

UNITECH
COSPECT



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI MILANO



2° SSM

Seminario di Spettrometria di Massa
Dipartimento di Chimica
UNITECH COSPECT

21-22 giugno 2018

Aula C03 via Mangiagalli 25 - MILANO

Giornata di studio dedicata all'applicazione della spettrometria di massa in campo ambientale, farmaceutico, alimentare, clinico.

L'evento è articolato in una giornata e mezza e contiene due sessioni poster.

E' previsto un premio per il miglior poster.

Comitato scientifico

Alessandro Caselli

Ermelinda Falletta

Rita Annunziata

Enrico Caneva

Laura Prati

Comitato organizzatore

Alessandro Caselli

Ermelinda Falletta

Manuela Gilberti

Enrico Caneva



Società Chimica Italiana
Divisione di Spettrometria
di Massa

ThermoFisher
SCIENTIFIC


PerkinElmer
For the Better

Corso di Dottorato in Chimica
Corso di Dottorato in Chimica Industriale

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

 **SHIMADZU**
Excellence in Science

METODO UPLC-MS-MS CON DILUIZIONE ISOTOPICA PER L'ANALISI DI MELATONINA, TRIPTOFANO E METABOLITI INDOLICI CORRELATI. APPLICAZIONI PILOTA A MATRICI COMPLESSE DI ORIGINE VEGETALE ED UMANA.

¹Rita Paroni, ¹Michele DeCas, ¹Jessica Rizzo, ¹Federico Calvi, ²Giovanni Mistraretti, ¹Michele Samaja, ³Marcello Iriti, ¹Federico Maria Rubino

¹Dipartimento di Scienze della Salute, ² Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, ³Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali - Produzione, Territorio, Agroenergia.

RAZIONALE. La melatonina (MLT) è un potente neuroormone prodotto in tracce dal triptofano nella ghiandola pineale dei mammiferi e coinvolto in molte funzioni fisiologiche: la regolazione dei ritmi circadiani di sonno-veglia, l'immuno-stimolazione, la difesa antiossidante e dai tumori (1). Le piante producono MLT con funzioni simili: aumentare la resistenza allo stress, regolare i ritmi circadiani, promuovere la germinazione e la maturazione. Anche lieviti come *Saccharomyces cerevisiae* e altri ceppi producono MLT durante la vinificazione. Lo scopo della ricerca è ottimizzare una procedura analitica per identificare e quantificare l'insieme dei metaboliti indolici del triptofano (indoloma) in matrici complesse vegetali e animali, per selezionare microorganismi allo-produttori di MLT per l'alimentazione, misurare la farmacocinetica di MLT somministrata secondo diverse vie e formulazioni farmaceutiche a confronto con un kit ELISA e studiare l'indoloma plasmatico di soggetti sottoposti a deregolazione dei cicli di buio-luce.

MATERIALI E METODI. L'analisi impiega un sistema di cromatografia liquida – spettrometria di massa composto da un cromatografo Dionex UltiMate® 3000 LC Systems (con auto-campionatore, pompa binaria e termostato) e da uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo AB Sciex 3200 QTRAP®. La colonna UPLC è una Agilent Zorbax® Bonus-RP 80A Amide (3x100 mm; 3,5 µm). Come standard interni sono utilizzati la 5-F-Triptamina per tutti gli indoli, il D5-Ar-Triptofano e la OCD₂-MLT per i rispettivi analiti. La separazione cromatografica è ottenuta con un gradiente di acido formico allo 0,1% e formato di ammonio 5 mM in acqua (A) e acido formico 0,1% in metanolo (B), flusso 0,4 ml/min, volume di iniezione 10 µl, tempo totale di analisi 10 min. La preparazione dei campioni impiega la precipitazione delle proteine con acetonitrile - 0,1% acido formico e la SPE con cartucce Supelco HybridSPE-Phospholipid (30mg, 1 ml).

RISULTATI.

La scelta delle transizioni analitiche e delle condizioni strumentali ottimali è stata ottenuta con lo studio preliminare mediante infusione in modalità di ionizzazione positiva di 11 composti (soluzioni singole, ~0,8 nM). Sono state misurate, con la funzione Ramp del software Analyst, le curve del Declustering Potential (DP) dello strumento (intervallo di ΔV tra 0 e 70-90 V) e le curve di abbondanza dei frammenti in funzione dell'energia di collisione (curve di breakdown nell'intervallo di ΔV tra 0 e 50-70 V). Tutte le elaborazioni

sono state eseguite, a partire dai dati del software Analyst esportati come file txt, in fogli di calcolo personalizzati (2), che calcolano i valori dei potenziali strumentali corrispondenti alla resa massima dei frammenti ionici identificati come reporter analitici, che sono stati poi utilizzati nel metodo finale.

