



UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

DIPARTIMENTO DI
CHIMICA E TECNOLOGIE
CHIMICHE

CTC

DETERMINAZIONE DI SELENOAMMINOACIDI LIBERI NELLE PATATE TRAMITE SPME-GC-MS/MS

Antonio Tagarelli

DIPARTIMENTO DI CHIMICA E TECNOLOGIE CHIMICHE

UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA



UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

DIPARTIMENTO DI
CHIMICA E TECNOLOGIE
CHIMICHE
CTC

QUALITA' DEGLI ALIMENTI



Analytica Chimica Acta 747 (2012) 58–66



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca



A reliable solid phase microextraction-gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry method for the assay of selenomethionine and selenomethylselenocysteine in aqueous extracts: Difference between selenized and not-enriched selenium potatoes

Emanuela Gionfriddo, Attilio Naccarato, Giovanni Sindona, Antonio Tagarelli*

Dipartimento di Chimica, Università della Calabria, Via Pietro Bucci Cubo 12/C, I-87030 Arcavacata di Rende, CS, Italy



IL SELENIO

Scoperto nel 1817



Considerato tossico a partire dal
1842 fino agli anni '50



Dagli anni '60 in poi ne furono riconosciute
le proprietà anticancerogene,^(*) e il ruolo
essenziale nelle funzioni immunitarie, nella
soppressione virale, nella fertilità maschile
nonché nella prevenzione di alcune malattie
cardiache e di disordini muscolari

Il range che definisce l'apporto necessario è piuttosto ristretto: l'assorbimento di meno di $0.1 \mu\text{g selenio g}^{-1}$ tramite gli alimenti risulta insufficiente, mentre un consumo regolare di cibi contenenti più di $1 \mu\text{g selenio g}^{-1}$ ha conseguenze tossiche.

^(*) K. Schwarz, J.G. Bieri, G.M. Briggs, M.L. Scout., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1957**, 95, 631.



UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

DIPARTIMENTO DI
CHIMICA E TECNOLOGIE
CHIMICHE
CTC

FERTILIZZANTI ARRICCHITI AL SELENIO

Concimazione con
 Na_2SeO_3 o Na_2SeO_4



Consorzio delle Buone
Idee soc. cons. a.r.l.
Villanova di Castenaso
(BO)



IL SELENIO

ORGANICHE

Selenoamminoacidi
Selenopeptidi
Selenoproteine

**Forme
Chimiche**

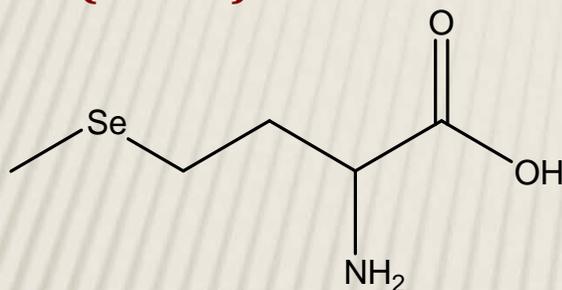
INORGANICHE

Selenati
Seleniti

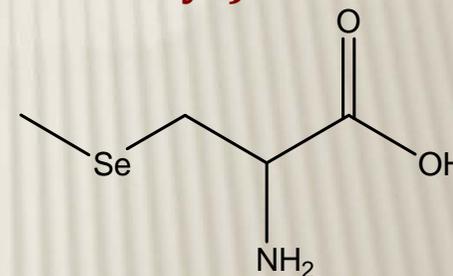


SELENOAMMINOACIDI NELLE PATATE

**Selenometionina
(SeMet)**



**Selenometilselenocisteina
(SeMeSeCys)**



Dagli studi condotti in vivo* è stata valutata l'efficacia di vari selenocomposti contro il tumore mammario nei topi e i selenoamminoacidi sono risultati essere tra i più attivi come anticancerogeni.

(*) P.D., Whanger. *Journal of American College Nutrition*. 2002, 21, 3.



UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

DIPARTIMENTO DI
CHIMICA E TECNOLOGIE
CHIMICHE

CTC

SELENOAMMINOACIDI NEI VEGETALI

Protocolli analitici basati su:

HPLC-MS

HPLC-ICP-MS

GC-ICP-MS

ALTA SENSIBILITA'

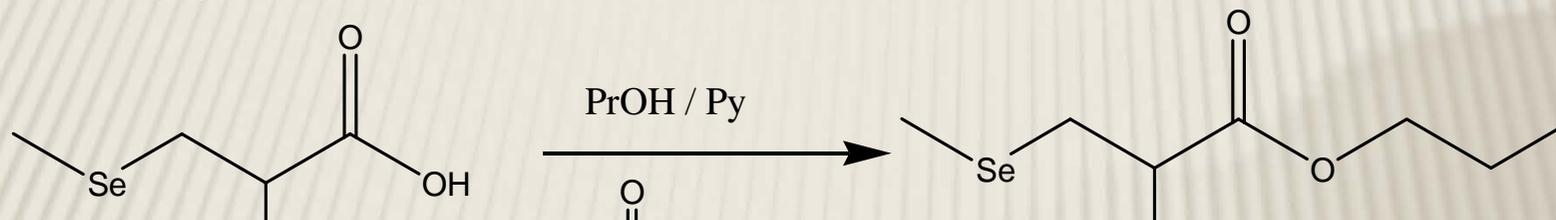
Derivatizzazione



SVILUPPO DEL METODO ANALITICO

Derivatizzazione dei selenoamminoacidi:

SeMeSeCys



- 1,5 ml di estratto acquoso
- Si aggiungono 750 μl di una miscela PrOH/Py (3:1 v/v)
- Si agita per 10 minuti
- Si aggiungono 156 μl of propil cloroformiato
- Si agita per 2 minuti
- **Si aggiungono 6 ml di H₂O**

SeMet



Derivatizzazione direttamente in estratto acquoso



Solid Phase Microextraction (SPME)

- Compatibile con analiti volatili
- Compatibile con analiti semi-volatili
- Completamente indipendente da solvente
- Consente il prelievo da matrici complesse
- Consente l'accumulo degli analiti
- Fornisce buone sensibilità
- E' una tecnica molto semplice
- Può essere automatizzata
- Non c'è pretrattamento del campione



UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

DIPARTIMENTO DI
CHIMICA E TECNOLOGIE
CHIMICHE

CTC

Solid Phase Microextraction (SPME)





UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

DIPARTIMENTO DI
CHIMICA E TECNOLOGIE
CHIMICHE

CTC

Solid Phase Microextraction (SPME)



Estratto acquoso
dopo derivatiz.



UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

DIPARTIMENTO DI
CHIMICA E TECNOLOGIE
CHIMICHE

CTC

Solid Phase Microextraction (SPME)



Estratto acquoso
dopo derivatiz.

Ciclo di Adsorbimento
20 minuti



UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

DIPARTIMENTO DI
CHIMICA E TECNOLOGIE
CHIMICHE

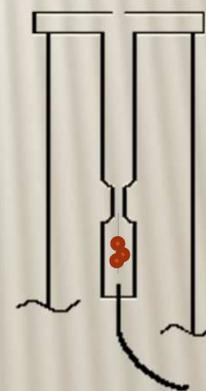
CTC

Solid Phase Microextraction (SPME)



Estratto acquoso
dopo derivatiz.

Ciclo di Adsorbimento
20 minuti



Ciclo di desorbimento
10 minuti

INIETTORE GC



Solid Phase Microextraction (SPME)

- Carbowax/polietilenglicole 60 μm (CAR/PEG)
- Polidimetilsilossano 7 μm , 30 μm e 100 μm (PDMS)
- Poliacrilato 85 μm (PA)
- Carboxen/polidimetilsilossano 75 μm e 85 μm (CAR/PDMS)
- Polidimetilsilossano/divinilbenzene 65 μm (PDMS/DVB)
- Divinilbenzene/Carboxen/polidimetilsilossano 50/30 μm
(DVB/CAR/PDMS)



SCREENING DELLE FIBRE E DEL DERIVATIZZANTE

FIBRE

- Poliacrilato (PA)
- Divinilbenzene/Carboxen/Polidimetilsilossano (DVB/CAR/PDMS)
- Polidimetilsilossano/Divinilbenzene (PDMS/DVB)
- Polidimetilsilossano (PDMS)
- Carboxen/Polidimetilsilossano (CAR/PDMS)

MISCELA DERIVATIZZANTE

- Metanolo / Metil cloroformiato
- Etanolo / Etil cloroformiato
- Propanolo / Propil cloroformiato

