



SCHEDA TECNICA Requisiti della fornitura

1. Fabbisogno

L'obiettivo del progetto PON "SHINE" è rafforzare il sistema italiano di infrastruttura per il patrimonio culturale attraverso metodologie e tecnologie d'avanguardia per la conoscenza, gestione, fruizione e conservazione del patrimonio culturale tangibile. Il potenziamento distribuito su scala territoriale e nazionale dei principali poli di eccellenza prevede la messa in opera di laboratori e la loro integrazione nell'infrastruttura nazionale ed europea E-RIHS.

Per le attività che dovranno essere svolte nell'ambito del progetto PON "SHINE" dalla UO2 presso la sede di Lecce dell'Istituto per le Scienze del Patrimonio Culturale, è necessaria l'acquisizione di una strumentazione GC/MS ad altissima risoluzione, tra quelle più elevate disponibili sul mercato, che consenta di analizzare composti organici di qualsiasi tipologia e in bassissima concentrazione.

Tale sistema sarà impiegato nel settore dei beni culturali per definire i trattamenti con sostanze naturali, effettuati in passato, per determinare i leganti impiegati nelle opere d'arte, per l'analisi di residui organici in reperti archeologici ai fini della comprensione delle diete e delle abitudini alimentari nel mondo antico.

2. Requisiti tecnici

Il sistema GC-MS che si intende acquisire deve essere così equipaggiato e composto:

- a. n.1 gascromatografo a doppia colonna
- b. n.1 autocampionatore per liquidi
- c. n.1 iniettore *Split/Splitless*
- d. n.1 iniettore *PTV on column*
- e. n.1 *Direct Exposure Probe (DEP)*
- f. n.1 spettrometro di massa ad alta risoluzione
- g. n.1 sistema software e hardware di gestione strumentale ed acquisizione/elaborazione dati
- h. librerie NIST e librerie di spettri ad alta risoluzione di metabolomica e contaminanti.

Il sistema GC/MS dovrà inoltre essere predisposto per essere interfacciato ad un pirolessizzatore e ad una strumentazione TGA (mod. STA 449 F3 della Netzsch Geraetebau GmbH).

Ogni componente del sistema deve presentare le seguenti caratteristiche e requisiti:

Gasromatografo a doppia colonna

- equipaggiato con controllori elettronici di pressione, in grado di essere gestito in modo del tutto indipendente attraverso un software gestionale in remoto tramite computer;
- forno programmabile multirampa, con almeno 31 rampe e 32 *plateaux*;
- riscaldamento del forno da pochi gradi oltre la temperatura ambiente fino a 450°C;
- velocità di riscaldamento del forno $\geq 125^\circ\text{C}/\text{min}$;
- raffreddamento da 450°C a 50°C in un tempo ≤ 4 min senza uso di gas criogenici;
- reattività alle variazioni della temperatura ambiente: $<0.01^\circ\text{C}$ per 1°C .

Autocampionatore per liquidi



- tecnologia robotica sui tre assi X, Y, Z;
- almeno 150 posizioni per vials da 2 ml;
- possibilità di aggiungere in futuro le modalità di iniezione Spazio di testa e SPME (microestrazione in fase solida).

Iniettore Split/Splitless

- controllo elettronico dei flussi e della pressione;
- massima temperatura di esercizio pari a 400 °C;
- flusso di splittaggio controllato elettronicamente e impostabile fino a 11000:1.

Iniettore PTV on column

- controllo elettronico dei flussi e della pressione;
- massima temperatura di esercizio pari a 450 °C;
- flusso di splittaggio controllato elettronicamente e impostabile fino a 12500:1.

Direct Exposure Probe (DEP)

- Riscaldamento rapido per evaporazione flash e pirolisi fino a 1600°C.

