism of electrospray ionization,” *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 1, pp. 2–9, Jan. 2013, doi: 10.1021/ac302789c.
- [20] Á. Somogyi, “Mass spectrometry instrumentation and techniques,” 2008.
- [21] J. P. Savaryn, T. K. Toby, and N. L. Kelleher, “A researcher’s guide to mass spectrometry-based proteomics,” *Proteomics*, vol. 16, no. 18, pp. 2435–2443, Sep. 2016, doi: 10.1002/pmic.201600113.
- [22] D. J. Douglas, A. J. Frank, and D. Mao, “Linear ion traps in mass spectrometry,” Jan. 2005. doi: 10.1002/mas.20004.
- [23] R. A. Zubarev and A. Makarov, “Orbitrap mass spectrometry,” *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 11, pp. 5288–5296, Jun. 2013, doi: 10.1021/ac4001223.
- [24] T. Cajka, J. Hricko, L. Rudl Kulhava, M. Paucova, M. Novakova, and O. Kuda, “Optimization of Mobile Phase Modifiers for Fast LC-MS-Based Untargeted Metabolomics and Lipidomics,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 3, Feb. 2023, doi: 10.3390/ijms24031987.

- [25] X. Luo and L. Li, “Effects of Solvent Evaporation Methods and Short-Term Room Temperature Storage on High-Coverage Cellular Metabolome Analysis,” *Metabolites*, vol. 13, no. 10, Oct. 2023, doi: 10.3390/metabo13101052.
- [26] J. R. Wiśniewski and F. Z. Gaugaz, “Fast and sensitive total protein and peptide assays for proteomic analysis,” *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 8, pp. 4110–4116, Apr. 2015, doi: 10.1021/ac504689z.
- [27] D. B. Bekker-Jensen et al., “A compact quadrupole-orbitrap mass spectrometer with FAIMS interface improves proteome coverage in short LC gradients,” *Molecular and Cellular Proteomics*, vol. 19, no. 4, pp. 716–729, 2020, doi: 10.1074/mcp.TIR119.001906.
- [28] Evosep, “Evotip Pure simplifies workflows with excellent reproducibility, storage and recovery,” 2024.

Appendici

Appendice 1

KIT	PRYMARY NAME	MOLECULAR FORMULA	MONOISOTOPIC MOLECULAR MASS
V1-1KT	p-Aminobenzoic Acid	C ₇ H ₇ NO ₂	137,0476
	d-Biotin	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	244,0881
	Folic Acid	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	441,1396
	Niacinamide	C ₆ H ₆ N ₂ O	122,0480
	D-Pantothenic Acid	C ₉ H ₁₇ NO ₅	219,1106
	Pyridoxal	C ₈ H ₉ NO ₃	167,0582
	Pyridoxamine	C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₂	168,0898
	Pyridoxine	C ₈ H ₁₁ NO ₃	169,0738
	Riboflavin	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	376,1382
	Thiamine	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OS	265,1123
	α-Lipoic acid	C ₈ H ₁₄ O ₂ S ₂	206,0435
BACSMLS-1EA	5α-Cholestane	C ₂₇ H ₄₈	372,3756
	7-Dehydrocholesterol	C ₂₇ H ₄₄ O	384,3392
	5β-Cholestan-3α-ol	C ₂₇ H ₄₈ O	388,3705
	Deoxycholic acid	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	392,2927
	Brassicasterol	C ₂₈ H ₄₆ O	398,3549
	7α-Hydroxy-4-cholesten-3-one	C ₂₇ H ₄₄ O ₂	400,3341
	7β-Hydroxycholesterol	C ₂₇ H ₄₆ O ₂	402,3498
	Allocholic acid	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	408,2876
	Diosgenin	C ₂₇ H ₄₂ O ₃	414,3134

	7 α -hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic acid	C ₂₇ H ₄₂ O ₄	430,3083
	Glycochenodeoxycholic acid	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	449,3141
	Taurocholic acid	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	515,2917
	Cortisone	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	360,1937
	Cholesterol	C ₂₇ H ₄₆ O	386,3549
	Coprostanol	C ₂₇ H ₄₈ O	388,3705
	7-Ketocholesterol	C ₂₇ H ₄₄ O ₂	400,3341
	Cholesterol 5 α ,6 α -epoxide	C ₂₇ H ₄₆ O ₂	402,3498
	Beta-Muricholic acid	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	408,2876
	Cholesteryl acetate	C ₂₉ H ₄₈ O ₂	428,3654
	Cholesteryl palmitate	C ₄₃ H ₇₆ O ₂	624,5845
	Cholesteryl linoleate	C ₄₅ H ₇₆ O ₂	648,5845
	Cholesteryl oleate	C ₄₅ H ₇₈ O ₂	650,6002
	Cholesteryl stearate	C ₄₅ H ₈₀ O ₂	652,6158
	Cholesteryl behenate	C ₄₉ H ₈₈ O ₂	708,6784
	Desmosterol	C ₂₇ H ₄₄ O	384,3392
	Lathosterol	C ₂₇ H ₄₆ O	386,3549
	Dihydrocholesterol	C ₂₇ H ₄₈ O	388,3705
	7-Ketodeoxycholic acid	C ₂₄ H ₃₈ O ₅	406,2719
	Chenodeoxycholic acid	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	392,2927
	Ergosterol	C ₂₈ H ₄₄ O	396,3392
	Campesterol	C ₂₈ H ₄₈ O	400,6910
	24-Hydroxycholesterol	C ₂₇ H ₄₆ O ₂	402,3498
	Cholic acid	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	408,2876

	Stigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	412,3705
	β-Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	414,3862
	Lanosterol	C ₃₀ H ₅₀ O	426,3862
	Acetyl-DL-carnitine	C ₉ H ₁₇ NO ₄	203,1158
	2-Methylbutyrylcarnitine	C ₁₂ H ₂₃ NO ₄	245,1627
	Malonyl-carnitine	C ₁₀ H ₁₇ NO ₆	247,1056
	Hexanoylcarnitine	C ₁₃ H ₂₅ NO ₄	259,1784
	Dehydrolithocholic acid	C ₂₄ H ₃₈ O ₃	374,2821
	7-Ketochenodeoxycholate	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390,2770
	Hyodeoxycholic acid	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	392,2927
	Dehydrocholic acid	C ₂₄ H ₃₄ O ₅	402,2406
	Alpha-Muricholic acid	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	408,2876
	Glycolithocholic acid	C ₂₆ H ₄₃ NO ₄	433,3192
	Glycoursodeoxycholic acid	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	449,3141
	Glycocholic acid	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	465,3090
	Hydroxybutyrylcarnitine	C ₁₁ H ₂₁ NO ₅	247,1420
	Corticosterone	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	346,2144
	Lithocholic acid	C ₂₄ H ₄₀ O ₃	376,2978
	Nordeoxycholic acid	C ₂₃ H ₃₈ O ₄	378,2770
	Murideoxycholic acid	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	392,2927
	25-Hydroxycholesterol	C ₂₇ H ₄₆ O ₂	402,3498
	12-Ketochenodeoxycholic acid	C ₂₄ H ₃₈ O ₅	406,2719
	Gama-Muricholic acid	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	408,2876
	Coprocholic Acid	C ₂₇ H ₄₆ O ₅	450,3345

	Taurolithocholic acid	C ₂₆ H ₄₅ NO ₅ S	483,3018
	Taurodeoxycholic acid	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	499,2968
	Tauro-β-muricholic acid	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	515,2917
	Butanoylcarnitine	C ₁₁ H ₂₁ NO ₄	231,1471
	Adipoyl-L-carnitine	C ₁₃ H ₂₃ NO ₆	289,1525
	Decadienoylcarnitine	C ₁₇ H ₂₉ NO ₄	311,2097
	Decanoyl-L-carnitine	C ₁₇ H ₃₃ NO ₄	315,2410
	Dodecenoylcarnitine	C ₁₉ H ₃₅ NO ₄	341,2566
	Dodecanoylcarnitine	C ₁₉ H ₃₇ NO ₄	343,2723
	Ursodeoxycholic acid	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	392,2927
	27-Hydroxycholesterol	C ₂₇ H ₄₆ O ₂	402,3498
	Ursocholic acid	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	408,2876
	Tauroursodeoxycholic acid	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	499,2968
	Arachidonyl-L-carnitine	C ₃₁ H ₅₄ NO ₄	504,4053
	Tauromuricholic acid	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	515,2917
	L-Cartinine	C ₇ H ₁₅ NO ₃	161,1052
	Isobutyryl-L-carnitine	C ₁₁ H ₂₁ NO ₄	231,1471
	Isovaleryl-L-carnitine	C ₁₂ H ₂₃ NO ₄	245,1627
	Glutarylcarnitine	C ₁₂ H ₂₁ NO ₆	275,1369
	3-hydroxydodecanoyl carnitine	C ₁₉ H ₃₇ NO ₅	359,2672
	Propionyl-L-carnitine	C ₁₀ H ₁₉ NO ₄	217,1314
	Hexadecanoylcarnitine	C ₂₃ H ₄₅ NO ₄	399,3349
	7α-Hydroxycholesterol	C ₂₇ H ₄₆ O ₂	402,3498
	3-Hydroxyhexadecanoylcarnitine	C ₂₃ H ₄₅ NO ₅	415,3298

	Linoleyl carnitine	C ₂₅ H ₄₅ NO ₄	423,3349
	Glycohyodeoxcholic acid	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	449,3141
	Taurochenodesoxycholic acid	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	499,2968
	Propanoylcarnitine	C ₁₀ H ₁₉ NO ₄	217,1314
	Tiglylcarnitine	C ₁₂ H ₂₁ NO ₄	243,1471
	Valeryl-L-carnitine	C ₁₂ H ₂₃ NO ₄	245,1627
	Succinylcarnitine	C ₁₁ H ₁₉ NO ₆	261,1212
	Octenoyl-L-carnitine	C ₁₅ H ₂₇ NO ₄	285,1940
	Octanoyl-L-carnitine	C ₁₅ H ₂₉ NO ₄	287,2097
	Methylglutaryl-L-carnitine	C ₁₃ H ₂₃ NO ₆	289,1525
	Tetradecenoyl-L-carnitine	C ₂₁ H ₃₉ NO ₄	369,2879
	Myristoyl-L-carnitine	C ₂₁ H ₄₁ NO ₄	371,3036
	Oleoylecarnitine	C ₂₅ H ₄₇ NO ₄	425,3505
	Octadecanoylcarnitine	C ₂₅ H ₄₉ NO ₄	427,3662
	Glycodeoxycholic acid	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	449,3141
FAMLS-1EA	2-Methyl-2-butenedioic acid	C ₅ H ₆ O ₄	130,0266
	9Z-Tetradecenoic acid	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	226,1933
	12-Methyltridecanoic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228,2089
	2-Hydroxytetradecanoic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₃	244,2038
	14-methylpentadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256,2402
	14-Methylhexadecanoic acid	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270,2559
	2-Hydroxyhexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	272,2351
	16-Methylheptadecanoic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284,4772
	17-Methyloctadecanoic acid	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298,2872