Parametri fissati

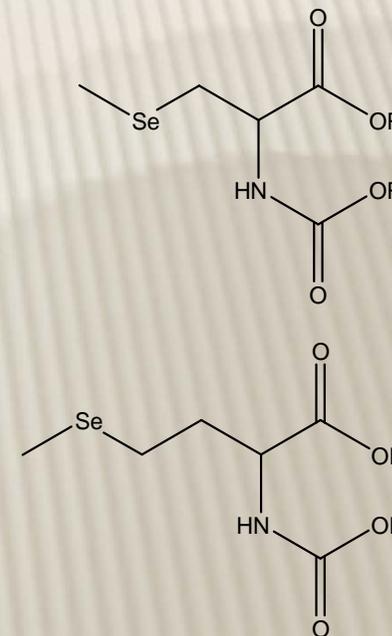
Concentrazione degli analiti

Temperatura e tempo di desorbimento

Temperatura e tempo di adsorbimento

Condizioni GC-MS

%NaCl





SCREENING DELLE FIBRE E DEL DERIVATIZZANTE

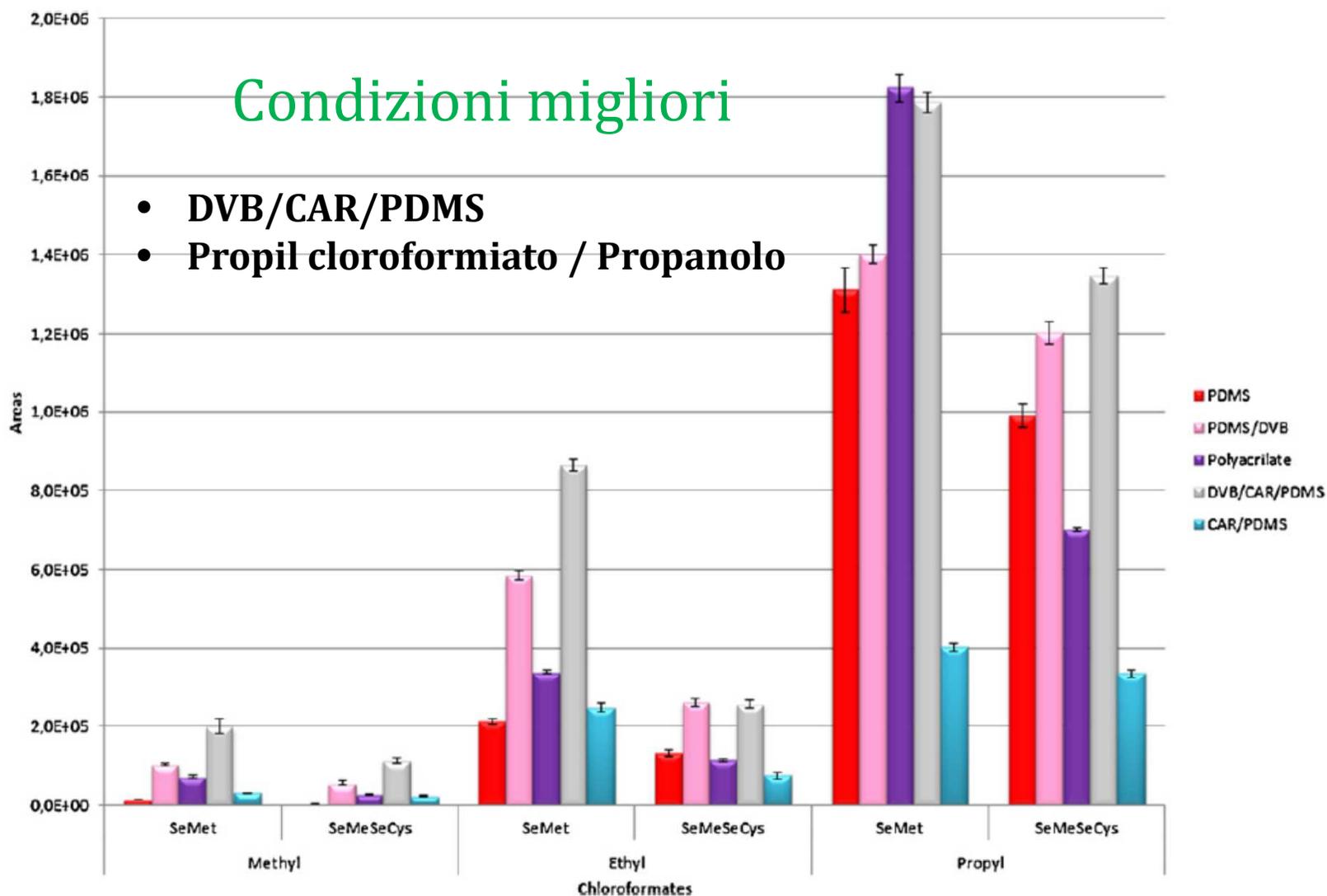


Fig. 2. Peak areas obtained for SeMet and SeMeSeCys derivatized with three alkylchloroformates and extracted by immersion mode with five SPME fibers.



HOW TO FIND THE OPTIMUM?

Chemical reaction to be optimized:

find the conditions giving the highest yield

2 variables:

temperature (range 40-80 degrees Celsius)

reaction time (range 20-60 minutes)



Operator 1:

• 40 degrees, 20 min.	20.6%
• 50 degrees, 20 min.	32.3%
• 60 degrees, 20 min.	39.9%
• 70 degrees, 20 min.	43.5%
• 80 degrees, 20 min.	43.0%
• 75 degrees, 20 min.	43.7%
• 75 degrees, 30 min.	50.2%
• 75 degrees, 40 min.	52.1%
• 75 degrees, 50 min.	49.5%
• 75 degrees, 45 min.	51.4%

Optimum yield 52.1% (75 degrees, 40 min.)

10 experiments performed



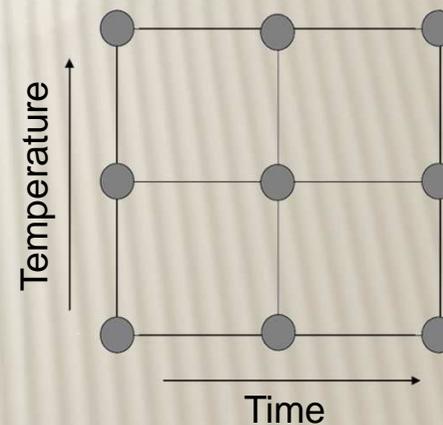
Experimental design

Operator 2:

40 degrees, 20 min.	20.6%
40 degrees, 40 min.	44.9%
40 degrees, 60 min.	51.0%
60 degrees, 20 min.	39.9%
60 degrees, 40 min.	55.1%
60 degrees, 60 min.	52.1%
80 degrees, 20 min.	43.0%
80 degrees, 40 min.	49.1%
80 degrees, 60 min.	37.0%

Maximum yield 55.1% (60 degrees, 40 min.)

9 experiments performed



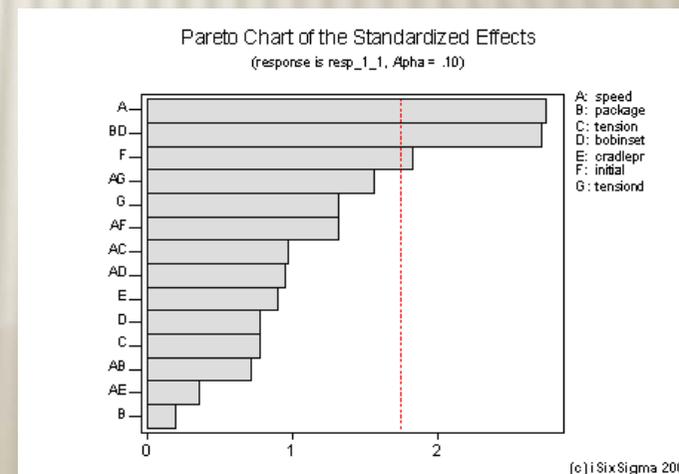
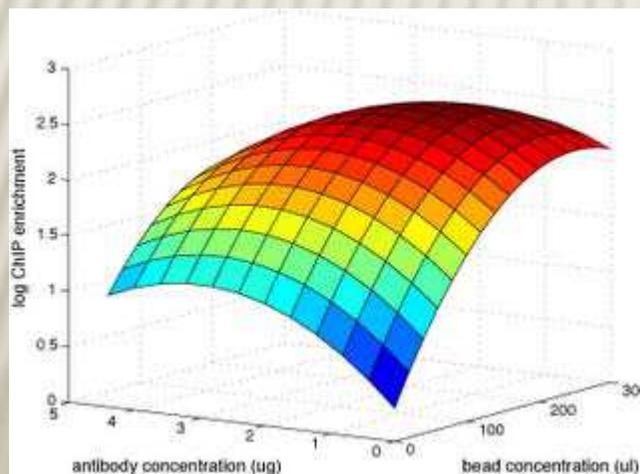


Experimental design

With the results of Operator 1 **no general knowledge** of the phenomenon can be obtained

The experiments performed by Operator 2 allow the **estimation of the coefficients** of the following model:

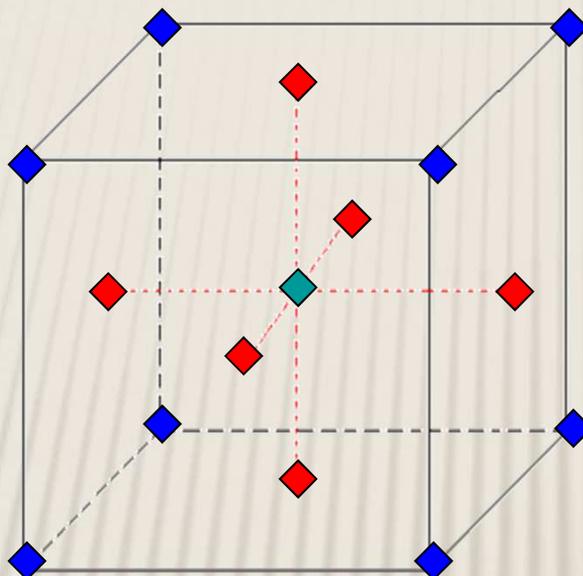
$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_1X_1^2 + b_2X_2^2 + b_{12}X_1X_2$$