Spettrometro di massa ad alta risoluzione

- essere un sistema da banco e non da pavimento e non deve utilizzare liquidi di raffreddamento;
- sorgente di ionizzazione ad impatto elettronico (EI) e ionizzazione chimica (CI) positiva e negativa ;
- sorgente dotata di doppio filamento;
- possibilità di commutare la ionizzazione chimica tra positiva e negativa durante le scansioni successive;
- possibilità di effettuare la pulizia della sorgente, agevolmente e in breve tempo, senza dover togliere il vuoto allo spettrometro di massa;
- *transfer-line* riscaldata, con temperatura selezionabile nell'intervallo da 30 a 350°C e controllata mediante software;
- risoluzione: ≥ 100.000 (FWHM) a m/z 272 in tutte le modalità di scansione e in entrambe le polarità;
- accuratezza di massa: < 1 ppm RMS con taratura interna; < 3 ppm RMS con taratura esterna;
- sistema di vuoto ad alta efficienza, con pompe turbo molecolari di 300 L/sec, raffreddate ad aria, in grado di garantire una pressione $< 1 \times 10^{-9}$ mbar nella regione dell'analizzatore;
- n.1 pompa rotativa in scatola insonorizzata;
- analisi in modalità Full MS, SIM e MS/MS;
- in modalità SIM deve essere possibile isolare più ioni (fino a 10) per volta (*Multiplexing*);
- identificazione in *Full Scan* utilizzando librerie NIST;
- *range* dinamico: $> 5000: 1$ (acquisizione singola);
- intervallo di massa tra 30 e 3000 m/z ;
- in possesso delle seguenti specifiche strumentali in modalità *EI Full MS*:
 - 1 μL di 100 $\text{fg}/\mu\text{L}$ *octafluoronaphthalene* (OFN) deve produrre un rapporto segnale/rumore minimo di 10,000:1 con una risoluzione minima di 50,000 (FWHM) e meno di 1 ppm di errore sulla massa analizzando da m/z 50 a m/z 300;
 - 6 fg di OFN devono essere rivelabili con un livello di precisione delle aree al 99% (Otto iniezioni consecutive di 1 μl alla concentrazione di 10 $\text{fg}/\mu\text{l}$ di OFN)



- in possesso delle seguenti specifiche di installazione in modalità PCI Full MS
 - a. 1 µL di 10 pg/µL *benzophenone* (BZP) produce un rapporto segnale/rumore minimo di 150:1 analizzando da m/z 80 a m/z 230.

Inoltre, la strumentazione deve essere corredata di:

- n. 2 colonne cromatografiche di uso generale, di cui una ad alta temperatura,
- n. 1 colonna polare,
- *vials* ed altro materiale per il primo utilizzo, da individuare in fase di consegna,
- n. 1 gruppo di continuità.

Infine, la fornitura deve comprendere un tavolo di lunghezza pari a 200 cm e profondità di 90 cm con ruote in acciaio.

Sistema Software e Hardware di gestione strumentale ed acquisizione/elaborazione dati:

- controllo dei parametri del sistema GC-MS e dell'autocampionatore;
- comunicazione con lo strumento tramite scheda LAN;
- possibilità di *autotuning* e calibrazione delle masse;
- deconvoluzione degli spettri ottenuti tramite algoritmo integrato;
- creazione di report di analisi personalizzati, creazione di rette di calibrazione, calcolo risultati analitici, ecc.;
- controlli intelligenti sulla sequenza analitica in corso, tali da comandare se impostati: il blocco della sequenza o l'iniezione di un bianco o la ripetizione dell'ultima analisi eseguita in caso di rilevazione automatica di effetti memoria.
- Librerie NIST ultime versioni e librerie di spettri ad alta risoluzione;
- n.1 personal computer con le seguenti caratteristiche adeguate alla gestione del software e dell'hardware:
 - a. S.O. Windows 10 64 bit (Pro o Enterprise)
 - b. processore Intel i7, almeno di ottava generazione;
 - c. memoria RAM da almeno 8 GB
 - d. due dischi rigidi da almeno 500 GB (2 SSD o SSD+HDD da 7200 rpm)
 - e. lettore ottico/masterizzatore DVD±R/RW
 - f. monitor a colori LCD 16:9 con diagonale ? 24" e risoluzione almeno Full HD
 - g. *mouse wireless*
 - h. stampante a getto d'inchiostro a colori, in grado di stampare formati A4 e A3, anche in modalità fronte-retro, dotata di scheda di rete LAN e, possibilmente, Wi-Fi.

Si ritiene necessario ed opportuno che la fornitura sia completata da una garanzia full risk di 24 mesi e che sia previsto un training adeguato.