	trans-11-Eicosenoic acid	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	310,2872
	Docosapentaenoic acid	C ₂₂ H ₃₄ O ₂	330,2559
	Heptacosanoic acid	C ₂₇ H ₅₄ O ₂	410,4124
	9Z,12Z,15Z-Octadecatrienoic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278,2246
	9Z-Octadecenoic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,2559
	8Z,11Z,14Z Eicosatrienoic acid	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	306,2559
	Eicosadienoic acid	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	308,2715
	Phytanic acid	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312,3028
	Heneicosanoic acid	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	326,3185
	Docosanoic acid	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	340,3341
	Tricosanoic acid	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	354,3498
	15-Tetracosenoic acid	C ₂₄ H ₄₆ O ₂	366,3498
	Tetracosanoic acid	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	368,3654
	Pentacosanoic acid	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	382,3811
	Octacosanoic acid	C ₂₈ H ₅₆ O ₂	424,4280
	Pentanoic acid	C ₅ H ₁₀ O ₂	102,0681
	Cis-2-Decenoic acid	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170,1307
	Undecanoic acid	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	186,1620
	Tridecanoic acid	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	214,1933
	Tetradecanoic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228,2089
	15-Methylhexadecanoic acid	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270,2559
	9,10-Methylene-9-octadecenoic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,2559
	Eicosapentaenoic acid	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	302,2246
	Eicosenoic acid	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	310,2872

	Eicosanoic acid	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312,3028
	7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-Docosapentaenoic acid	C ₂₂ H ₃₄ O ₂	330,2559
	Triacontanoic acid	C ₃₀ H ₆₀ O ₂	452,4593
	2-Ethyl-2-propenoic acid	C ₅ H ₈ O ₂	100,0524
	2-Methylbutyric acid	C ₅ H ₁₀ O ₂	102,0681
	2-Methyl-4-pentenoic acid	C ₆ H ₁₀ O ₂	114,0681
	2-Hydroxy-2-methylbutyric acid	C ₅ H ₁₀ O ₃	118,0630
	2-Ethyl-2-hydroxybutyric acid	C ₆ H ₁₂ O ₃	132,0786
	2,4-hexa-2,4-dienedioic acid	C ₆ H ₆ O ₄	142,0266
	2-Methylheptanoic acid	C ₈ H ₁₆ O ₂	144,1150
	3,3-dimethylpentanedioate	C ₇ H ₁₂ O ₄	160,0736
	5-Dodecenoic acid	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	198,1620
	17-Octadecynoic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280,2402
	12-Methyltetradecanoic acid	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242,2246
	9Z,11E-Octadecadienoic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280,2402
	2-methylbut-2-enoic acid	C ₅ H ₈ O ₂	100,0524
	2-Hydroxyhexanoic acid	C ₆ H ₁₂ O ₃	132,0786
	2-Octenoic acid	C ₈ H ₁₄ O ₂	142,0994
	Undecylenic acid	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	184,1463
	Dihydrolipoate	C ₈ H ₁₆ O ₂ S ₂	208,0592
	Dodec-2-enedioic acid	C ₁₂ H ₂₀ O ₄	228,1362
	Pentadecanoic acid	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242,2246
	Heptadecanoic acid	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270,2559
	Nonadecanoic acid	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298,2872

	Eicosatetraenoic acid	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	304,2402
	5Z,8Z,11Z Eicosatrienoic acid	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	306,2559
	Docosahexaenoic acid	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	328,2402
	Isobutyric acid	C ₄ H ₈ O ₂	88,0524
	3-Hydroxyoctanoic acid	C ₈ H ₁₆ O ₃	160,1099
	9-Decenoic acid	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170,1307
	Decanoic acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172,1463
	10-hydroxy-2-decenoic acid	C ₁₀ H ₁₈ O ₃	186,1256
	10-Hydroxydecanoic acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₃	188,1412
	cis-9-Hexadecenoic acid	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254,2246
	11-Octadecen-9-ynoic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278,2246
	9Z,12Z-Octadecadienoic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280,2402
	6-Octadecenoic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,2559
	10Z-Nonadecenoic acid	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296,2715
	10-Methyloctadecanoic acid	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298,2872
	2-Butenoic acid	C ₄ H ₆ O ₂	86,0368
	Hexanoic acid	C ₆ H ₁₂ O ₂	116,0837
	Heptanoic acid	C ₇ H ₁₄ O ₂	130,0994
	2-Hydroxy-4-methylpentanoic acid	C ₆ H ₁₂ O ₃	132,0786
	Octanoic acid	C ₈ H ₁₆ O ₂	144,1150
	Dodecanoic acid	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200,1776
	Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256,2402
	6Z,9Z,12Z,15Z-Octadecatetraenoic acid	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	276,2089
	6Z,9Z,12Z-Octadecatrienoic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278,2246