Experimental design

Central Composite Design



K factors

Number of experiments: $2^k + 2^*k + N$

Disegno
fattoriale
completo

Punti a
stella

Numero di
repliche
nel punto
al centro



Solid Phase Microextraction (SPME)

Le analisi SPME sono sensibili ai seguenti parametri:

- ~~fibra~~ → Già scelta
- ~~tempo di desorbimento~~
- tempo di adsorbimento
- temperatura di desorbimento
- percentuale di sale
- ~~temperatura di adsorbimento~~
- pH
- agitazione
- ~~volume di campione~~





CENTRAL COMPOSITE DESIGN

$$2^3 + 2 \times 3 + 6(C) = 20 \text{ esperimenti}$$

pH: 2,5-7,5

Temp. di des.: 230-250 °C

% NaCl: 0-10

Table 1

Matrix of the central composite experimental design for the optimization of SPME analysis.

Experiment	pH	Desorption temperature (°C)	% NaCl
18(C)	5	250	5
6	6.5	238	8
9	2.5	250	5
16(C)	5	250	5
19(C)	5	250	5
13	5	250	0
3	3.5	262	2
4	3.5	262	8
15(C)	5	250	5
20(C)	5	250	5
11	5	230	5
14	5	250	10
8	6.5	262	8
1	3.5	238	2
12	5	270	5
5	6.5	238	2
10	7.5	250	5
17(C)	5	250	5
7	6.5	262	2
2	3.5	238	8



CENTRAL COMPOSITE DESIGN

Pareto Charts

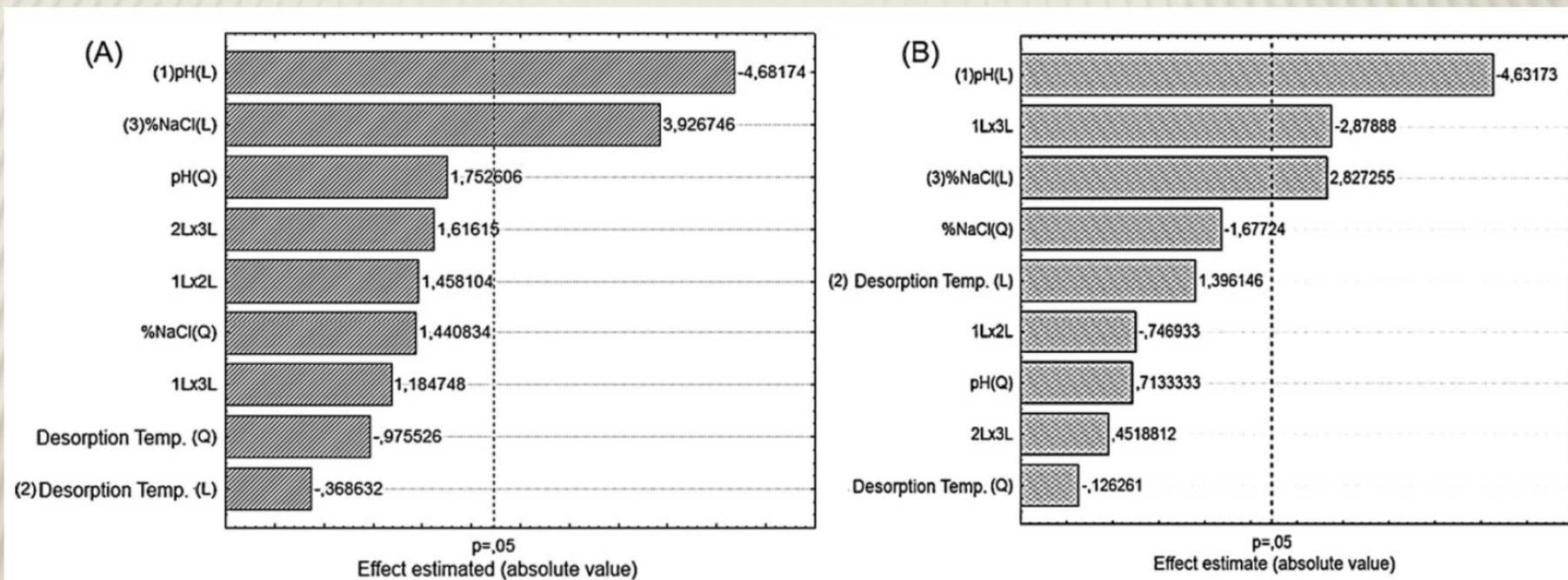


Fig. 3. Pareto charts obtained from central composite design for (A) SeMeSeCys and (B) SeMet.