Il metodo cromatografico sviluppato separa e analizza 11 composti indolici in 10 min, con curve di calibrazione lineari (R²>0,998) nei due intervalli utili di concentrazione 0,012-1,25 ng (curva bassa) e 1,25-10 ng (curva alta). La presenza di triptofano ad elevate concentrazioni (69,7 e 18,4 µg/ml, rispettivamente) in terreni YPD e YNB utilizzati per la



fermentazione di lieviti è stata confermata, mentre tutti gli altri indoli ricercati sono risultati assenti. In estratti metanolici di farina di semi di soia è stato misurato triptofano libero (2,72 e 3,12 mg/g) e sono state identificate tracce di N-acetil-5OH-Triptamina (0,16 e 0,16 µg/g) e di MLT (5,65 e 0,95 µg/g). Questo metodo ha inoltre consentito di quantificare MLT nel plasma per lo studio di diverse formulazioni farmaceutiche e per la validazione dei suoi ritmi circadiani nell'uomo.

1. Lionella Palego, Laura Betti, Alessandra Rossi, Gino Giannaccini. Journal of Amino Acids Volume 2016, Article ID 8952520, 13 pageshttp://dx.doi.org/10.1155/2016/8952520
2. Rubino et al., Rapid Communications in Mass Spectrometry, 22(23), pp. 3935–3948, doi: 10.1002/rcm.3810.

ID-UPLC-MS-MS ANALYSIS OF MELATONIN, TRYPTOPHAN AND RELATED INDOLIC METABOLITES: PILOT APPLICATIONS TO VEGETABLE AND HUMAN MATRICES

¹Rita Paroni, ¹Michele Dei Cas, ¹Jessica Rizzo, ¹Federico Calvi, ²Giovanni Mistraretti, ³Roberto Foschino, ⁴Marcello Iriti, ¹Federico Maria Rubino

¹Dipartimento di Scienze della Salute, ²Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, ³Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente ⁴Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali-Produzione, Territorio, Agroenergia.

INTRODUCTION:

Melatonin (MLT) is a potent neurohormone produced in traces by tryptophan in the pineal gland of mammals (fig 1) and involved in many physiological functions: the regulation of circadian rhythms of sleep-wake, immunostimulation, antioxidant defense and tumors. Plants produce MLT with similar functions: increase stress resistance, regulate circadian rhythms, promote germination and maturation. Some studies have pointed out the ability of *S. Cerevisiae* and other yeast strains to produce MLT during the fermentation step.

AIMS:

- 1) to optimize an analytical procedure to identify and quantify the set of tryptophan indole metabolites in complex plant and animal matrices
- 2) to select MLT high-producer microorganisms for the diet
- 3) to measure the pharmacokinetics of MLT administered to critically ill patients according to different pathways and pharmaceutical formulations

MELATONIN BIOSYNTHESIS

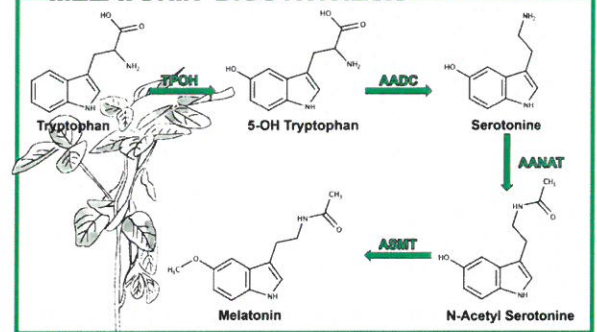


Fig. 1: Biosynthesis of melatonin from tryptophan: TPOH Tryptophan-5-hydroxylase, AADC Aromatic L-amino acid decarboxylase, AANAT Aralkylamine N-acetyltransferase and ASMT N-Acetylserotonin O-methyltransferase

ID-UPLC-MS-MS METHOD:

After direct infusion of standard solutions (0.8 nM) the best fragmentation transitions were identified (fig. 2) for all the 11 indole compounds, and compound-dependent and independent parameters were optimized (fig. 3). Chromatographic conditions were chosen in order to obtain rapid resolution (10 min) of the 11 compounds (fig. 4). Standard curves were linear ($R^2 > 0,998$) for each analyte over the respective concentration intervals suited for the measurement in the submitted samples.