	Octadecanoic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284,2715
	13,16-docosadienoic acid	C ₂₂ H ₄₀ O ₂	336,3028
	Hexacosanoic acid	C ₂₆ H ₅₂ O ₂	396,3967
	Butanoic acid	C ₄ H ₈ O ₂	88,0524
	Isovaleric acid	C ₅ H ₁₀ O ₂	102,0681
	3-Hexenoic acid	C ₆ H ₁₀ O ₂	114,0681
	Nonanoic acid	C ₉ H ₁₈ O ₂	158,1307
	1,7-Dicarboxyheptane	C ₉ H ₁₆ O ₄	188,1049
	9E,11Z,13E-Octadecatrienoic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278,2246
	11-Octadecenoic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,2559
	12-hydroxy-9-cis-octadecenoic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₃	298,2508
	Trihydroxypalmitic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₅	304,2250
	Docosatetraenoic acid	C ₂₂ H ₃₆ O ₂	332,2715
	Docosatrienoic acid	C ₂₂ H ₃₈ O ₂	334,2872
	13Z-Docosenoic Acid	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	338,3185
OAMLS-1EA	2-Hydroxyisocaproic acid	C ₆ H ₁₂ O ₃	132,0786
	2-Hydroxyglutaric acid	C ₅ H ₈ O ₅	148,0372
	2,3-Dihydroxybutanedioic acid	C ₄ H ₆ O ₆	150,0164
	2-Hydroxyphenylacetic acid	C ₈ H ₈ O ₃	152,0473
	2-Methylbutyrylglycine	C ₇ H ₁₃ NO ₃	159,0895
	2-Hydroxyadipic acid	C ₆ H ₁₀ O ₅	162,0528
	3-(4-hydroxyphenyl)propanoic acid	C ₉ H ₁₀ O ₃	166,0630
	2-Octenedioic acid	C ₈ H ₁₂ O ₄	172,0736
	2-Isopropylmalic acid	C ₇ H ₁₂ O ₅	176,0685

	Indole-3-butyric acid	C ₁₂ H ₁₃ NO ₂	203,0946
	2-Methylcitric acid	C ₇ H ₁₀ O ₇	206,0427
	Phytic acid	C ₆ H ₁₈ O ₂₄ P ₆	659,8614
	2-Oxobutyric acid	C ₄ H ₆ O ₃	102,0317
	3-Hydroxybutyric acid	C ₄ H ₈ O ₃	104,0473
	2-Oxoisocaproic acid	C ₆ H ₁₀ O ₃	130,0630
	Oxalacetic acid	C ₄ H ₄ O ₅	132,0059
	2-Oxoglutaric acid	C ₅ H ₆ O ₅	146,0215
	2-Oxadipic acid	C ₆ H ₈ O ₅	160,0372
	3-Hydroxy-3-methylglutaric acid	C ₆ H ₁₀ O ₅	162,0528
	3-Hydroxymandelic acid	C ₈ H ₈ O ₄	168,0423
	1,2,3-Propanetricarboxylic acid	C ₆ H ₈ O ₆	176,0321
	3-(3-Hydroxyphenyl)-3-hydroxypropanoic acid	C ₉ H ₁₀ O ₄	182,0579
	Indole-3-propionic acid	C ₁₁ H ₁₁ NO ₂	189,0790
	3-(3-Methoxy-4hydroxyphenyl)lactate	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	212,0685
	4-Aminobutyric acid	C ₄ H ₉ NO ₂	103,0633
	2-Methyl-3-hydroxybutyric acid	C ₅ H ₁₀ O ₃	118,0630
	3-Methylglutaric acid	C ₆ H ₁₀ O ₄	146,0579
	3-Hydroxyglutarate	C ₅ H ₈ O ₅	148,0372
	3-Methylphenylacetic acid	C ₉ H ₁₀ O ₂	150,0681
	3-Methylcrotonylglycine	C ₇ H ₁₁ NO ₃	157,0739
	3-Methyladipic acid	C ₇ H ₁₂ O ₄	160,0736
	3-Propylmalic acid	C ₇ H ₁₂ O ₅	176,0685
	3-Hydroxysuberic acid	C ₈ H ₁₄ O ₅	190,0841

	Vanillylmandelic acid	C ₉ H ₁₀ O ₅	198,0528
	3-Hydroxydecanedioic acid	C ₁₀ H ₁₈ O ₅	218,1154
	3-Methoxy-4-hydroxyhippuric acid	C ₁₀ H ₁₁ NO ₅	225,0637
	Acetoacetic acid	C ₄ H ₆ O ₃	102,0317
	Alpha-aminobutyric acid	C ₄ H ₉ NO ₂	103,0633
	Alpha-ketoisovaleric acid	C ₅ H ₈ O ₃	116,0473
	2-Hydroxyisovaleric acid	C ₅ H ₁₀ O ₃	118,0630
	5-Oxoproline	C ₅ H ₇ NO ₃	129,0426
	5-Aminolevulinic acid	C ₅ H ₉ NO ₃	131,0582
	5-Hydroxypipicolinic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₃	145,0739
	4-Hydroxyphenylacetic acid	C ₈ H ₈ O ₃	152,0473
	Allantoin	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃	158,0440
	4-Pyridoxolactone	C ₈ H ₇ NO ₃	165,0426
	Aconitic acid	C ₆ H ₆ O ₆	174,0164
	Xanthurenic acid	C ₁₀ H ₇ NO ₄	205,0375
	Fumaric acid	C ₄ H ₄ O ₄	116,0110
	Benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₂	122,0368
	Citraconic acid	C ₅ H ₆ O ₄	130,0266
	Glutaric acid	C ₅ H ₈ O ₄	132,0423
	Adipic acid	C ₆ H ₁₀ O ₄	146,0579
	Furan-2,5-dicarboxylic acid	C ₆ H ₄ O ₅	156,0059
	Dihydroorotic acid	C ₅ H ₆ N ₂ O ₄	158,0328
	Ascorbic acid	C ₆ H ₈ O ₆	176,0321
	Hippuric acid	C ₉ H ₉ NO ₃	179,0582