CENTRAL COMPOSITE DESIGN

Superfici di risposta

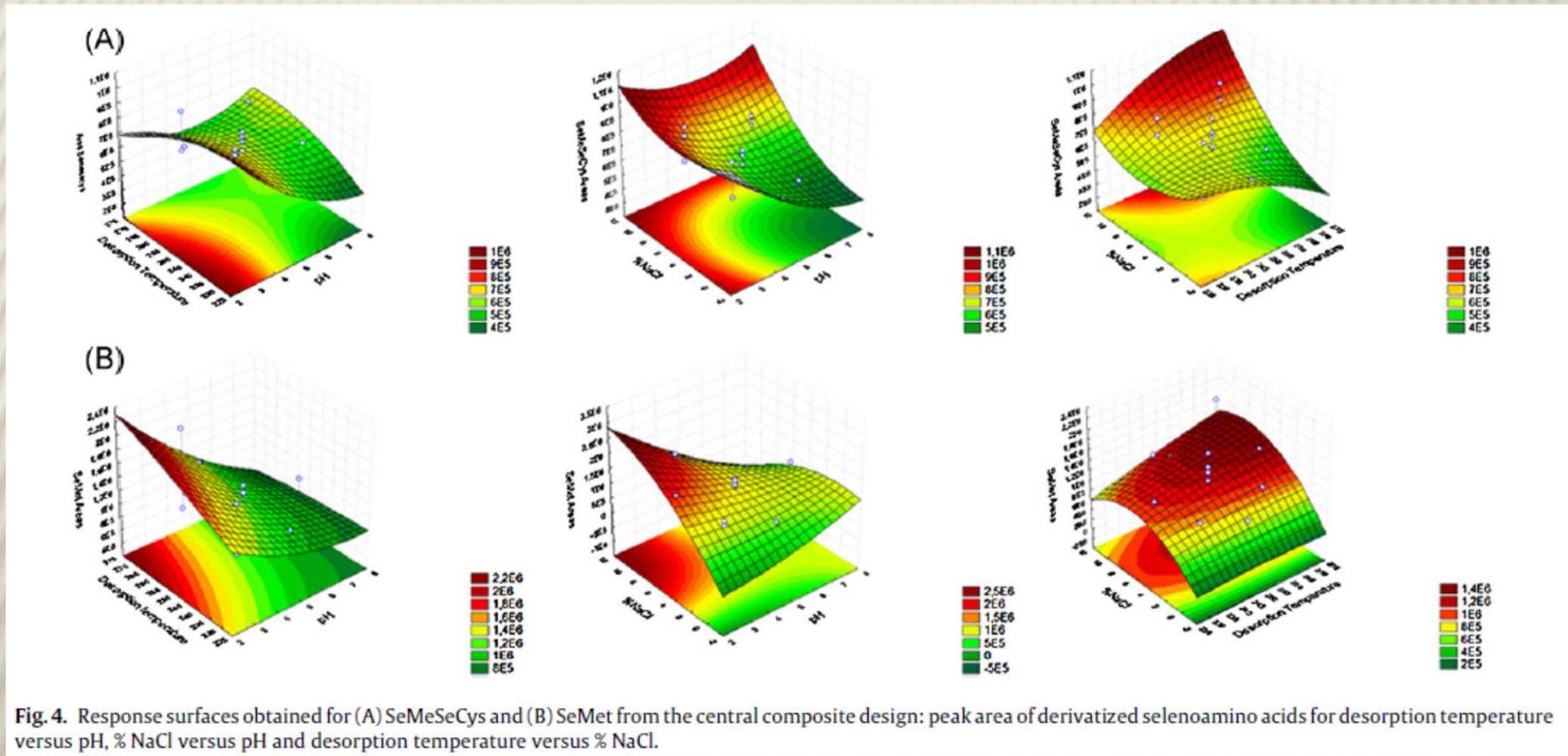


Fig. 4. Response surfaces obtained for (A) SeMeSeCys and (B) SeMet from the central composite design: peak area of derivatized selenoamino acids for desorption temperature versus pH, % NaCl versus pH and desorption temperature versus % NaCl.

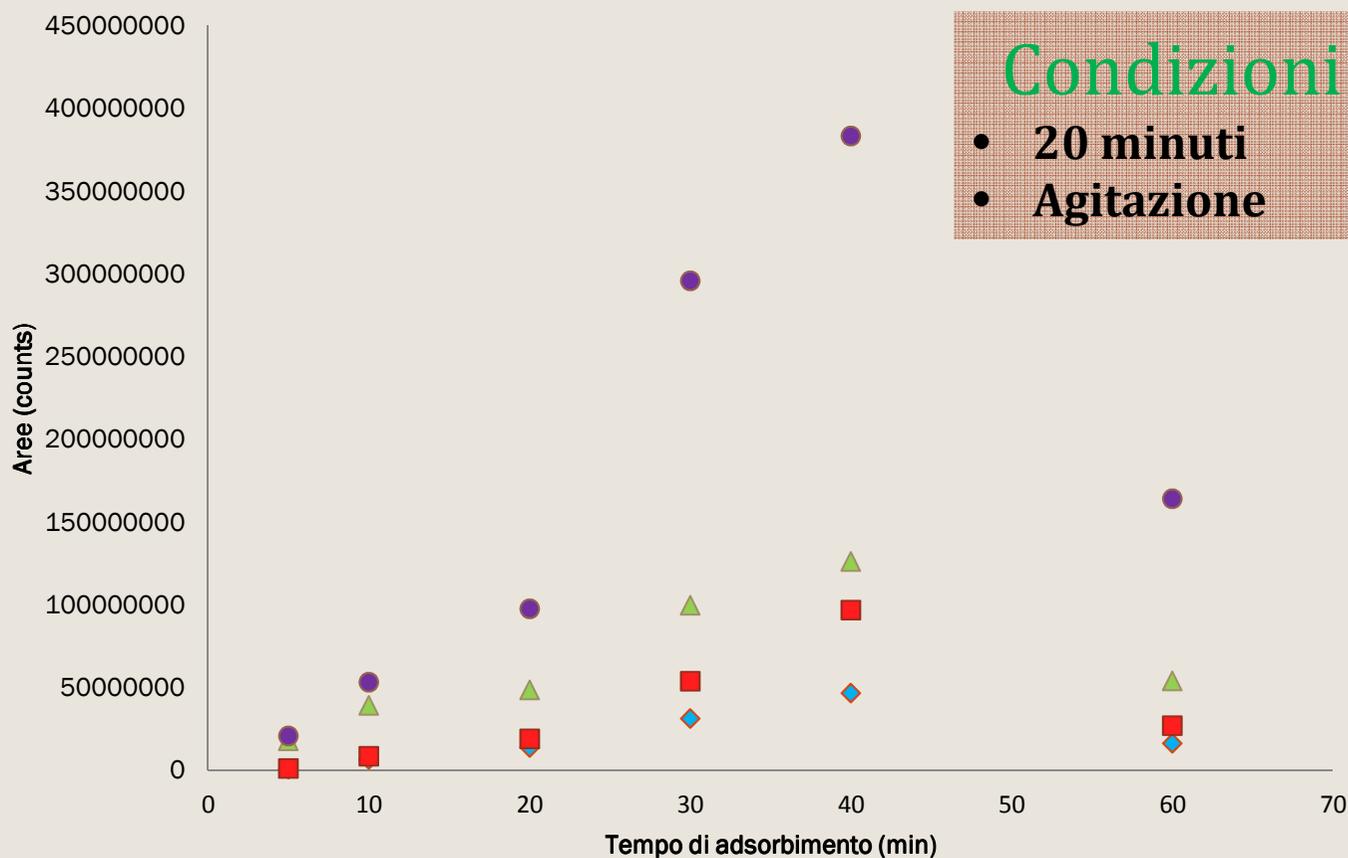
Funzione di desiderabilità (Derringer's desirability function)

Condizioni ottimizzate: $\text{pH} = 2$, temperatura di desorbimento 270°C , NaCl 10%.