3. Strumenti individuati e costi attesi

A seguito di una accurata ed estesa indagine, effettuata utilizzando i principali motori di ricerca, le riviste specializzate e la documentazione disponibile *on-line*, sono state individuate sul mercato internazionale ed europeo in particolare le seguenti aziende in grado di fornire sistemi GC/MS con le caratteristiche sopra indicate:

- Agilent Technologies (<http://www.agilent.com>), rappresentata in Italia da Agilent Technologies Italia S.p.A. con sede in Via P. Gobetti 2/C, Cernusco sul Naviglio (MI)
- LECO Corporation (<http://www.leco.com>), rappresentata in Italia da LECO ITALY S.R.L. Via N.



Copernico, 26 Cassina De' Pecchi (MI) ;

- ThermoFisher Scientific (<http://www.thermoscientific.com>), rappresentata in Italia da ThermoFisher Scientific S.p.A., con sede in SS Rivoltana, Rodano (MI)

Nello specifico, sono stati individuati, tra quelli in grado di rispondere potenzialmente alle richieste, i seguenti sistemi dal costo stimato, al netto di IVA, indicato:

- Sistema GC/Q-TOF Agilent 7250, prodotto da Agilent Technologies, al prezzo stimato di € 406.813,00;
- Sistema Pegasus GC-HRT+, prodotto da LECO al prezzo stimato di € 440.762,00;
- Sistema Q-Exactive GC, prodotto da ThermoFisher al prezzo stimato di € 430.000,00;

Da una comparazione delle caratteristiche dichiarate dai produttori il sistema Q-EXACTIVE GC prodotto/commercializzato dalla azienda ThermoFisher è risultato quello che presentata tutti i requisiti richiesti compreso l'integrazione con strumentazione TGA in dotazione all'Istituto.

In particolare, il sistema di gas cromatografia denominato Q-EXACTIVE GC è proposto in combinazione con uno spettrometro di massa del tipo a filtro quadrupolare accoppiato ad un sistema FT MS basato sulla tecnologia Orbitrap.

La tecnologia Orbitrap, coperta da brevetti, basa la separazione di ioni con diverso rapporto massa/carica attraverso l'applicazione di un campo elettrostatico ad un elettrodo centrale intorno al quale gli ioni ruotano in modo radiale ed assiale, generando una corrente. La misura della corrente generata nel tempo dal movimento degli ioni e la conversione del segnale acquisito nel tempo in quello delle diverse frequenze ed intensità consentono la determinazione dei diversi valori di massa/carica degli ioni e delle corrispondenti quantità.

Esistono sul mercato diverse tecnologie per la spettrometria di massa ad alta risoluzione, alternative a quella Orbitrap, basate su differenti tipologie di analizzatori (magnetici, quadrupolari, a tempo di volo, ibridi e/o composti). La tecnologia a tempo di volo (*Time Of Flight*) è alla base sia del sistema GC/Q-TOF Agilent 7250, prodotto da Agilent, che del sistema Pegasus GC-HRT+, prodotto da LECO.

Dall'esame comparativo delle caratteristiche dei tre sistemi, è risultato che il sistema Q-EXACTIVE GC risponde alle caratteristiche richieste in quanto garantisce:

- la più elevata risoluzione, pari a 100.000 a 272 m/z. Una maggiore risoluzione permette di distinguere picchi spettrali aventi la stessa massa nominale ma differente formula molecolare. Questa caratteristica è importante per frammenti aventi stesso m/z di molecole differenti che però coeluiscono, perché ne rende possibile la distinzione. Un caso particolare di questa situazione è la possibilità di discriminare, grazie all'alta risoluzione, una massa interferente della matrice o del fondo dalla massa del composto di interesse. L'elevata risoluzione avvantaggia anche quando si hanno frammenti di diversa composizione ma dello stesso analita che quindi arrivano in sorgente contemporaneamente. In questo caso anche la migliore cromatografia non può aiutare ma conoscere la composizione di tutti i frammenti di una molecola è di fondamentale importanza nell'identificazione delle molecole non note;
- la migliore accuratezza di massa, ossia < 1ppm. Come si può osservare in Tabella 1, la maggiore accuratezza semplifica l'annotazione dei picchi incogniti. Si tratta di un aspetto di particolare importanza nello studio dei beni culturali in cui mancano materiali di



riferimento certificati, ogni opera d'arte è un unicum, e un errore sull'accuratezza di massa inferiore a 1 ppm permette di avere una maggiore confidenza nell'identificazione della formula molecolare delle molecole non note;