	Citric acid	C ₆ H ₈ O ₇	192,0270
	Cinnamoylglycine-trans	C ₁₁ H ₁₁ NO ₃	205,0739
	Argininosuccinic acid	C ₁₀ H ₁₈ N ₄ O ₆	290,1226
	Maleic acid	C ₄ H ₄ O ₄	116,0110
	Indole-3-aldehyde	C ₉ H ₇ NO	145,0528
	Indole-3-carboxylic acid	C ₉ H ₇ NO ₂	161,0477
	Homogentisic acid	C ₈ H ₈ O ₄	168,0423
	Gallic acid	C ₇ H ₆ O ₅	170,0215
	Indole-3-acetic acid	C ₁₀ H ₉ NO ₂	175,0633
	Indoleacrylic acid	C ₁₁ H ₉ NO ₂	187,0633
	Kynurenic acid	C ₁₀ H ₇ NO ₃	189,0426
	Isocitric acid	C ₆ H ₈ O ₇	192,0270
	Indole-3-pyruvic acid	C ₁₁ H ₈ NO ₃	203,0582
	Indolelactic acid	C ₁₁ H ₁₁ NO ₃	205,0739
	Prephenic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₆	226,0477
	Methylmalonic acid	C ₄ H ₆ O ₄	118,0266
	Pipecolic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₂	129,0790
	Mevalonolactone	C ₆ H ₁₀ O ₃	130,0630
	Malic acid	C ₄ H ₆ O ₅	134,0215
	Phenylacetic acid	C ₈ H ₈ O ₂	136,0524
	Mevalonic acid	C ₆ H ₁₂ O ₄	148,0736
	Orotic acid	C ₅ H ₄ N ₂ O ₄	156,0171
	Phenylpyruvic acid	C ₉ H ₈ O ₃	164,0473
	Phenyllactic acid	C ₉ H ₁₀ O ₃	166,0630

	N-acetyl-aspartic acid	C ₆ H ₉ NO ₅	175,0481
	Quinic acid	C ₇ H ₁₂ O ₆	192,0634
	N-acetyl-tyrosine	C ₁₁ H ₁₃ NO ₄	223,0845
	3-hydroxyisobutyrate	C ₄ H ₈ O ₃	104,0473
	Succinic acid	C ₄ H ₆ O ₄	118,0266
	Glutaconic acid	C ₅ H ₆ O ₄	130,0266
	2-Hydroxy-3-methylvaleric acid	C ₆ H ₁₂ O ₃	132,0786
	Urocanic acid	C ₆ H ₆ N ₂ O ₂	138,0429
	3-Hydroxyadipic 3,6 lactone	C ₆ H ₈ O ₄	144,0423
	Tiglylglycine	C ₇ H ₁₁ NO ₃	157,0739
	Succinylacetone	C ₇ H ₁₀ O ₄	158,0579
	3-Hydroxyadipic acid	C ₆ H ₁₀ O ₅	162,0528
	Quinolinic acid	C ₇ H ₅ NO ₄	167,0219
	4-Hydroxyphenylpyruvic acid	C ₉ H ₈ O ₄	180,0423
	4-Hydroxyphenyllactic acid	C ₉ H ₁₀ O ₄	182,0579
ML0010-1KT	Acetyl coenzyme A	C ₂₃ H ₃₅ N ₇ O ₁₇ P ₃ S	806,1022
	Citric acid	C ₆ O ₇ H ₈	192,0270
	Fumaric Acid	C ₄ H ₄ O ₄	116,0109
	L-(-)-Malic acid	C ₄ H ₆ O ₅	134,0215
	Oxaloacetic acid	C ₄ H ₄ O ₅	132,0058
	Pyruvic Acid	C ₃ H ₄ O ₃	88,0160
	Succinyl coenzyme A	C ₂₅ H ₄₀ N ₇ O ₁₉ P ₃ S	867,1312
	Succinic Acid	C ₄ H ₆ O ₄	118,0266
	α-Ketoglutaric Acid	C ₅ H ₆ O ₅	146,0215

47264	Acetic acid	CH ₃ COOH	60,0211
	Adipic acid	C ₆ H ₁₀ O ₄	146,0579
	L-Ascorbic acid	C ₆ H ₈ O ₆	176,0320
	Benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₂	122,0367
	Butyric acid	C ₄ H ₈ O ₂	88,0524
	Citric acid	C ₆ H ₈ O ₇	192,0270
	Isobutyric acid	C ₄ H ₈ O ₂	88,0524
	Formic acid	CH ₂ O ₂	46,0054
	L-(+)-Lactic acid	C ₃ H ₆ O ₃	90,0316
	DL-Isocitric acid	C ₆ H ₈ O ₇	192,0270
	Maleic acid	C ₄ H ₄ O ₄	116,0109
	Malonic acid	C ₃ H ₄ O ₄	104,0109
	D-(+)-Malic acid	C ₄ H ₆ O ₅	134,0215
	Oxalic acid	C ₂ H ₂ O ₄	89,9953
	Phytic acid	C ₆ H ₁₈ O ₂₄ P ₆	659,8613
	Propionic acid	C ₃ H ₆ O ₂	74,0367
	(-)Quinic acid	C ₇ H ₁₂ O ₆	192,0633
	Succinic acid	C ₄ H ₆ O ₄	118,0266
	Shikimic acid	C ₇ H ₁₀ O ₅	174,0528
	D-(–)-Tartaric acid	C ₄ H ₆ O ₆	150,0164
Standard singoli	L-Serine	C ₃ H ₇ NO ₃	105,0425
	Tetrahydrofolic Acid	C ₁₉ H ₂₃ N ₇ O ₆	445,1709
	L-methionine-d3	C ₅ H ₈ D ₃ NO ₂ S	152,0698
	Dihydrofolic acid	C ₁₉ H ₂₁ N ₇ O ₆	443,1553