OTTIMIZZAZIONE UNIVARIATA

Le variabili cinetiche sono state valutate in maniera univariata eseguendo le analisi nelle condizioni precedentemente ottimizzate.



◆ SeMeSeCys senza agitazione ■ SeMet senza agitazione ▲ SeMeSeCys con agitazione ● SeMet con agitazione



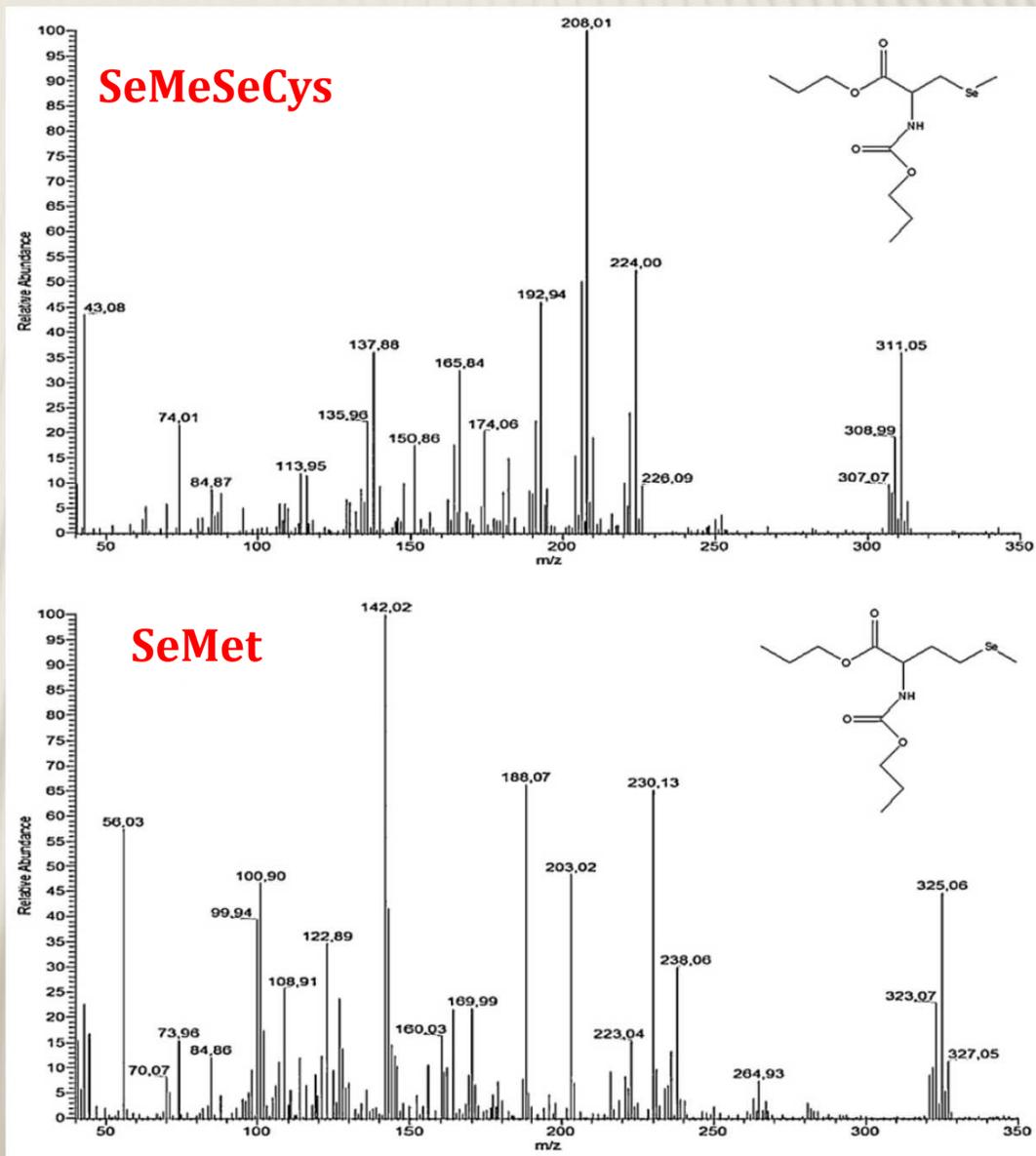
UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

DIPARTIMENTO DI
CHIMICA E TECNOLOGIE
CHIMICHE

CTC

ANALISI IN SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM (MS/MS)