- c. la maggiore sensibilità, ovvero il più basso limite di rivelabilità (<6 fg OFN). Maggiore sensibilità significa maggiore capacità di identificare e quantificare composti chimici in traccia come spesso accade con lo studio dei residui organici archeologici;
- d. è l'unico analizzatore di massa che ha sia la possibilità di montare una sorgente a ionizzazione chimica che di fare acquisizioni in modalità MS/MS: la prima modalità è spesso utilizzata per individuare lo ione molecolare nel caso di molecole instabili alle energie delle sorgenti ad impatto elettronico, la seconda a determinare la struttura di uno ione molecolare o di un suo frammento mediante frammentazione MS/MS;
- e. è l'unico analizzatore di massa che permette di fare acquisizione SIM multiplexata. L'acquisizione dei dati in modalità multiplex, da tempo utilizzata in LCMS, si basa su una più efficiente co-selezione di più ioni precursori in parallelo, in pratica sono raccolti gli ioni per la scansione successiva mentre viene acquisita la scansione precedente. Questa modalità permette di aumentare il throughput strumentale;
- f. è l'unica strumentazione che può fare misure di desorbimento termico in sorgente con una sonda che vaporizza/pirolizza direttamente in sorgente il campione con temperature fino a 1600°C

Tali caratteristiche sono necessarie per il successo sia delle analisi *targeted* che in quelle *untargeted* che siano qualitative e/o quantitative di sostanze spesso non note e presenti in traccia all'interno dei manufatti del patrimonio culturale.

Tabella 1. *Tratta da Kind, T. & Fiehn, O. Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: Mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm. BMC Bioinformatics 7, 234 (2006). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-234>.*

molecular mass [Da]	without isotope abundance information					2% isotopic abundance accuracy		5% isotopic abundance	
	10 ppm	5 ppm	3 ppm	1 ppm	0.1 ppm	3 ppm		5 ppm	
150	2	1	1	1	1	1		1	
200	3	2	2	1	1	1		1	
300	24	11	7	2	1	1		6	
400	78	37	23	7	1	2		13	
500	266	115	64	21	2	3		33	
600	505	257	155	50	5	4		36	
700	1046	538	321	108	10	10		97	
800	1964	973	599	200	20	13		111	
900	3447	1712	1045	345	32	18		196	

Gli altri sistemi valutati non sono stati ritenuti idonei per le ragioni di seguito riportate:

- a. Sistema GC/Q-TOF Agilent 7250, prodotto da Agilent Technologies, possiede risoluzione, accuratezza di massa e sensibilità significativamente al di sotto di quelle del sistema a marchio ThermoFisher. In particolare, la sensibilità è di circa un ordine di grandezza



peggiore. Tale strumentazione, inoltre, non ha possibilità di ionizzazione chimica e di desorbimento termico in sorgente, quest'ultimo da decenni metodo veloce per analisi di fingerprinting nei beni culturali (cfr. C. Theodorakopoulos, J. J. Boon and V. Zafiropoulos - 2009 - Direct temperature mass spectrometric study on the depth-dependent compositional gradients of aged triterpenoid varnishes, *Int. J. Mass Spectrom.* 284, 98-107). Inoltre non ha la possibilità di acquisizione multiplexed degli spettri MS/MS, come pure di utilizzare una sorgente di ionizzazione chimica.

- b. il sistema Pegasus GC-HRT+, prodotto da LECO, nonostante un'accuratezza di massa confrontabile con quella del sistema ThermoFisher, possiede risoluzione e soprattutto sensibilità significativamente peggiori. In particolare, un LOD di oltre due ordini di grandezza superiore (1000 vs 6 fg OFN) potrebbe porre problemi nell'identificazione delle sostanze in traccia. Il Pegasus GC-HRT+, inoltre, non può acquisire in MS/MS e non ha sonda per DTMS.

--- o O o ---

L'acquisto del sistema Q-EXACTIVE GC della azienda Thermo Fisher Scientific, ha un costo stimato, IVA esclusa, di € 430.000,00 (Euroquattrocentotrentamila/00), incluso trasporto ed installazione.

Il Responsabile Unico del Procedimento
Dott. Liborio CAPOZZO