	2'-Deoxyguanosine 5'-monophosphate	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	347,0630
	5'-Thymidylic acid	C ₁₀ H ₁₅ N ₂ O ₈ P	322,0566
	2'-Deoxycytidine-5'-monophosphate	C ₉ H ₁₄ N ₃ O ₇ P	307,0569
	2'-Deoxyadenosine-5'-monophosphate	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₆ P	331,0681
	Folitixorin	C ₂₀ H ₂₃ N ₇ O ₆	457,1709
	Deoxyuridine 5'-monophosphate	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₈ P	308,0409
	5-Methyltetrahydrofolic Acid	C ₂₀ H ₂₅ N ₇ O ₆	459,1866
	10-Formyltetrahydrofolate	C ₂₀ H ₂₃ N ₇ O ₇	473,1658

Appendice 2

```
Thermo Scientific SII for Xcalibur Method

---- Overview ----
Name: New Instrument Method
Comment:
Run time: 7.000 [min]
Instrument: VANQUISH on s04-fusion
Description:
---- Script ----
initial      Instrument Setup
              ColumnComp.PCC.TempCtrl: Off
              ColumnComp.CC.FanSpeed: 5
              ColumnComp.CC.Mode: ForcedAir
              ColumnComp.CC.ReadyTempDelta: 0.50 [°C]
              ColumnComp.CC.TempCtrl: On
              ColumnComp.CC.Temperature.Nominal: 45.00 [°C]
              ColumnComp.CC.EquilibrationTime: 1.0 [min]
              SamplerModule.Sampler.DrawSpeed: 5.000 [µl/s]
              SamplerModule.Sampler.DispenseSpeed: 5.000 [µl/s]
              SamplerModule.Sampler.PunctureOffset: 20 [µm]
              SamplerModule.Sampler.WashTime: 40.0 [s]
              SamplerModule.Sampler.WashSpeed: 40.0 [µl/s]
              SamplerModule.Sampler.InjectWashMode: Both
              SamplerModule.Sampler.Pump: "Pump"
              SamplerModule.Sampler.InjectMode: Normal
              SamplerModule.TempCtrl: On
              SamplerModule.Temperature.Nominal: 5.0 [°C]
              PumpModule.Pump.%B_Selector: %B3
              PumpModule.Pump.%A_Selector: %A3
              PumpModule.Pump.%A3_Equate: "H2O+10mM Amm Form+0.1%AF"
              PumpModule.Pump.%B3_Equate: "ACN:H2O 95:5+10mM Amm Form+0.1%AF"
              PumpModule.Pump.Pressure.LowerLimit: 0 [bar]
              PumpModule.Pump.Pressure.UpperLimit: 890 [bar]
              PumpModule.Pump.MaximumFlowRampUp: Infinite
              PumpModule.Pump.MaximumFlowRampDown: Infinite
              ColumnComp.UpperValve.CurrentPosition: 6_1
0.000 [min]  Equilibration
              PumpModule.Pump.%B.Value: 1.0 [%]
              PumpModule.Pump.Curve: 5
              PumpModule.Pump.Flow.Nominal: 0.400 [ml/min]
0.000 [min]  Inject Preparation
              Wait ColumnComp.Ready And SamplerModule.Sampler.Ready And PumpModule.Pump.Ready
0.000 [min]  Inject
              SamplerModule.Sampler.Inject
0.000 [min]  Start Run
              ColumnComp.CC.Temp.AcqOn
              ColumnComp.PCC.Temp.AcqOn
              PumpModule.Pump.Pump_Pressure.AcqOn
0.000 [min]  Run
0.500 [min]
```

```

Thermo Scientific SII for Xcalibur Method

      PumpModule.Pump.Flow.Nominal: 0.400 [ml/min]
      PumpModule.Pump.%B.Value: 1.0 [%]
      PumpModule.Pump.Curve: 5
4.000 [min]
      PumpModule.Pump.Flow.Nominal: 0.400 [ml/min]
      PumpModule.Pump.%B.Value: 99.0 [%]
      PumpModule.Pump.Curve: 5
5.000 [min]
      PumpModule.Pump.Flow.Nominal: 0.400 [ml/min]
      PumpModule.Pump.%B.Value: 99.0 [%]
      PumpModule.Pump.Curve: 5
5.100 [min]
      PumpModule.Pump.Flow.Nominal: 0.400 [ml/min]
      PumpModule.Pump.%B.Value: 1.0 [%]
      PumpModule.Pump.Curve: 5
7.000 [min] Stop Run
      ColumnComp.CC_Temp.AcqOff
      ColumnComp.PCC_Temp.AcqOff
      PumpModule.Pump.Pump_Pressure.AcqOff