Spettri in full scan



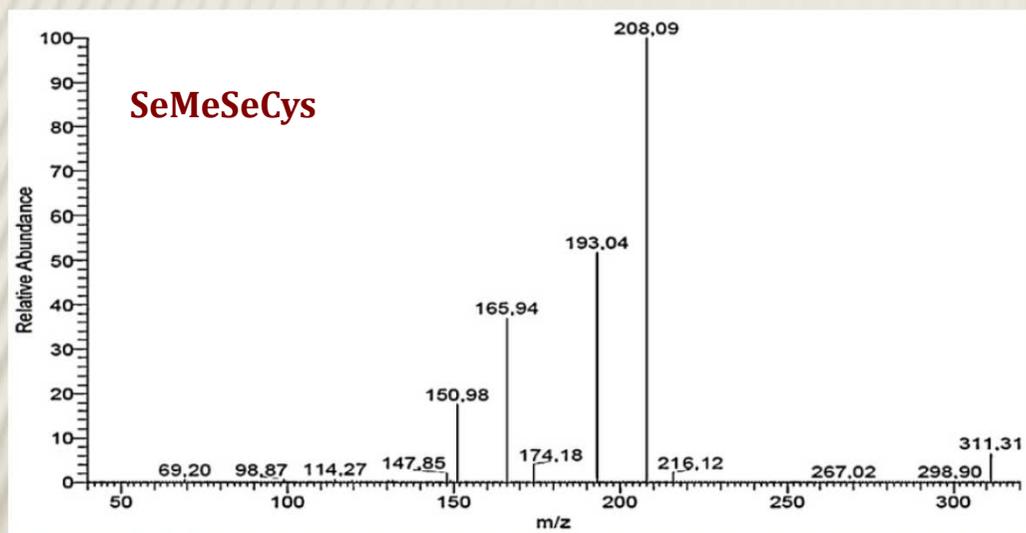


UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

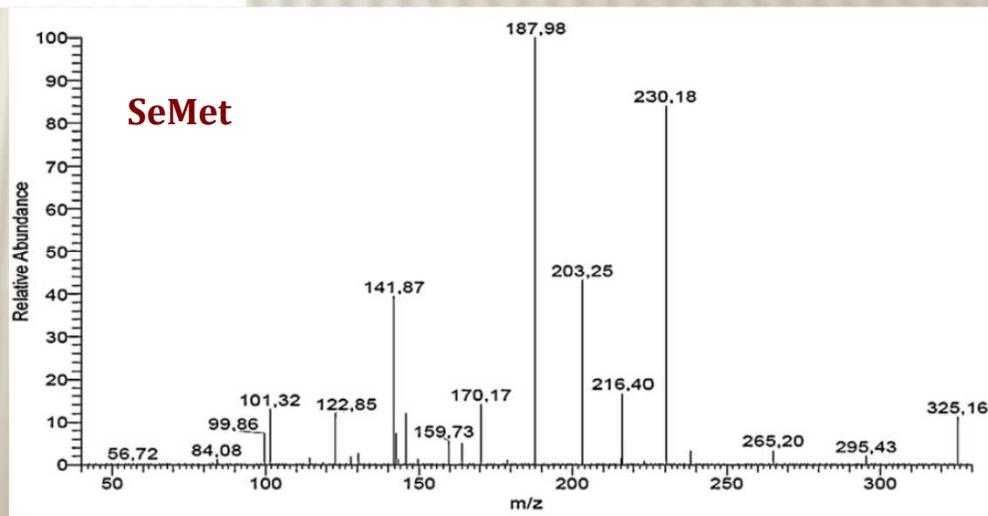
DIPARTIMENTO DI
CHIMICA E TECNOLOGIE
CHIMICHE

CTC

ANALISI IN SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM (MS/MS)



Spettri MS/MS
in modalità
product scan
sullo ione
molecolare



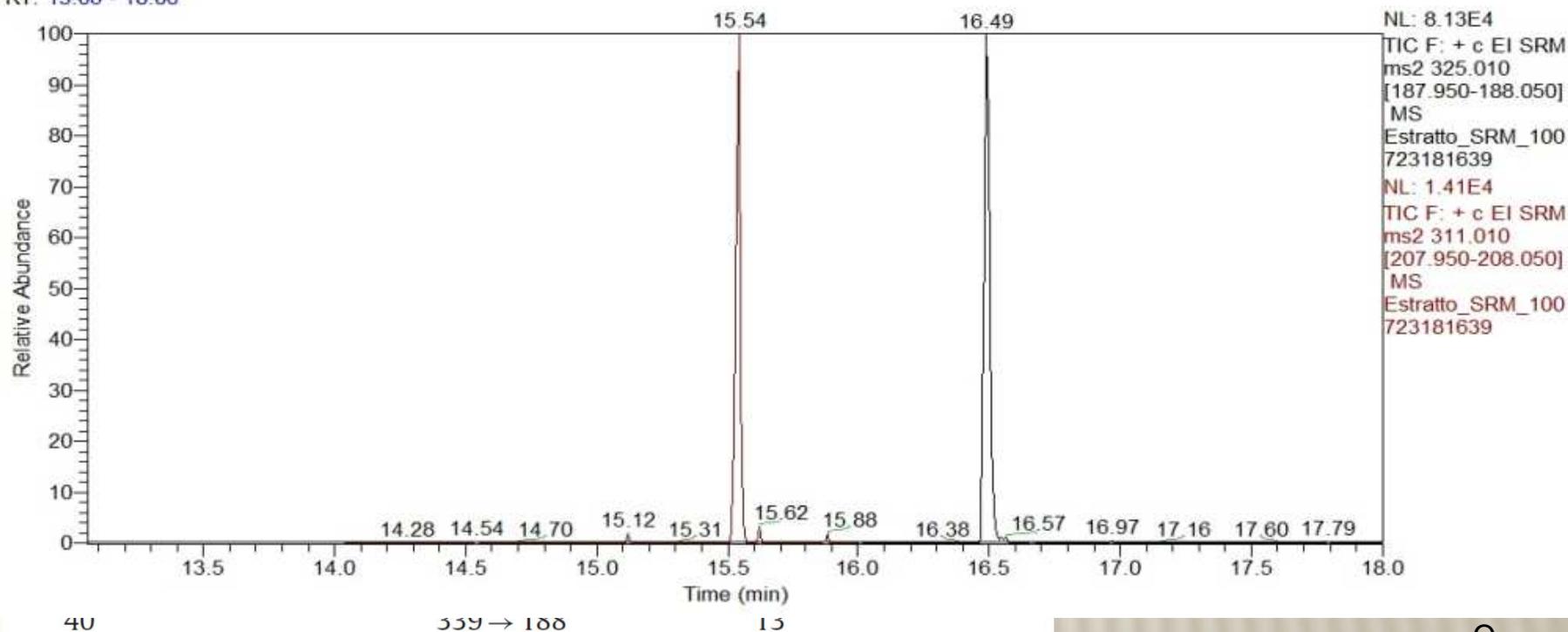


ANALISI IN SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM (MS/MS)

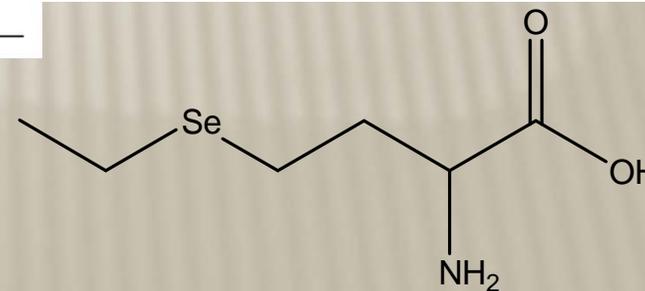
Per le analisi in modalità SRM sono state monitorate le seguenti transizioni e ottimizzate le energie di collisione

Table 2

RT: 13.06 - 18.00



**Selenoetionina
(SeEt)**





UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

DIPARTIMENTO DI
CHIMICA E TECNOLOGIE
CHIMICHE

CTC

VALIDAZIONE

Table 3

Summary of calibration parameters, mean accuracies (%), relative standard deviation (RSD ($N = 3$), % in parentheses) and limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs).

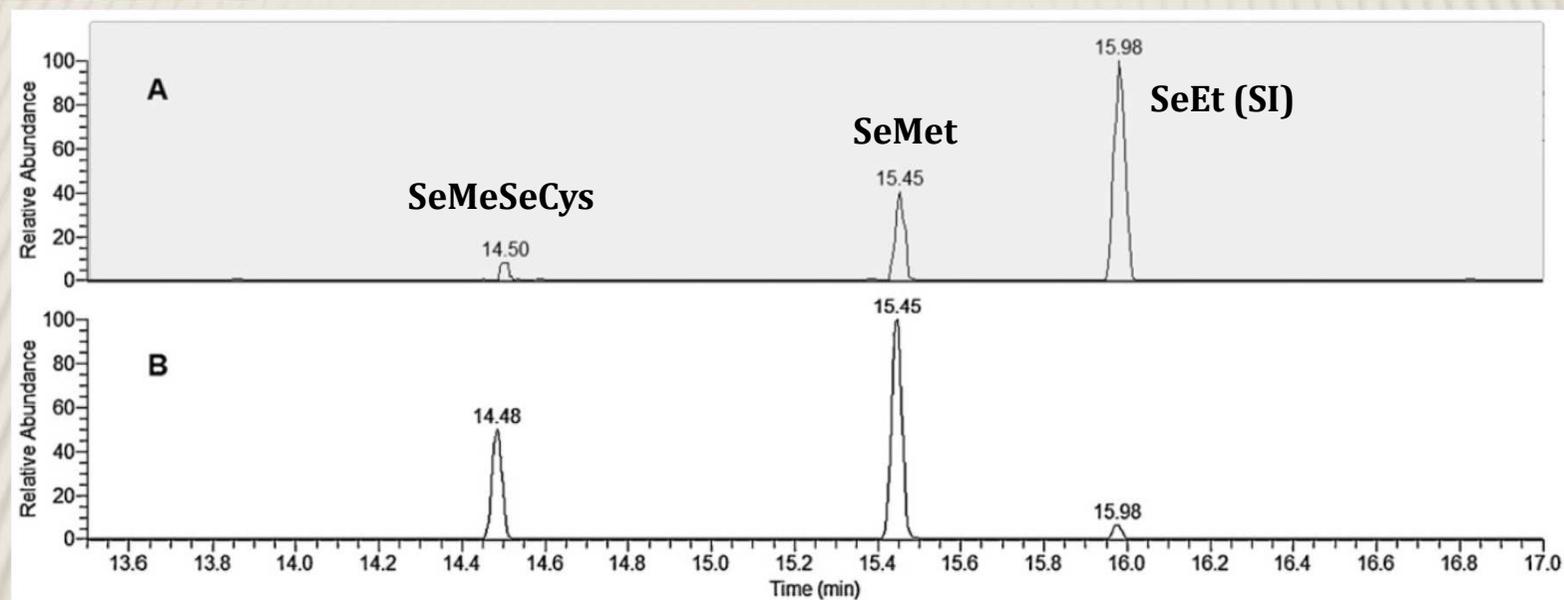
	Calibration range ($\mu\text{g kg}^{-1}$ DM)	Curve	R^2	8 $\mu\text{g kg}^{-1}$	40 $\mu\text{g kg}^{-1}$	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$ DM)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$ DM)
SeMet	2–100	$y = 0.3556x + 0.0022$	0.9960	82.3 (9.6)	112.1 (11.9)	0.143	0.292
SeMeSeCys	2–100	$y = 0.4559x + 0.0051$	0.9954	99.0 (8.5)	116.3 (13.1)	0.210	0.588

$$S_{\text{LOD}} = S_{\text{RB}} + 3\sigma_{\text{RB}}$$

$$S_{\text{LOQ}} = S_{\text{RB}} + 10\sigma_{\text{RB}}$$



CAMPIONI REALI



SeMeSeCys $7 \pm 3 \mu\text{g/kg}$

SeMet $26 \pm 7 \mu\text{g/kg}$



SeMeSeCys $719 \pm 318 \mu\text{g/kg}$

SeMet $2032 \pm 434 \mu\text{g/kg}$



CONCLUSIONI

- È il primo metodo sviluppato per l'analisi di selenoamminoacidi mediante SPME-GC-MS/MS
- L'utilizzo di un metodo di derivatizzazione rapido ed efficiente, compatibile con l'utilizzo delle fibre SPME attualmente disponibili in commercio
- Il metodo sviluppato si propone come valida alternativa agli approcci HPLC-ICP-MS e GC-ICP-MS utilizzati per la determinazione di selenoamminoacidi
- Il metodo può essere applicabile ad altre matrici acquose alimentari
- Le buone performance in termini di linearità, precisione, accuratezza e sensibilità rendono il metodo affidabile.
- L'applicazione a campioni di patate selenizzate ha messo in evidenza l'aumento significativo dei due selenoamminoacidi rispetto alle patate non selenizzate.