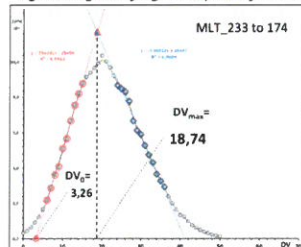
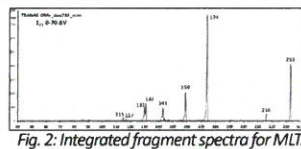


Fig. 3: Elaboration of m/z 174 fragment abundance curve of MLT to obtain the collision energy corresponding to the maximum yield of the selected fragment.

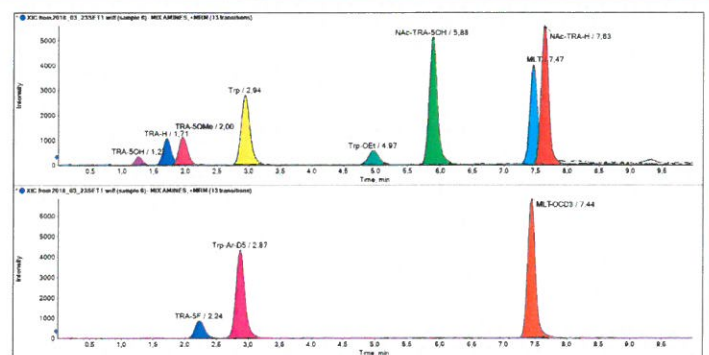


Fig. 4: Chromatogram of 11 compounds. Upper: the traces of 8 analytes in order: serotonin (TRA-SO-H), tryptamine (TRA-H), 5-methoxytryptamine (TRA-SO-Me), tryptophan (TRP), thryptophan-ethylester (TRP-OEt), N-acetylserotonin (Nac-TRA-SO-H), melatonin (MLT), N-acetyltryptamine (Nac-TRA-H). Lower: the traces of 3 internal standards in order: 5-fluorotryptamine (TRA-SF), D5-thryptophan (TRP-Ar-D5), D3-melatonin (MLT-OC-D3).

APPLICATIONS:

ZB FERMENTATION

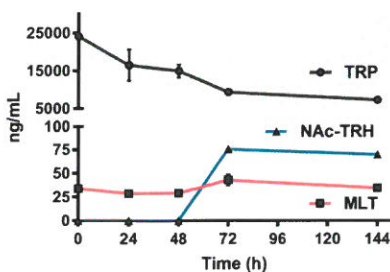


Fig. 5: Indolomincs quantification after incubation, in YNB medium enriched with TRP, of the yeast *Zygosaccharomyces bailii* able to produce MLT ($n=3$ separate fermentation experiments).

INDOLES CONTENT IN SOYBEAN FLOUR

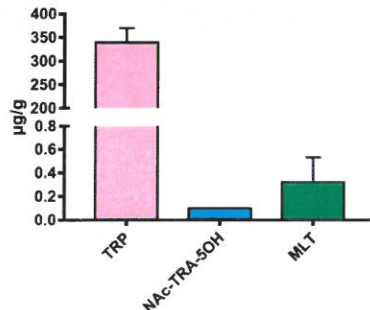


Fig. 6: Indoles recovered from 21 g of soybean flour extracted by Soxhlet with solvents at increasing polarities.

INDOLES CONTENT IN HUMAN PLASMA

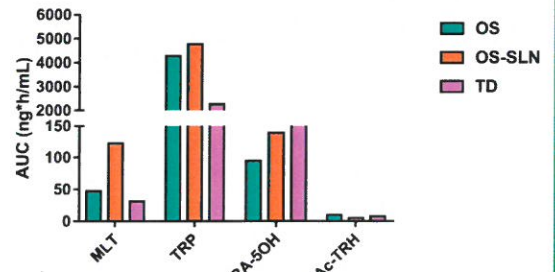


Fig. 7: Human plasma indolomincs profile after MLT (3 mg) administration to critically ill patients by three different routes: oral tablet (OS), oral enclosed in solid nanolipid particles (OS-SLN) and transdermal patch (TD).