```

Appendice 3

```
Thermo Scientific SII for Xcalibur Method

---- Overview ----
Name: New Instrument Method
Comment:
Run time: 8.500 [min]
Instrument: VANQUISH on s04-fusion
Description:
---- Script ----
initial      Instrument Setup
              ColumnComp.PCC.TempCtrl: Off
              ColumnComp.CC.FanSpeed: 5
              ColumnComp.CC.Mode: ForcedAir
              ColumnComp.CC.ReadyTempDelta: 0.50 [°C]
              ColumnComp.CC.TempCtrl: On
              ColumnComp.CC.Temperature.Nominal: 45.00 [°C]
              ColumnComp.CC.EquilibrationTime: 1.0 [min]
              SamplerModule.Sampler.DrawSpeed: 0.500 [µl/s]
              SamplerModule.Sampler.DispenseSpeed: 1.000 [µl/s]
              SamplerModule.Sampler.PunctureOffset: 20 [µm]
              SamplerModule.Sampler.WashTime: 40.0 [s]
              SamplerModule.Sampler.WashSpeed: 40.0 [µl/s]
              SamplerModule.Sampler.InjectWashMode: AfterDraw
              SamplerModule.Sampler.Pump: "Pump"
              SamplerModule.Sampler.InjectMode: Normal
              SamplerModule.TempCtrl: On
              SamplerModule.Temperature.Nominal: 5.0 [°C]
              PumpModule.Pump.%B_Selector: %B3
              PumpModule.Pump.%A_Selector: %A3
              PumpModule.Pump.%A3_Equate: "H2O - Ammonio Formiato - Ac Formico"
              PumpModule.Pump.%B3_Equate: "ACN/H2O - Ammonio Formiato - Ac Formico"
              PumpModule.Pump.Pressure.LowerLimit: 0 [bar]
              PumpModule.Pump.Pressure.UpperLimit: 890 [bar]
              PumpModule.Pump.MaximumFlowRampUp: Infinite
              PumpModule.Pump.MaximumFlowRampDown: Infinite
              ColumnComp.UpperValve.CurrentPosition: 1_2
0.000 [min] Equilibration
              PumpModule.Pump.Flow.Nominal: 0.400 [ml/min]
              PumpModule.Pump.%B.Value: 100.0 [%]
              PumpModule.Pump.Curve: 5
0.000 [min] Inject Preparation
              Wait ColumnComp.Ready And SamplerModule.Sampler.Ready And PumpModule.Pump.Ready
0.000 [min] Inject
              SamplerModule.Sampler.Inject
0.000 [min] Start Run
              ColumnComp.CC_Temp.AcqOn
              ColumnComp.PCC_Temp.AcqOn
              PumpModule.Pump.Pump_Pressure.AcqOn
0.000 [min] Run
              PumpModule.Pump.Flow.Nominal: 0.400 [ml/min]
```

```

Thermo Scientific SII for Xcalibur Method

      PumpModule.Pump.%B.Value: 100.0 [%]
      PumpModule.Pump.Curve: 5
1.000 [min]
      PumpModule.Pump.Flow.Nominal: 0.400 [ml/min]
      PumpModule.Pump.%B.Value: 100.0 [%]
      PumpModule.Pump.Curve: 5
3.900 [min]
      PumpModule.Pump.Flow.Nominal: 0.400 [ml/min]
      PumpModule.Pump.%B.Value: 70.0 [%]
      PumpModule.Pump.Curve: 5
5.100 [min]
      PumpModule.Pump.Flow.Nominal: 0.400 [ml/min]
      PumpModule.Pump.%B.Value: 30.0 [%]
      PumpModule.Pump.Curve: 5
6.400 [min]
      PumpModule.Pump.Flow.Nominal: 0.400 [ml/min]
      PumpModule.Pump.%B.Value: 100.0 [%]
      PumpModule.Pump.Curve: 5
7.500 [min]
      PumpModule.Pump.Flow.Nominal: 0.400 [ml/min]
      PumpModule.Pump.%B.Value: 100.0 [%]
      PumpModule.Pump.Curve: 5
8.500 [min] Stop Run
      ColumnComp.CC_Temp.AcqOff
      ColumnComp.PCC_Temp.AcqOff
      PumpModule.Pump.Pump_Pressure.AcqOff

```

Appendice 4

Method Summary

Method Settings

Application Mode: **Small Molecule**
Method Duration (min): **7**

Global Parameters

Ion Source

Ion Source Type: **H-ESI**
Spray Voltage: **Static**
Positive Ion (V): **3300**
Negative Ion (V): **3000**
Gas Mode: **Static**
Sheath Gas (Arb): **35**
Aux Gas (Arb): **15**
Sweep Gas (Arb): **0**
Ion Transfer Tube Temp (°C): **275**
Vaporizer Temp (°C): **300**
APPI Lamp: **Not in Use**
Use Ion Source Settings from Tune: **False**
FAIMS Mode: **Not Installed**

MS Global Settings

Infusion Mode: **Liquid Chromatography**
Expected LC Peak Width (s): **8**
Advanced Peak Determination: **False**
Mild Trapping: **False**
Default Charge State: **1**
Enable Xcalibur AcquireX method modifications: **False**
Internal Mass Calibration: **RunStart EASY-IC™**

Experiment #1 [MS]

Start Time (min): **0**
End Time (min): **7**

Master Scan:

MS OT

Detector Type: **Orbitrap**
Orbitrap Resolution: **30000**
Mass Range: **Normal**
Use Quadrupole Isolation: **False**
Scan Range (m/z): **140-720**
RF Lens (%): **55**
AGC Target: **Standard**
Maximum Injection Time Mode: **Auto**
Microscans: **1**
Data Type: **Profile**
Polarity: **Positive**
Source Fragmentation: **Disabled**
Scan Description:

Filters:

Intensity

Filter Type: **Intensity Threshold**
Intensity Threshold: **5.0e3**

Dynamic Exclusion

Exclude after n times: **1**
Exclusion duration (s): **2**
Mass Tolerance: **ppm**
Low: **10**
High: **10**
Exclude Isotopes: **True**
Perform dependent scan on single charge state per precursor only: **False**
Exclude Within Cycle: **True**

Data Dependent

Data Dependent Mode: **Number of Scans**
Number of Dependent Scans: **3**

Scan Event Type 1:

Scan:

ddMS² OT HCD

Scan Priority: **1**
Isolation Mode: **Quadrupole**
Isolation Window (m/z): **1.5**
Isolation Offset: **Off**
Activation Type: **HCD**
Collision Energy Mode: **Stepped**
HCD Collision Energy Type: **Normalized**
HCD Collision Energies (%): **20,40,60**
Detector Type: **Orbitrap**
Orbitrap Resolution: **15000**
Mass Range: **Normal**
Scan Range Mode: **Auto**
AGC Target: **Standard**
Maximum Injection Time Mode: **Auto**
Microscans: **1**
Data Type: **Profile**
Scan Description:

Scan Event Type 2:

Scan:

ddMS² IT HCD

Scan Priority: **1**
Isolation Mode: **Quadrupole**
Isolation Window (m/z): **1.5**
Isolation Offset: **Off**
Activation Type: **HCD**
Collision Energy Mode: **Stepped**
HCD Collision Energy Type: **Normalized**
HCD Collision Energies (%): **20,40,60**
Detector Type: **Ion Trap**
Ion Trap Scan Rate: **Normal**
Mass Range: **Normal**
Scan Range Mode: **Auto**
AGC Target: **Standard**
Maximum Injection Time Mode: **Auto**
Microscans: **1**
Data Type: **Centroid**
Scan Description:

Appendice 5

Method Summary

Method Settings

Application Mode: **Small Molecule**
Method Duration (min): **7**

Global Parameters

Ion Source

Ion Source Type: **H-ESI**
Spray Voltage: **Static**
Positive Ion (V): **3300**
Negative Ion (V): **3000**
Gas Mode: **Static**
Sheath Gas (Arb): **35**
Aux Gas (Arb): **15**
Sweep Gas (Arb): **0**
Ion Transfer Tube Temp (°C): **275**
Vaporizer Temp (°C): **300**
APPI Lamp: **Not in Use**
Use Ion Source Settings from Tune: **False**
FAIMS Mode: **Not Installed**

MS Global Settings

Infusion Mode: **Liquid Chromatography**
Expected LC Peak Width (s): **8**
Advanced Peak Determination: **False**
Mild Trapping: **False**
Default Charge State: **1**
Enable Xcalibur AcquireX method modifications: **False**
Internal Mass Calibration: **RunStart EASY-IC™**

Experiment #1 [MS]

Start Time (min): **0**
End Time (min): **7**

Master Scan:

MS OT

Detector Type: **Orbitrap**
Orbitrap Resolution: **30000**
Mass Range: **Normal**
Use Quadrupole Isolation: **False**
Scan Range (m/z): **140-720**
RF Lens (%): **55**
AGC Target: **Standard**
Maximum Injection Time Mode: **Auto**
Microscans: **1**
Data Type: **Profile**
Polarity: **Negative**
Source Fragmentation: **Disabled**
Scan Description:

Filters:

Intensity

Filter Type: **Intensity Threshold**
Intensity Threshold: **5.0e3**

Dynamic Exclusion

Exclude after n times: **1**
Exclusion duration (s): **2**
Mass Tolerance: **ppm**
Low: **10**
High: **10**
Exclude Isotopes: **True**
Perform dependent scan on single charge state per precursor only: **False**
Exclude Within Cycle: **True**

Data Dependent

Data Dependent Mode: **Number of Scans**
Number of Dependent Scans: **3**

Scan Event Type 1:

Scan:

ddMS² OT HCD

Scan Priority: **1**
Isolation Mode: **Quadrupole**
Isolation Window (m/z): **1.5**
Isolation Offset: **Off**
Activation Type: **HCD**
Collision Energy Mode: **Stepped**
HCD Collision Energy Type: **Normalized**
HCD Collision Energies (%): **20,40,60**
Detector Type: **Orbitrap**
Orbitrap Resolution: **15000**
Mass Range: **Normal**
Scan Range Mode: **Auto**
AGC Target: **Standard**
Maximum Injection Time Mode: **Auto**
Microscans: **1**
Data Type: **Profile**
Scan Description:

Scan Event Type 2:

Scan:

ddMS² IT HCD

Scan Priority: **1**
Isolation Mode: **Quadrupole**
Isolation Window (m/z): **1.5**
Isolation Offset: **Off**
Activation Type: **HCD**
Collision Energy Mode: **Stepped**
HCD Collision Energy Type: **Normalized**
HCD Collision Energies (%): **20,40,60**
Detector Type: **Ion Trap**
Ion Trap Scan Rate: **Normal**
Mass Range: **Normal**
Scan Range Mode: **Auto**
AGC Target: **Standard**
Maximum Injection Time Mode: **Auto**
Microscans: **1**
Data Type: **Centroid**
Scan Description: