



Università  
Ca' Foscari  
Venezia

**Scuola Dottorale di Ateneo  
Graduate School**

**Dottorato di ricerca  
in Scienze Chimiche  
Ciclo XXV  
Anno di discussione 2013**

***Tossine in matrici ambientali:  
quantificazione mediante metodi accoppiati HPLC/MS  
ad elevata sensibilità***

**SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE DI AFFERENZA: CHIM/01  
Tesi di Dottorato di Elena Barbaro, matricola 800166**

**Coordinatore del Dottorato**

**Prof. Maurizio Selva**

**Tutore del Dottorando**

**Prof. Carlo Barbante**



A mio padre

*La ricerca è sofferenza*

A. G.



# Indice

<b>Scopo della tesi</b>	1
<i>I parte</i>	
<b>LE TOSSINE D'ACQUA DOLCE: le cianotossine</b>	
<b>CAPITOLO 1</b>	
<b>Le tossine cianobatteriche</b>	5
<i>1.1 I cianobatteri</i>	5
<i>1.2 Microcistine e nodularine</i>	7
<i>1.3 Struttura chimica e proprietà</i>	8
<i>1.4 Esposizione umana alle microcistine e nodularine</i>	10
<i>1.5 Meccanismi d'azione</i>	12
<i>1.6 Riferimenti bibliografici</i>	14
<b>CAPITOLO 2</b>	
<b>Messa a punto di un metodo strumentale per la determinazione di microcistine e nodularina mediante HPLC-MS/MS</b>	15
<i>2.1 Introduzione</i>	15
<i>2.2 Sviluppo del metodo d'analisi delle microcistine e nodularina in modalità di acquisizione Multiple Reaction Monitorino (MRM)</i>	20
2.2.1 <i>Materiali</i>	20
2.2.2 <i>Sviluppo del metodo MRM</i>	20
2.2.3 <i>Sviluppo del metodo cromatografico</i>	25
2.2.4 <i>Ottimizzazione della sorgente di ionizzazione</i>	29
2.2.5 <i>Linearità della risposta strumentale</i>	30
2.2.6 <i>Limite di rilevabilità e quantificazione strumentale</i>	31
<i>2.3 Sviluppo del metodo d'analisi delle microcistine e nodularina in modalità di acquisizione Precursor Ion Scan</i>	32
2.3.1 <i>Sviluppo del metodo Precursor Ion scan</i>	32
2.3.2 <i>Valutazione delle performance del metodo a fini quantitativi</i>	35
<i>2.4 Conclusioni</i>	36
<i>2.5 Riferimenti bibliografici</i>	38

### **CAPITOLO 3**

<b>Le cianotossine nell'aerosol atmosferico</b>	41
<b>3.1 Introduzione</b>	41
<b>3.2 Parte sperimentale</b>	43
3.2.1 Campionamento	43
3.2.2 Materiali	43
3.2.3 Preparazione del campione	44
<b>3.3 Risultati e discussione</b>	44
3.3.1 Validazione del metodo	44
3.3.2 Applicazione del metodo	47
<b>3.4 Conclusioni</b>	49
<b>3.5 Riferimenti bibliografici</b>	50

### **CAPITOLO 4**

<b>Le cianotossine nelle acque dolci</b>	51
<b>4.1 Introduzione</b>	51
<b>4.2 Parte sperimentale</b>	52
4.2.1 Campionamento	52
4.2.2 Materiali	54
4.2.3 Preparazione del campione	54
4.2.4 Analisi dei nutrienti	55
<b>4.3 Risultati e discussione</b>	58
4.3.1 Validazione del metodo	60
4.3.1.1 Frazione disciolta	60
4.3.1.2 Frazione particellata	63
4.3.2 Valutazione dell'effetto matrice	66
4.3.3 Applicazione del metodo	70
<b>4.4 Conclusioni</b>	72
<b>4.5 Riferimenti bibliografici</b>	74

**CAPITOLO 5**

<b>Determinazione di microcistine e nodularina nei mitili</b>	75
<b>5.1 Introduzione</b>	75
<b>5.2 Parte sperimentale</b>	76
5.2.1 <i>Materiali</i>	76
5.2.2 <i>Preparazione del campione</i>	77
<b>5.3 Risultati e discussione</b>	77
5.3.1 <i>Validazione del metodo</i>	77
<b>5.4 Conclusioni</b>	81
<b>5.5 Riferimenti bibliografici</b>	82

*Il parte***LE TOSSINE MARINE: l'acido domoico****CAPITOLO 6**

<b>Le tossine marine</b>	85
<b>6.1 Amnesic Shellfish Poisoning</b>	87
6.1.1 <i>La produzione di acido domoico</i>	88
6.1.2 <i>Il meccanismo d'azione tossica dell'acido domoico</i>	89
<b>6.2 Riferimenti bibliografici</b>	90

**CAPITOLO 7**

<b>Messa a punto di un metodo strumentale per la determinazione dell'acido domoico mediante HPLC-MS/MS</b>	91
<b>7.1 Introduzione</b>	91
<b>7.2 Sviluppo del metodo HPLC-ESI-MS/MS</b>	93
7.2.1 <i>Materiali</i>	93
7.2.2 <i>Messa a punto del metodo MRM</i>	94
7.2.3 <i>Sviluppo del metodo cromatografico</i>	99
7.2.4 <i>Ottimizzazione dei parametri relativi alla sorgente</i>	99
7.2.5 <i>Ottimizzazione del volume di iniezione</i>	100
7.2.6 <i>Individuazione dello standard interno</i>	101
7.2.7 <i>Linearità della risposta strumentale e limiti di rilevabilità e quantificazione strumentali</i>	105
<b>7.3 Conclusioni</b>	106
<b>7.4 Riferimenti bibliografici</b>	107

## CAPITOLO 8

<b>Determinazione di acido domoico nell'acqua di mare</b>	109
<b>8.1 Introduzione</b>	109
<b>8.2 Parte sperimentale</b>	111
8.2.1 Campionamento nel mare di Ross (Antartide)	111
8.2.2 Campionamento nella laguna di Venezia	114
8.2.3 Materiali	116
8.2.4 Preparazione del campione	116
8.2.5 Analisi delle clorofilla a e dei nutrienti	117
8.2.6 Analisi del fitoplancton	117
<b>8.3 Risultati e discussione</b>	118
8.3.1 Validazione del metodo	119
8.3.2 Valutazione dell'effetto matrice	125
<b>8.4 Applicazione del metodo</b>	131
8.4.1 Determinazione dell'acido domoico nel mare di Ross (Antartide)	131
8.4.2 Determinazione dell'acido domoico nella laguna di Venezia	133
<b>8.5 Conclusioni</b>	141
<b>8.6 Riferimenti bibliografici</b>	143

## CAPITOLO 9

<b>L'acido domoico nei mitili</b>	145
<b>9.1 Introduzione</b>	145
<b>9.2 Parte sperimentale</b>	146
9.2.1 Materiali	146
9.2.3 I campioni analizzati	147
9.2.4 Preparazione del campione	147
<b>9.3 Risultati e discussione</b>	148
9.3.1 Validazione del metodo	149
<b>9.4 Conclusioni</b>	153
<b>9.5 Riferimenti bibliografici</b>	155

**CAPITOLO 10**

<b>Determinazione di acido domoico nell'aerosol atmosferico</b>	157
<b>10.1 Introduzione</b>	157
<b>10.2 Parte sperimentale</b>	157
10.2.1 Campionamento	157
10.2.2 Materiali	158
10.2.3 Preparazione del campione	158
<b>10.3 Risultati e discussione</b>	159
10.3.1 Validazione del metodo	159
<b>10.4 Conclusioni</b>	161
<b>10.5 Riferimenti bibliografici</b>	161

**III parte****LE TOSSINE ALIMENTARI: l'ocratossina A****CAPITOLO 11**

<b>Messa a punto di un metodo per la determinazione dell'ocratossina A mediante HPLC-ICP-MS</b>	165
<b>11.1 Introduzione</b>	165
11.1.1 L'ocratossina A	165
11.1.2 I metodi di analisi: stato dell'arte	166
<b>11.2 Scopo del metodo</b>	168
<b>11.3 Approccio sperimentale</b>	168
<b>11.4 Risultati e discussione</b>	169
11.4.1 Metal tag dell'ocratossina A	169
11.4.2 Prove preliminari per individuare il metodo cromatografico	174
11.4.3 Ottimizzazione ICP-MS per l'accoppiamento con HPLC	177
11.4.4 Sviluppo del metodo cromatografico	179
<b>11.5 Conclusioni</b>	186
<b>11.6 Riferimenti bibliografici</b>	188
<b>Conclusioni</b>	189
<b>APPENDICE I – Abbreviazioni</b>	195
<b>APPENDICE II – Pubblicazione</b>	197



## Scopo della tesi

Lo sviluppo dei sistemi analitici come HPLC/MS ha permesso l'analisi di molecole estremamente importanti dal punto di vista ambientale, sia di natura antropogenica sia di origine naturale.

Una classe di composti molto studiati per i loro effetti sulla salute umana e sull'ambiente sono le tossine, sostanze prodotte da organismi animali, vegetali o microbici che possono essere dannose per gli esseri viventi. In questo studio l'attenzione sarà focalizzata sulle tossine algali e su quelle alimentari.

Le tossine algali sono dei metaboliti secondari prodotti da organismi marini per i quali queste sostanze assumono in taluni casi nei confronti dell'organismo produttore il ruolo di "armi chimiche" di difesa contro la predazione come dimostrato dal fatto che alcuni di questi metaboliti sono stati ritrovati in organismi a basso livello evolutivo sopravvissuti all'evoluzione delle specie marine.

L'obiettivo di questa tesi di dottorato consiste nello sviluppo e nella convalida di metodi analitici HPLC-MS, volti alla determinazione di tossine algali in diverse matrici ambientali. In particolare l'attenzione si è focalizzata sulle tossine algali d'acqua dolce, le microcistine, e una tossina marina, l'acido domoico, andando a sviluppare delle procedure pre-analitiche per la determinazione di queste sostanze in tre diversi comparti ambientali: il comparto idrico, dove queste sostanze vengono emesse, i molluschi, organismi che ne possono essere contaminati, e l'aerosol atmosferico, al fine di studiare eventuali trasferimenti dal comparto idrico all'atmosfera.

Lo scopo della tesi è quello di creare dei metodi con alta sensibilità, prestando particolare attenzione all'uso dello standard interno come metodo di quantificazione che molto spesso in letteratura viene sottovalutato ma che garantisce al metodo accuratezza e robustezza.

Al fine di sviluppare metodi alternativi che possano essere più performanti e più sensibili di quelli presenti in letteratura è stato studiato un metodo per la determinazione di una tossina alimentare, l'ocratossina A, mediante la tecnica ibrida HPLC-ICP-MS.

Lo sviluppo di questo metodo ha reso necessario lo studio di una procedura di derivatizzazione per rendere la molecola organica rivelabile al sistema ICP-MS.



*I parte*

***LE TOSSINE D'ACQUA DOLCE:***

*le cianotossine*



## CAPITOLO 1

### Le tossine cianobatteriche

#### *1.1 I cianobatteri*

Le Cianoficee sono organismi procarioti ubiquitari: sono presenti nell'atmosfera, nelle acque lacustri, marine e potabili, nel suolo e persino nelle rocce [1].

Sono organismi fotosintetici come le alghe ma la loro struttura cellulare è simile a quella di un batterio: sono privi di una parete cellulare, non si riproducono sessualmente e non hanno membrane legate al nucleo o organelli specializzati. Oltre alla clorofilla a, possiedono altri pigmenti tra cui la ficocianina (azzurro), presente solo nei cianobatteri, grazie ai quali i cianobatteri vengono comunemente chiamati alghe blu-verdi [2].

Possiedono un'ampia tolleranza alla disidratazione [3] e alcune specie riescono a sopravvivere anche in ambienti con un alto grado di salinità [4]. Molte specie di Cianoficee sono in grado di fissare l'azoto atmosferico portando a numerosi vantaggi soprattutto in ambienti in cui tale nutriente è presente in basse concentrazioni.

La fioritura algale è favorita da una colonna d'acqua stabile, acque calde, alte concentrazioni di nutrienti, basse di CO<sub>2</sub> e basso carico di zooplancton [5-7]. Le attività umane, causa principale di fenomeni di eutrofizzazione, incidono in maniera significativa sulla proliferazione di tali organismi con conseguenti ripercussioni sulla qualità delle acque.

Nelle zone tropicali, i laghetti o le pozze caratterizzate da alta temperatura e intenso irraggiamento luminoso risultano gli habitat ideali per la proliferazione di Cianoficee dando origine così a dei *blooms* che assumono varie tonalità sul verde e sul blu.

La durata di un *bloom* stagionale dipende ampiamente dalle condizioni climatiche della regione. Nelle zone temperate, i *blooms* di cianoficee si verificano principalmente durante fine estate e inizio autunno e possono durare anche 2-4 mesi.

In regioni con clima mediterraneo o subtropicale, le fioriture iniziano in primavera e si prolungano nel tempo. In Francia normalmente tali organismi sono presenti per quattro mesi mentre in paesi come la Spagna, il Portogallo, il Sud Africa e il Sud Australia possono vivere anche per sei mesi. In anni secchi o in paesi tropicali e subtropicali come la Cina, il Brasile e l'Australia, i *blooms* di cianoficee possono durare tutto l'anno, con conseguenti problemi alle riserve idriche [8]. Messineo et al. [9] hanno condotto un intenso studio sulla distribuzione delle cianotossine nei laghi italiani dimostrando come

tali sostanze siano molto diffuse nel territorio e hanno una permanenza sul territorio annuale.

Le Cianoficee includono specie pelagiche e altre bentoniche che formano due tipi diversi di aggregati.

Le specie pelagiche possono fluttuare lungo la colonna d'acqua e migrare verticalmente in funzione della disponibilità di nutrienti, della temperatura e della luce. Queste specie contengono vescicole di gas intracellulare che aiutano la cellula a galleggiare e a mantenere la posizione alla profondità desiderata nella colonna d'acqua. Le dimensioni delle vescicole sono anche adattabili alle condizioni atmosferiche e lentamente si adattano alle condizioni climatiche. Questo può portare ad un accrescimento della concentrazione sulla superficie con formazione di schiuma galleggiante in condizioni di assenza di vento, mentre la schiuma viene ad essere risospesa lungo la colonna d'acqua per azione del vento e delle onde. Il vento e le onde possono anche essere la causa della disintegrazione cellulare con conseguente rilascio nell'ambiente del materiale ivi contenuto [10,11].

Le specie bentoniche invece crescono su diversi substrati (fango o rocce), formando dei tappeti che possono essere dispersi in presenza di moto ondoso. Questi tipi di cianoficee sono delle specie meno tossiche rispetto alle pelagiche in quanto hanno minore possibilità di venir a contatto con gli esseri viventi [12].

Le Cianoficee sono dei batteri gram-negativi capaci di produrre numerose pericolose tossine come prodotti metabolici secondari, chiamate cianotossine. La classe delle Cianoficee include 150 generi e circa 2000 specie. Vengono distinti in organismi produttori o non produttori di cianotossine. Gli organismi responsabili del cosiddetto *cyanobacteria toxin poisoning* (CTP) includono circa 40 generi ma i principali sono *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nostoc* and *Oscillatoria* (*Planktothrix*) [13].

Le cianotossine possono essere suddivise in base alla loro struttura chimica in tre gruppi: i peptidi ciclici, che includono le epatossiche microcistine e le nodularine, gli alcaloidi, che includono cilindrospermopsina, anatoxina e saxitossina, e infine i liposaccaridi che sono potenzialmente irritanti. Vi sono inoltre delle cianotossine marine che appartengono al gruppo degli alcaloidi (aplysiatossina, debromoaplysoatossina e lyngbyatossina-a) che causano problemi gastrointestinali e irritazione alla pelle [13].

Questi metabolici secondari vengono anche classificati in base al loro effetto tossicologico in neurotossine (anatosina-a, anatosina-a(S) e saxitossine), citossina (cilindrospermopsina) e epatotossine (microcistine e nodularina) [14].

Le neurotossine agiscono bloccando la trasmissione del segnale neuronale attraverso due meccanismi: le anatosine agiscono come simulatore dell'acetilcolina (l'anatosina-a) e inibitore della colinesterasi (l'anatosina-a(s)), causando effetti simili a quelli prodotti dagli organofosfati mentre le saxitossine bloccano il canale del sodio, distruggendo il bilancio di sodio all'interno delle cellule nervose. Nonostante la loro alta tossicità, questa classe di tossine sono state solo occasionalmente causa di intossicazione umana, mentre numerosi sono stati i casi di avvelenamento negli animali selvatici e domestici, a seguito di ingestione dell'acqua contaminata o del materiale schiumoso.

La citossina o cilindrospermopsina è un alcaloide che blocca la sintesi delle proteine legandosi al DNA o all'RNA. Porta a danni citogenetici mediante rottura del filamento del DNA e perdita di interi cromosomi. Tale tossina risulta potenzialmente cancerogena. Le microcistine sono le più diffuse e agiscono bloccando la protein-fosfatasi 1 e 2a, causando tossicità a livello epatico. Le microcistine sono anche ritenute essere promotrici di tumore, soprattutto a livello epatico [14].

### ***1.2 Microcistine e nodularine***

Globalmente le cianotossine maggiormente trovate nelle acque dolci o salmastre sono le microcistine e la nodularina. In genere, le cianoficee producono una piccola concentrazione di tossina extracellulare in un intervallo compreso tra 0.1 e 1 µg/L mentre il contenuto intracellulare risulta essere di alcuni ordini di grandezza più alto. Nei laghi o nei fiumi, le tossine liberate dalle cellule vengono rapidamente diluite nella grande massa d'acqua, mentre la concentrazione diviene maggiore nel momento in cui il bloom comincia a diminuire a seguito della morte cellulare con conseguente dispersione del proprio contenuto [10].

Le microcistine sono state isolate la prima volta dalla cianoficea *Microcystis aeruginosa*, che diede il nome alla tossina. La produzione di microcistine è caratteristica di diversi generi di Cianoficee: *Microcystis* (*aeruginosa*, *wesenbergii* and *viridis*), *Anabaena* (*flos-aquae*), *Nostoc*, *Oscillatoria* (*Planktothrix*) (*agardhii*, *rubescens* and

*tenuis*), *Anabaenopsis*, un genere isolato nei suoli *Haphalosiphon (hibernicus)* e *Aphanocapsa (cumulus)* [10,13].

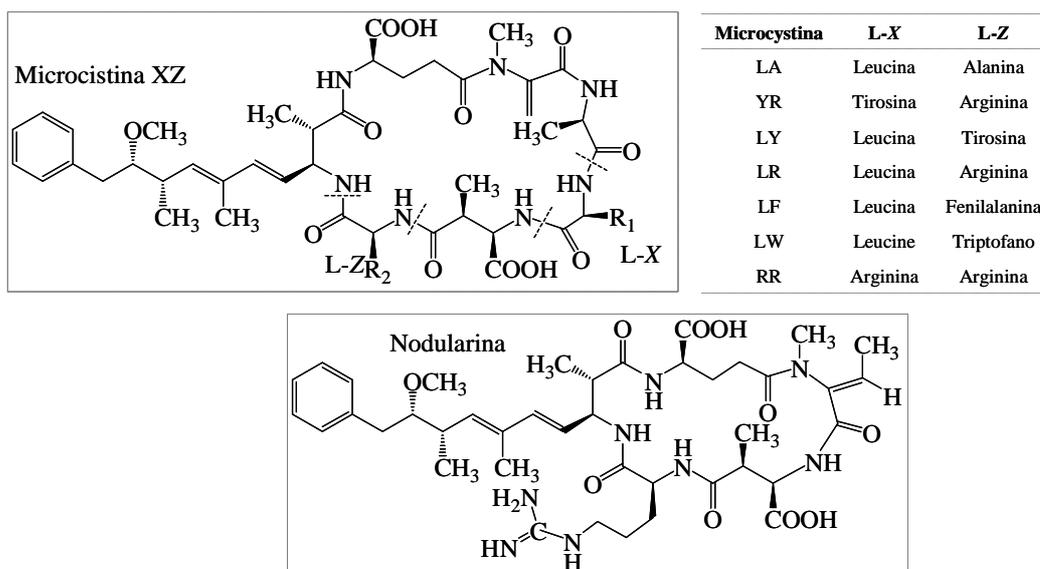
Le nodularine invece sono prodotte dal solo cianobatterio *Nodularia spumigena* [10].

### 1.3 Struttura chimica e proprietà

Le microcistine sono eptapeptidi ciclici la cui massa molecolare varia tra i 500 e 4000 Da, anche se maggior parte delle varianti di tali sostanze possiedono una massa compresa tra i 900 e i 1100 Da. Ad oggi in letteratura si conoscono solo una settantina di microcistine [13].

Le microcistine sono costituiti da un gruppo di sette amminoacidi, cinque dei quali non proteici mentre due proteici, legati mediante legame peptidico e disposti in una struttura ciclica. Sono i due amminoacidi proteici che caratterizzano le microcistine mentre quelli non proteici identificano le varianti.

La struttura generale è ciclo-(D-alanina-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-glutammato-Mdha) dove X e Z identificano genericamente i possibili L amminoacidi, D-MeAsp individua l'acido D-eritro-β-metilaspatico mentre Mdha rappresenta N-metildeidroalanina. L'amminoacido Adda, acido (2S,3S,8S, 9S)-3-amino-9-metossi-2,6,8-trimetil-10fenildeca-4,6-dienico, è la struttura che caratterizza le tossine peptiche cicliche (figura 1.1).



**Figura 1.1.** Struttura chimica delle microcistine e nodularina oggetto di questo studio

Nel 1988 Carmichael et al. [15] stabilirono la nomenclatura che ancora oggi viene utilizzata per distinguere le diverse varianti di microcistine: i residui genericamente sopra indicati con *X* e *Z* sono sostituiti con L-amminoacidi nelle diverse varianti naturalmente presenti e ogni amminoacido viene identificato con una lettera, come si può notare dalla tabella riportata in figura 1.1.

In genere il residuo *X* viene ad essere sostituito con leucina, arginina e tirosina ma anche con omotirosina, alanina, fenilalanina, omofenilalanina, metionina-*S*-ossido o triptofano mentre in *Z* si avvicendano l'arginina o l'alanina anche se non sono inconsueti l'acido amino-isobutirrico, l'omoarginina e la metionina-*S*-ossido. Sono inoltre possibili delle demetilazioni del residuo D-MeAsp e/o del MDha.

Molte varianti di microcistine contengono acido  $\beta$ -metilaspartico, acido glutammico e alanina con metilamina attaccata all'acido glutammico. In alcune microcistine, il gruppo MDha è sostituito da L-serina mentre la D-alanina è sostituita dalla D-serina. In alcune varianti vi possono anche essere delle piccole modificazioni nel gruppo Adda o delle acilazioni del residuo glutammico e tali modifiche strutturali incidono a livello tossicologico diminuendone o addirittura annullandone la tossicità [7,10].

Le nodularina R è un pentapeptide monociclico la cui massa molecolare è di 824 Da. La struttura generale è ciclo-(D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-glutammato-Mdha) dove L-Arg indica L-arginina, D-MeAsp l'acido D-eritro- $\beta$ -metilaspartico mentre Mdha è l'acido 2-(metilamino)-2-deidrobutilirrico (figura 1.1). La nodularina, come le microcistine, è caratterizzata dalla presenza del gruppo Adda. La prima grande differenza con le microcistine è la mancanza di uno dei due residui amminoacidi mentre il residuo *N*-metildeidroalanina è sostituito con l'acido 2-(metilamino)-2-deidrobutilirrico. La più comune nodularina è la R dove l'amminoacido presente è l'arginina ma è presente in natura anche la nodularina V, con la L-valina, chiamata motuporina [16]. Solo poche varianti di nodularina sono state trovate in natura, una delle quali presenta demetilazione nel gruppo D-MeAsp e un'altra demetilazione nel gruppo Adda [10].

Le microcistine e le nodularine sono solubili in acqua, metanolo ed etanolo mentre sono insolubili in acetone, etere, cloroformio e benzene. Sono molecole relativamente polari mentre il residuo Adda conferisce alla molecola una parziale idrofobicità.

La struttura molecolare di questi peptidi ciclici li rende molto stabili e resistenti alle peptidasi batteriche ed eucariote. Presentano una stabilità nelle riserve idriche di circa una settimana mentre sono stabili per un lungo periodo in acqua filtrata o deionizzata. A alte temperature (40°C) e a pH sia alti che bassi è stata osservata una lenta idrolisi che

arriva a una rottura nella struttura >90% in 20 settimane a pH 1 mentre per una maggiore rottura della struttura è necessario un pH 9 per 12 settimane. In genere una rapida idrolisi chimica può avvenire solo in condizioni controllate in laboratorio mediante aggiunta di HCl 6M ad alta temperatura. Possono essere ossidate dall'ozono e da altri agenti ossidanti forti [10]. Le microcistine sono stabili alla luce solare mentre l'irraggiamento a una luce UV con una lunghezza d'onda di circa 254 nm comporta una rapida decomposizione delle tossine [17].

#### ***1.4 Esposizione umana alle microcistine e nodularine***

L'esposizione alle tossine cianobatteriche può avvenire via orale attraverso ingestione di acqua da bere o di cibo contaminato dalle cianotossine oppure attraverso il contatto della pelle con acqua contaminata. Una sorgente a cui finora non è stata fornita la dovuta attenzione è l'inalazione di tossine che sono state emesse nell'atmosfera legate allo spray marino, che può formarsi naturalmente con le onde o con il vento oppure venir generato durante l'esecuzione di particolari attività umane, come per esempio gli sport acquatici [13].

I sintomi osservati a seguito dell'ingestione di piccole quantità di microcistine e/o nodularine prevedono epatiti, insufficienza renale ed intestinale. A questi vengono associati anche fenomeni di debolezza, anoressia, emicrania acuta, problemi gastrici, vomito, dolori articolari e muscolari, diarrea, problemi urinari e aumento delle  $\gamma$ gt, indice di un danno epatico [14].

L'esposizione cronica a bassi livelli di tossine induce alterazioni del fegato e del tratto digerente con necrosi, progressive necrosi cellulari e infiltrazioni leucocitarie nei tessuti danneggiati [18,19].

Il contatto diretto con il *bloom* cianobatterico comporta gastriti, dermatiti acute e altri sintomi quali ad esempio riniti, congiuntiviti e asma a seguito di un contatto con la pelle o con il naso.

Numerosi sono i casi di esposizione a epatotossine mediante l'acqua da bere oppure a seguito della pratica di sport acquatici in siti ove è in corso una fioritura di cianoficee. Il primo evento documentato risale al 1844 a Londra quando una donna soffrì di intensi dolori addominali dopo aver eliminato per via rettale dell'*Oscillatoria* [20].

Nel 1931 in Ohio (USA) ebbe luogo la prima intossicazione di massa causata da microcistine con conseguente gastroenterite per un centinaio di persone. Negli anni

seguenti, diversi casi si sono registrati negli Stati Uniti d'America, in Australia, Sud America e Africa.

Nel 1966 si verificò un'importante contaminazione da *Microcystis* di alcune riserve idriche della città di Harare (Zimbabwe), con conseguenti casi di gastroenteriti tra i bambini della città.

Due dei più importanti casi di intossicazioni a seguito dell'ingestione di acqua contaminata da cianobatteri sono risultati letali in Brasile. Nel 1993 un intenso *bloom* di *Microcystis* e *Anabaena* nel bacino idrico di Itaparica ha portato a circa duemila casi di gastroenterite con conseguente morte di ottantotto persone, molte delle quali bambini [21]. Nel 1996, invece, diversi casi di insufficienza epatica sono stati riscontrati presso il centro di emodialisi di Caruaru: cento persone hanno sviluppato insufficienza epatica acuta e di queste ben settantasei sono morte. Le cause di questo evento sono da ricercare nell'acqua usata per le operazioni di dialisi, dove erano presenti microcistine YR, LR e AR [13].

Molto pericolosi sono i prodotti alimentari a base di alghe in quanto molti di questi contengono *Aphanizomenon flos-aquae*, un'alga blu-verde che sembra coesistere con la *Microcystis aeruginosa*. Pertanto questo tipo di alimenti risultano molto spesso contaminati da microcistine [22].

L'uso ricreativo, come per esempio gli sport d'acqua, e l'impiego dell'acqua per l'igiene personale sono le principali cause di esposizione dermica a tossine cianobatteriche, portando molto spesso a reazioni allergiche, asma e dermatiti [21]. Le evidenze epidemiologiche degli effetti negativi sulla salute umana dopo il contatto con l'acqua a scopi ricreativi hanno stimato il coinvolgimento di circa ottocentocinquanta persone, con un'alta incidenza di diarrea, vomito, irritazione agli occhi e alle orecchie, arrossamenti cutanei e febbre nei sette giorni seguenti al contatto. I sintomi si sono accentuati notevolmente con il contatto diretto con l'acqua o con la massa cellulare delle Cianoficee [10].

Le tossine possono essere aerosolizzate e assorbite attraverso la pelle, possono essere inalate e arrivare ai polmoni oppure entrare nel tratto digerente e depositarsi nelle principali vie aeree a seguito di ingestione di acqua o cibi contaminati. Sono stati condotti alcuni studi [23-25] che hanno dimostrato la presenza di aerosol contaminato da microcistine e l'effettivo contatto umano a seguito dell'esposizione in prossimità di riserve idriche contaminate.

La terapia è studiata in relazione ai sintomi sviluppati, allo scopo di mantenere o riportare alla normalità le funzioni dell'organismo. In alcuni casi antistaminici o cortisone sono stati impiegati nelle reazioni allergiche cutanee.

Nei casi di esposizione acuta ad alte concentrazioni di microcistine o nodularine, i danni epatici che si creano sono molto seri, rapidi e irreversibili e rendono le terapie pressoché inutili; l'effettiva profilassi è problematica.

### ***1.5 Meccanismo d'azione***

Le microcistine e le nodularine entrano nell'organismo usando come sistema di trasporto gli acidi biliari. Questi composti vengono ad essere accumulati nel fegato, nello stomaco e nei reni.

Una via alternativa di assorbimento di queste tossine è il contatto intranasale, meccanismo importante nei casi di lisi cellulare con conseguente dispersione del contenuto tossico nell'ambiente e nell'aria. Questo tipo di assorbimento comporta numerosi problemi nei casi di attività ricreative svolte nei pressi di un sito ove vi sia il bloom cianobatterico: l'inalazione delle goccioline e dello spray formato dall'attività degli sport d'acqua possono incrementare l'assorbimento delle tossine nell'uomo rispetto all'azione che comunque viene svolta dalle onde e del vento, fenomeni che portano a disperdere le sostanze nell'atmosfera [23,24,26].

La tossicità delle microcistine e delle nodularine è attribuita al residuo Adda, il quale agisce inibendo le protein-fosfatasi degli eucarioti, essenziali per molti processi regolari della cellula come la crescita, la sintesi proteica, il metabolismo glicogenico e la contrazione muscolare [27].

Tale gruppo funzionale viene a legarsi covalentemente nel caso delle microcistine e non covalentemente per le nodularine agli enzimi serina/treonina protein-fosfatasi 1 e 2A (PP1 e PP2A), inibendone l'azione e portando a un iperfosforilazione delle proteine del citoscheletro [28]. Questo provoca la rottura dell'ultrastruttura epatica che si manifesta con il rigonfiamento fino al doppio del suo volume del fegato con cospicua emorragia intraepatica centro lobulare, preceduta dal rigonfiamento degli epatociti e dalla rottura dei sinusoidi epatici.

Un ulteriore bersaglio delle microcistine, se presenti in alte concentrazioni, è la subunità  $\beta$  dell'ATP sintetasi, che porta apoptosi mitocondriale [8].

Infine è stato dimostrato che le microcistine aumentano lo stress ossidativo. L'esposizione alle tossine induce alla formazione di specie ossigeno reattive, con perdita di potenziale di membrana mitocondriale, permeabilità mitocondriale, transizione e attivazione della protein-chinasi II  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina dipendente. Tutti questi effetti conducono ad apoptosi cellulare [29].

Un ruolo di protezione è invece dimostrato dal glutatione: il legame a questo tripeptide aumenta la solubilità in acque e quindi l'escrezione delle tossine. Azione protettive si verificano anche nei casi in cui avviene un legame tra la funzionalità Mdha delle microcistine e le protein-fosfatasi [30].

A lungo termine, le microcistine e le nodularine hanno dimostrato essere dei promotori tumorali e non degli induttori tumorali [18,31].

### ***1.6 Riferimenti bibliografici***

- [1] B.A. Whitton, M. Potts, *Introduction to the Cyanobacteria in the Ecology of Cyanobacteria*, Kluwer Academic Publishers, 2000.
- [2] J. Rapala, K. Sivonen, *Microbial Ecology* 36 (1998) 181.
- [3] M. Potts, *Microbiological Reviews* 58 (1994) 755.
- [4] J. Bauld, *Hydrobiologia* 81 (1981) 87.
- [5] S. Pitois, M.H. Jackson, B.J.B. Wood, *International Journal of Environmental Health Research* 10 (2000) 203.
- [6] M.B. Tyagi, J.K. Thakur, D.P. Singh, A. Kumar, E.G. Prasuna, *Journal of Microbiology and Biotechnology* 9 (1999) 9.
- [7] T.N. Duy, P.K.S. Lam, G.R. Shaw, D.W. Connell, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol 163 (2000).
- [8] M.E. van Apeldoorn, H.P. van Egmond, G.J.A. Speijers, G.J.I. Bakker, *Molecular Nutrition & Food Research* 51 (2007) 7.
- [9] V. Messineo, S. Bogialli, S. Melchiorre, N. Sechi, A. Luglie, P. Casiddu, Marlani, B.M. Padedda, A. Di Corcia, R. Mazza, E. Carloni, M. Bruno, *Limnologica* 39 (2009) 95.
- [10] I. Chorus, J. Bartram, in WHO (Editor), Spon Press, London, 1999.
- [11] WHO, in W.H. Organization (Editor), Geneva, 2003.
- [12] K. Mez, K. Hanselmann, H.R. Preisig, *Hydrobiologia* 368 (1998) 1.
- [13] W.W. Carmichael, *Human and Ecological Risk Assessment* 7 (2001) 1393.
- [14] A. Zaccaroni, D. Scaravelli, *Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection*, CNR Institute of Biophysics, Pisa, Italy, 2007.
- [15] W.W. Carmichael, V. Beasley, D.L. Bunner, J.N. Eloff, I. Falconer, P. Gorham, K.I. Harada, T. Krishnamurthy, M.J. Yu, R.E. Moore, K. Rinehart, M. Runnegar, O.M. Skulberg, M. Watanabe, *Toxicon* 26 (1988) 971.
- [16] E.D. Desilva, D.E. Williams, R.J. Andersen, H. Klix, C.F.B. Holmes, T.M. Allen, *Tetrahedron Letters* 33 (1992) 1561.
- [17] K. Tsuji, T. Watanuki, F. Kondo, M.F. Watanabe, S. Suzuki, H. Nakazawa, M. Suzuki, H. Uchida, K. Harada, *Toxicon* 33 (1995) 1619.
- [18] W.W. Carmichael, *Scientific American* 270 (1994) 78.
- [19] W.W. Carmichael, *Journal of Applied Bacteriology* 72 (1992) 445.
- [20] A. Farre, *Transactions Royal Microscopical Society London* 1 (1844) 92.
- [21] P.V. Rao, N. Gupta, A.S.B. Bhaskar, R. Jayaraj, *Journal of Environmental Biology* 23 (2002) 423.
- [22] D.J. Gilroy, K.W. Kauffman, R.A. Hall, X. Huang, F.S. Chu, *Environmental Health Perspectives* 108 (2000).
- [23] L.C. Backer, W. Carmichael, B. Kirkpatrick, C. Williams, M. Irvin, Y. Zhou, T.B. Johnson, K. Nierenberg, V.R. Hill, S.M. Kieszak, Y.S. Cheng, *Marine Drugs* 6 (2008) 389.
- [24] Y.S. Cheng, Y. Zhou, C.M. Irvin, B. Kirkpatrick, L.C. Backer, *Marine Drugs* 5 (2007) 136.
- [25] L.C. Backer, S.V. McNeel, T. Barber, B. Kirkpatrick, C. Williams, M. Irvin, Y. Zhou, T.B. Johnson, K. Nierenberg, M. Aibel, R. LePrell, A. Chapman, A. Foss, S. Corum, V.R. Hill, S.M. Kieszak, Y.S. Cheng, *Toxicon* 55 (2010) 909.
- [26] B.M. Paddle, *Journal of Applied Toxicology* 23 (2003) 139.
- [27] I.R. Falconer, *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica* 33 (2005) 64.
- [28] T.A.M. Msagati, B.A. Siame, D.D. Shushu, *Aquatic Toxicology* 78 (2006) 382.
- [29] A. Mikhailov, A.S. Harmala-Brasken, J. Hellman, J. Meriluoto, J.E. Eriksson, *Chemico-Biological Interactions* 142 (2003) 223.
- [30] J.G. Pace, N.A. Robinson, G.A. Miura, C.F. Matson, T.W. Geisbert, J.D. White, *Toxicology and Applied Pharmacology* 107 (1991) 391.
- [31] K. Sivonen, G.J. Jones, *Cyanobacterial Toxins in: Toxic Cyanobacteria in Water*, I. Spon, E. Spon, F.N., London, 1999.

## CAPITOLO 2

### Messa a punto di un metodo strumentale per la determinazione di microcistine e nodularina mediante HPLC-MS/MS

#### 2.1 Introduzione

L'analisi delle tossine cianobatteriche viene condotta specificatamente in base alle caratteristiche chimiche della molecola in esame operando in maniera qualitativa o quantitativa a seconda dell'obiettivo dello studio. In un'analisi qualitativa il metodo deve essere caratterizzato da ripetibilità ed affidabilità mentre in una determinazione quantitativa sono indispensabili anche selettività e sensibilità.

I metodi più affidabili, ripetibili, sensibili e selettivi per l'analisi delle microcistine e della nodularina sono i sistemi cromatografici accoppiati a vari tipi di detector.

Sono presenti in letteratura numerosi metodi di identificazione delle cianotossine o della specie produttrice.

Un metodo poco dispendioso prevede l'uso di un microscopio a luce diretta, con il quale viene eseguito un riconoscimento e una conta delle cellule tossicogeniche. Il limite di rilevabilità di questo metodo è di 10 cellule per mL.

Il saggio colorimetrico di inibizione della proteinfosfatasi (PPI) non è specifico per le microcistine in quanto l'enzima fosfatasi può essere inibito anche da altri composti presenti nell'ambiente. Il range di applicazione varia tra 0.3 e 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  [1].

I saggi immunologici *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) basano il loro funzionamento sul riconoscimento del gruppo funzionale Adda, caratteristico delle microcistine e delle nodularine [2,3]. Poiché sono molto veloci, economici e facili da eseguire molto spesso risultano il metodo ideale per eseguire programmi di *screening*.

I metodi ELISA vengono considerati semi quantitativi in quanto la quantificazione viene fatta mediante curva di calibrazione standard contenente solo la microcistina LR e quindi la reattività massima si avrà con quella variante mentre le altre porteranno a una sensibilità diversa che però non viene opportunamente considerata. Il *range* lineare varia tra i 0.2 e 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  e i campioni con una concentrazione superiore vengono diluiti per ottenere il risultato semiquantitativo [3].

Un altro test di tipo genetico biologico è il saggio PCR (*polymerase chain reaction*), il cui principio si fonda sul riconoscimento del frammento di DNA del gene *mcyA*. È un

metodo molto specifico anche se risente di problemi legati a reazioni di inibizione o un'insufficiente presenza di cellule cianobatteriche [4].

Il metodo HPLC è la procedura raccomandata come metodo standard per la determinazione e la quantificazione di microcistine [5].

Un protocollo standard per l'analisi delle microcistine mediante HPLC è stato adottato dalla *Queensland Health Scientific Services* (QLD Health Method #15605), l'istituto pubblico per la salute australiano. L'analisi cromatografica impiega una colonna a fase inversa mentre la rivelazione avviene mediante spettroscopia UV. Il limite di rilevabilità è di  $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$  per ciascuna microcistina [6].

Un metodo per la determinazione delle microcistine totali GC-MS è stato messo a punto da Kaya et al. [7] basato sulla quantificazione dell'acido 2-metil-3-metossi-4-fenilbutirrico (MMPB), prodotto di ossidazione delle microcistine. Questa tecnica risulta molto sensibile ma non distingue i vari congeneri in quanto tutte le microcistine vengono ossidate portando allo stesso prodotto. La tecnica risulta quindi non applicabile se lo scopo è quello di definire la reale tossicità del campione

La cromatografia e l'elettroforesi capillare sono i soli metodi analitici che permettono di separare le microcistine e identificare i singoli congeneri.

Una fioritura di Cianofite comporta l'emissione nell'ambiente di diversi congeneri di microcistine. Namikoshi et al. [8] hanno individuato ben diciannove microcistine da un *bloom* di *Microcystis* in Illinois (USA). Nel Regno Unito invece da un *bloom* di *Microcystis aeruginosa* sono state isolate quindici microcistine [9]. I vari metodi chimici o biologici sopra descritti possono essere utili per screening ma non possono stimare accuratamente la tossicità del materiale testato. Risulta quindi indispensabile avere una separazione efficiente delle varie varianti al fine di evitare di attribuire a un campione una tossicità maggiore della reale [10].

La tipica separazione cromatografica impiega una colonna a fase inversa  $C_{18}$  e una eluzione a gradiente. Le fasi mobili maggiormente usate sono acqua e acetonitrile abbinate all'uso di additivi acidi che aumentano l'efficienza cromatografica.

L'additivo acido maggiormente usato è l'acido trifluoroacetico (TFA) che mantiene il pH basso al fine di protonare i gruppi carbossilici dei peptidi, nonché agire da controione per minimizzare le interazioni tra i gruppi basici e i gruppi silanologici della superficie silicea della colonna [11,12].

Sebbene le eluzioni a gradiente spesso portano a una maggiore risoluzione cromatografica, molti studiosi tendono ancora a preferire eluzioni isocratiche in quanto

risultano più semplici [13]. La separazione di microcistine in condizioni isocratiche richiede necessariamente l'uso di additivi acidi e il numero di microcistine che possono essere risolte risulta molto limitato; nel caso in cui l'obiettivo sia l'individuazione delle varianti più diffuse questo tipo di analisi potrebbe essere sufficiente [13].

Lawton et al. [14] proposero invece un'eluizione a gradiente in fase inversa C<sub>18</sub> che impiega acqua e acetonitrile entrambe acidificate con TFA 0.05%. L'ordine di eluizione prevede la [D-Asp<sup>3</sup>] microcistina RR, microcistina RR, nodularina, microcistina YR, LR, FR, LA, LY, LW e LF.

Vi sono anche alcuni studi che hanno proposto separazioni cromatografiche di microcistine utilizzando cromatografia a scambio anionico con tampone fosfato, acetato d'ammonio o cloruro di sodio. Tuttavia nonostante venissero rivendicati i vantaggi "green" dell'analisi nessun cromatogramma è mai stato pubblicato [15].

L'elettroforesi capillare non è una delle tecniche più usate per l'analisi delle microcistine in quanto è necessario preconcentrare il campione per ovviare alla mancanza di sensibilità della tecnica che comunemente viene accoppiata al detector UV; la determinazione risulta veloce e molto semplice [16]. Bateman et al. [17] hanno sviluppato una separazione per elettroforesi capillare accoppiata a un sistema di rivelazione in spettrometria di massa: il limite di quantificazione per la microcistina LR (200 nM) risultava di un ordine di grandezza maggiore rispetto l'accoppiamento LC-MS (50 nM).

Il diene coniugato presente nel gruppo Adda, caratteristico delle microcistine e delle nodularine, è il principale gruppo cromoforo di queste tossine e porta a un massimo di assorbimento a 238 nm sebbene vengano usate anche le lunghezze d'onda 214 nm [18] e 206 nm [19]. Vi sono poi delle microcistine contenenti il triptofano che assorbono anche a 222 nm [14]. Il limite di rilevabilità in HPLC-UV è di alcuni nanogrammi [13,14]. Uno dei più importanti limiti di questa tecnica deriva dalla presenza di interferenti che possono assorbire alle stesse lunghezze d'onda degli analiti di interesse. In tal casi i rivelatori *photodiode array* (DAD) che forniscono l'intero spettro di assorbimento delle molecole in esame, consentono di sostenere con maggiore sicurezza la presenza di microcistine.

Le fasi mobili maggiormente impiegate con questo tipo di rivelatore sono acqua e acetonitrile acidificate con TFA, acido con ottima trasparenza all'ultravioletto, mentre l'acido formico che di solito viene utilizzato per i rivelatori in massa, porta a un elevato

assorbimento alle lunghezze d'onda d'interesse aumentando il rumore di fondo con conseguente diminuzione del rapporto segnale rumore.

Sebbene l'HPLC-UV possa effettivamente identificare le microcistine, la sensibilità della tecnica non è paragonabile ai saggi ELISA.

Il limite di rilevabilità di molti composti organici potrebbe essere abbassato utilizzando una rivelazione a fluorescenza. I gruppi funzionali carbossilici contenuti nell'acido metilaspatico e nell'acido glutammico sono i principali siti target della reazione di derivatizzazione. I principali agenti derivatizzanti sono 4-bromometil-7-metossicumarina (Br-Mmc) e 4-bromometil-7-acetossicumarina (Br-Mac) [20-22].

La sola tecnica che permette l'identificazione inequivocabile delle microcistine e delle nodularine è la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa. Vi sono diversi tipi di spettrometria di massa che differiscono dall'analizzatore ma anche dalla sorgente di ionizzazione.

In generale, le microcistine possono formare sia ioni monocarica che ioni bicarica a seconda della basicità del componente amminoacidico variabile che ne caratterizza la struttura. Nel caso in cui venga condotta un'analisi in *full scan* viene quindi consigliato di fare una scansione in un doppio range, quello dei monocarica ( $m/z$  900-1200 Da) e quello dei bicarica ( $m/z$  450-600 Da).

L'analisi quantitativa risulta molto sensibile se effettuata in modalità *selected ion monitoring* (SIM) oppure, nel caso si abbia a disposizione un triplo quadrupolo o una trappola ionica, mediante modalità *multiple reaction monitoring* (MRM) [23].

La spettrometria di massa tandem può anche essere utilizzata per analisi qualitative in *precursor ion mode* allo scopo di identificare nuove varianti di microcistine o nodularine caratterizzate comunque da uno stesso ione prodotto proprio della classe di composti. In particolare questi analiti producono uno ione a  $m/z$  135 [24] se ionizzati positivamente, mentre uno ione a  $m/z$  128 in polarità negativa [25].

Altra tecnica recentemente sviluppata, anche se ancora scarsamente usata per questi analiti, è la spettrometria di massa MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight*). È una tecnica estremamente rapida, ad alta risoluzione, sensibile, richiede poco campione, tollerante alle contaminazioni e identifica i singoli congeneri ma è puramente qualitativa. Inoltre risente della presenza di addotti con sodio e potassio, che vanno a compromettere la sensibilità del metodo e a complicare l'interpretazione dello spettro in un'analisi *untarget* [26,27].

Recentemente la cromatografia liquida accoppiata a delle tecniche di rivelazione in spettrometria di massa che permettano di determinare accurati  $m/z$  è stata applicata anche all'analisi delle microcistine [28-30]. Diehnelt et al. [28] hanno condotto uno studio sui *pattern* di frammentazioni e sulla struttura delle microcistine utilizzando uno spettrometro di massa ibrido trappola lineare/ciclotrone ionico a trasformata di Fourier (LT-FT-ICR). Sono quindi state definite le masse accurate degli ioni precursori e degli ioni prodotto di alcune tra le microcistine commercialmente disponibili.

Un interessante confronto tra la spettrometria di massa tandem, il MALDI-TOF e Q-TOF-MS/MS è stato riportato da Ferranti et al. [31]. La tecnica ibrida di ultima generazione permette di abbassare i limiti di rilevabilità rispetto a metodi fino a quel momento riportati in letteratura dimostrando oltre a una grande sensibilità anche una buona riproducibilità nelle misure. Inoltre essa permette di ottenere una caratterizzazione strutturale di microcistine conosciute e di quelle ancora non identificate.

Nonostante queste tecniche di nuova generazione presentino numerosi vantaggi, la tecnica che risulta la più usata in quanto presenta grande sensibilità, selettività, robustezza e applicabilità rimane la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem utilizzando una sorgente ESI in modalità positiva.

Lo scopo di questo lavoro è stato lo sviluppo di un metodo per la determinazione di microcistine e nodularina mediante HPLC-ESI-MS/MS con aspetti innovativi e che permetta di essere competitivo con quelli presenti in letteratura. In particolare è stato sviluppato un metodo quantitativo in modalità di acquisizione MRM che utilizza una ionizzazione negativa e un metodo in *Precursor ion scan* in negativo per un'analisi qualitativa.

## ***2.2 Sviluppo del metodo d'analisi delle microcistine e nodularina in modalità di acquisizione Multiple Reaction Monitoring (MRM)***

L'analisi strumentale è stata effettuata utilizzando un cromatografo liquido Agilent 1100 series HPLC system (Agilent, Walddbronn, Germany) dotato di una pompa binaria, degasser, autocampionatore e vano colonna termostato. La determinazione degli analiti è avvenuta utilizzando uno spettrometro di massa con analizzatore a triplo quadrupolo API 4000 (Applied Biosystem, MSD SCIEX, Toronto, Ontario, Canada) dotato di sorgente Turbo V utilizzata in Turbo Ion Spray (TIS).

### ***2.2.1 Materiali***

Gli standard solidi di microcistine LR, LA, RR, YR, LY, LF, LW e nodularina (purezza  $\geq 95\%$ ) sono stati acquistati da Vinci Biochem (Vinci, Italia) mentre lo standard di leucina encefalina (purezza  $\geq 95\%$ ) è stata fornita da Sigma Aldrich (S. Louis, MO, USA). L'acqua ultrapura è stata prodotta da un sistema presente all'Università di Venezia fornito da Purelab Ultra system: impianto di purificazione Purelab Option R pure water system accoppiato a Purelab Ultra Analytic ultra pure water system (Elga Lab Water, High Wycombe, UK). Il metanolo e l'acetonitrile sono di grado UPS (Ultra Purity solvent per HPLC/MS), forniti dalla Romil Ltd (Cambridge, UK). Le colonne cromatografiche Synergi Hydro RP (4.6x50mm, 4  $\mu\text{m}$ ) e Synergi Fusion (2x100 mm, 4  $\mu\text{m}$ ) sono state prodotte da Phenomenex (Torrance, California, USA) mentre la colonna Zorbax Extend C18 (4,6 x 150 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ) viene commercializzata da Agilent (Walddbronn, Germania).

### ***2.2.2 Sviluppo del metodo MRM***

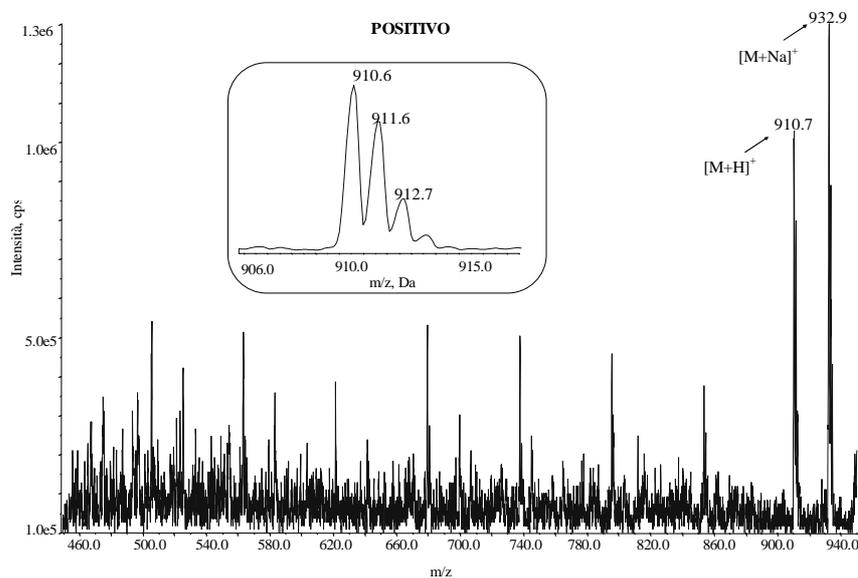
È stato sviluppato un metodo d'analisi in modalità di acquisizione MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), valutando la miglior sorgente di ionizzazione per l'analita di interesse. Sia la sorgente ESI (*Electrospray Ionization*) che la sorgente APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) sono state usate ma solo la prima ha portato a una significativa ionizzazione degli analiti di interesse.

La creazione del metodo MRM è stata eseguita per infusione diretta delle soluzioni standard ad una concentrazione di 1 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  mediante una pompa siringa Model "11" (Harvard Apparatus Inc., Holliston, MA, USA) ad un flusso di 10  $\mu\text{L min}^{-1}$ .

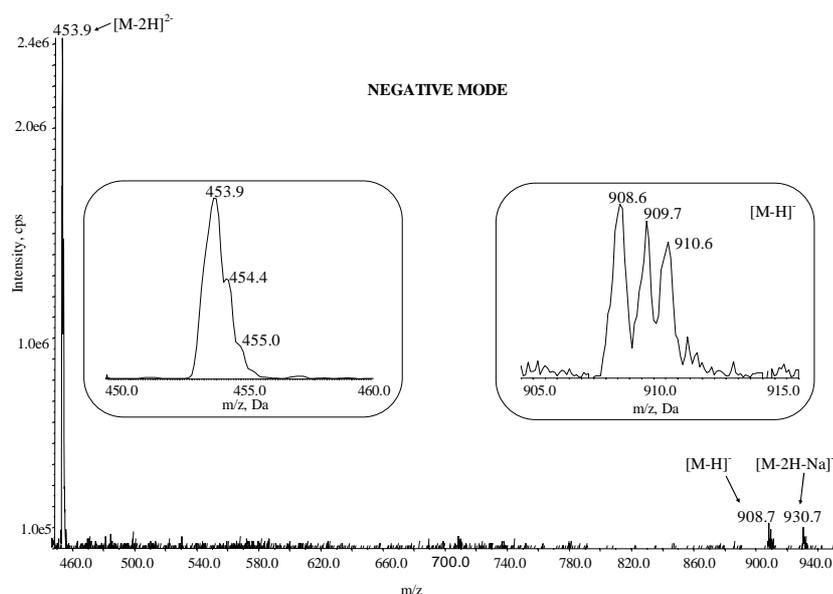
I quadrupoli Q1 e Q3 sono fissati con risoluzione unitari a  $0.7 \pm 0.1$  unità di ampiezza del picco a metà altezza.

L'identificazione degli ioni precursori è stata ottenuta mediante analisi al primo quadrupolo in modalità *full scan*, ottimizzando i parametri di DP (*Declustering Potential*) e EP (*Entrance Potential*) al fine di ottenere la massima intensità del segnale. L'acquisizione degli spettri è stata fatta ionizzando gli analiti sia positivamente che negativamente.

Questo studio ha messo in evidenza come la ionizzazione negativa porti a delle intensità di segnale maggiori o molto simili a quella positiva, comunemente usata in letteratura [23,24,32]. Si riportano in figura 2.1 e 2.2 gli spettri in *full scan* di una soluzione di microcistina LA ( $250 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ ) ionizzata con entrambe le polarità. Come si può notare dalle figura 2.1 e 2.2 lo ione  $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$  porta a un'intensità di segnale di  $2.4 \cdot 10^6$  mentre la ionizzazione positiva non porta alla formazione dello ione bicarica e l'intensità del segnale dello ione  $[\text{M}+\text{H}]^+$  risulta dimezzata. L'assenza dello ione positivo bicarica è legato alla mancanza del residuo argininico che ne determina la formazione [33].



**Figura 2.1.** Spettro in Q1 *full scan* positivo di una soluzione standard di microcistina LA ( $250 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ ) con i cluster isotopici degli ioni principali.



**Figura 2.2.** Spettro in Q1 *full scan* negativo di una soluzione standard di microcistina LA ( $250 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ ) con i cluster isotopici degli ioni principali.

Le infusioni dirette sono state condotte utilizzando soluzioni standard in metanolo per l'analisi in negativo mentre per quella in positivo sono state usate delle soluzioni in metanolo con uno 0.1% di acido formico, al fine di favorire la ionizzazione positiva.

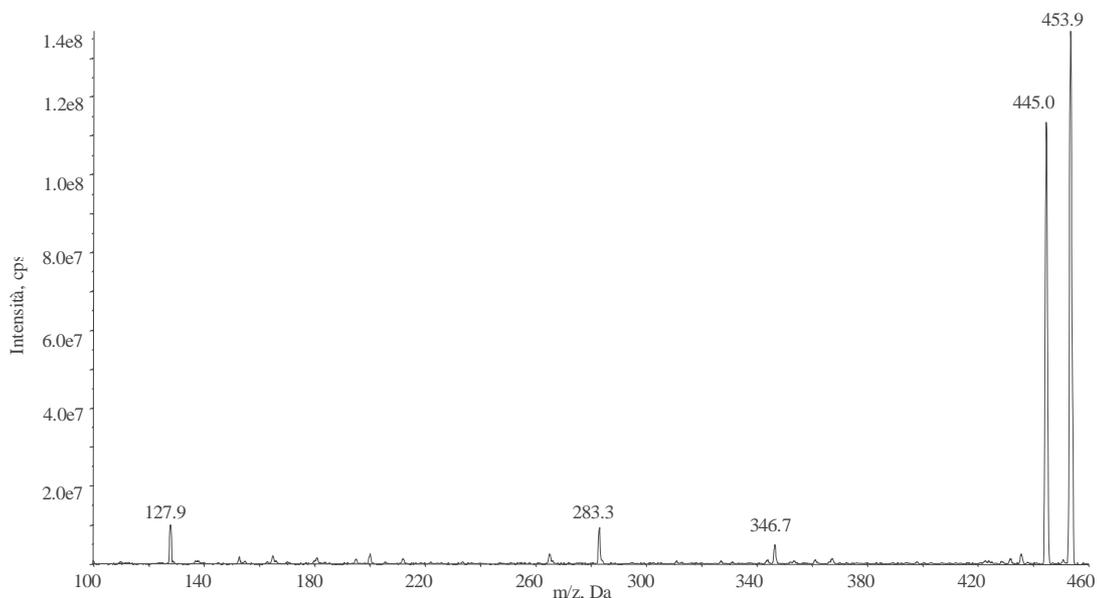
Dalla figura 2.1 è possibile notare come la ionizzazione positiva genera uno spettro dove sono presenti un maggior numero di specie interferenti rispetto a quella negativa (figura 2.2) a causa della formazione di numerosi addotti con il sodio, litio, ammonio, o altre specie. L'abbondanza relativa dello ione  $[M+Na]^{+}$ , formato a seguito della presenza di impurezze di sodio contenute nel sistema o nelle fasi mobili, potrebbe portare a una diminuzione dell'intensità del segnale ed ad un peggioramento nella precisione del metodo analitico [34].

Lo sviluppo di un metodo ESI(-)-MS/MS in modalità MRM è un aspetto innovativo nella determinazione delle microcistine in quanto risulta avere una sensibilità maggiore rispetto ai metodi riportati in letteratura [24,35-40].

Gli spettri *full scan* negativi delle varie microcistine e della nodularina mostrano la predominante presenza dello ione  $[M-2H]^{2-}$  rispetto allo ione monocarica.

Gli ioni precursori selezionati nel primo quadrupolo sono stati usati per condurre un'analisi in modalità *product ion scan* al fine di individuare gli ioni prodotto, che poi verranno utilizzati nel metodo MRM.

Si riporta in figura 2.3, a titolo esemplificativo, lo spettro *product ion scan* di una soluzione standard di microcistina LA ( $250 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ ) ottenuto applicando un'energia di collisione di  $-50\text{V}$ . Per ciascuna microcistina considerata sono stati registrati i medesimi spettri.



**Figura 2.3.** Spettro *product ion scan* negativo di una soluzione standard di microcistina LA ( $250 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ )

Gli studi condotti utilizzando ESI(+) [23,39,41,42] sottolineano come le microcistine siano una classe di composti caratterizzati da uno ione prodotto caratteristico a  $m/z$  135, frammento derivato dal residuo Adda e identificato come  $[\text{phenyl-CH}_2\text{-CH(OCH}_3)]^+$  generato dalla frammentazione sia dello ione  $[\text{M}+\text{H}]^+$  sia del  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  [41].

Sebbene l'ESI-MS/MS sia la migliore tecnica per l'analisi quantitativa delle microcistine, con il quale sono stati ottenuti i limiti di rilevabilità più bassi, la caratterizzazione strutturale in base alla sola frammentazione di questi composti non è possibile [25]. Dörr et al. [25] hanno investigato come si dissociano le microcistine (LR, LA, YR) usando una ionizzazione ESI negativa mediante uno spettrometro di massa ibrido LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific, Bremen, Germany). Gli ioni  $[\text{M}-\text{H}]^-$  e  $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$  producono frammentandosi uno ione caratteristico a  $m/z$  128 quando viene applicata un'energia di collisione nella cella HCD, molto simile a quella presente nello spettrometro di massa a triplo quadrupolo. Questo frammento, caratteristico dei vari congeneri delle microcistine e delle nodularine, è stato identificato come un prodotto della reazione di trasferimento di carica all'unità acida ciclica, presente in tutte le varianti testate nello studio.

Per ciascun ione precursore sono stati scelti gli ioni prodotti più intensi e su questi sono stati ottimizzati l'energia di collisione (CE) e il *cell exit potential* (CXP).

Si riportano in tabella 2.1 le transizioni monitorate nel primo e nel terzo quadrupolo che costituiscono il metodo MRM, con i parametri ottimizzati per ciascuna analita. Per ciascun analita vengono considerate due transizioni, la più intensa delle quali (indicata in grassetto) viene utilizzata per la quantificazione mentre la seconda viene utilizzata per confermare l'identità degli analiti.

**Tabella 2.1.** Transizioni monitorate in Q1 e Q3 e i parametri dei composti ottimizzati per gli analiti

	MW	ione precursore	Q1 <i>m/z</i>	Q3 <i>m/z</i>	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
NOD	824.4	[NOD-2H] <sup>2-</sup>	411.4	<b>402.5</b>	-67.0	-18.4	-12.0
				127.9	-67.0	-33.5	-11.0
MC LA	909.5	[LA-2H] <sup>2-</sup>	453.9	<b>445.0</b>	-58.0	-20.2	-12.0
				127.9	-58.0	-29.0	-11.0
ENK	555.3	[ENK-H] <sup>-</sup>	554.5	<b>236.1</b>	-100.0	-42.0	-6.2
				129.8	-100.0	-54.0	-11.0
MC YR	1044.5	[YR-2H] <sup>2-</sup>	521.5	<b>512.6</b>	-70.0	-24.0	-15.0
				127.8	-70.0	-40.0	-6.6
MC LY	1001.5	[LY-2H] <sup>2-</sup>	499.9	<b>273.0</b>	-62.0	-25.2	-6.0
				127.9	-62.0	-42.0	-12.0
MC LW	1024.5	[LW-2H] <sup>2-</sup>	511.6	296.2	-66.8	-26.0	-8.5
				<b>127.9</b>	-66.8	-39.0	-10.0
MC LF	985.5	[LF-2H] <sup>2-</sup>	491.8	<b>482.8</b>	-62.0	-21.0	-6.5
				128.0	-62.0	-35.0	-7.0
MC LR	994.5	[LR-2H] <sup>2-</sup>	496.3	487.5	-57.0	-23.3	-8.0
				<b>127.8</b>	-57.0	-37.0	-11.0
MC RR	1037.6	[RR-2H] <sup>2-</sup>	518.0	<b>509.1</b>	-64.0	-23.9	-6.0
				128.0	-64.0	-38.8	-11.0

Nella tabella 2.1 vengono riportate anche le transizioni e i relativi parametri ottimizzati della leucina encefalina (ENK), analita utilizzato come standard interno. Non essendo commercialmente disponibili standard marcati isotopicamente di microcistine, Cong et al. [37] hanno suggerito l'uso dell'ENK come standard interno per quantificare questi composti nelle acque dolci. La leucina encefalina è un peptide lineare la cui sequenza è Tyr-Gly-Gly-Phe Leu, non è presente in matrici ambientali in quanto è un neurotrasmettitore di origine peptidica (oppiode endogeno) trovato nel cervello di molti animali e nell'uomo. Il più intenso ione prodotto trovato per tale analita è a *m/z* 129.8, che corrisponde al residuo leucinico. Questo analita inoltre presenta delle caratteristiche cromatografiche e un comportamento in spettrometria di massa simile alle microcistine, risultando quindi un buon standard interno dal punto di vista strumentale. La possibilità di impiego dell'ENK come standard interno nelle varie matrici è legata alla procedura preparativa dovrà essere valutata caso per caso.

### 2.2.3 Sviluppo del metodo cromatografico

Il processo di ionizzazione positiva in una sorgente *Electrospray Ionization* viene in genere favorito aggiungendo alle fasi mobili un additivo acido, come acido formico, acido acetico o tamponi acidi [34]. In una separazione cromatografica, questi additivi agiscono da agenti a coppia ionica al fine di minimizzare le interazioni dei gruppi basici e dei gruppi silanolici con la superficie silicea [11].

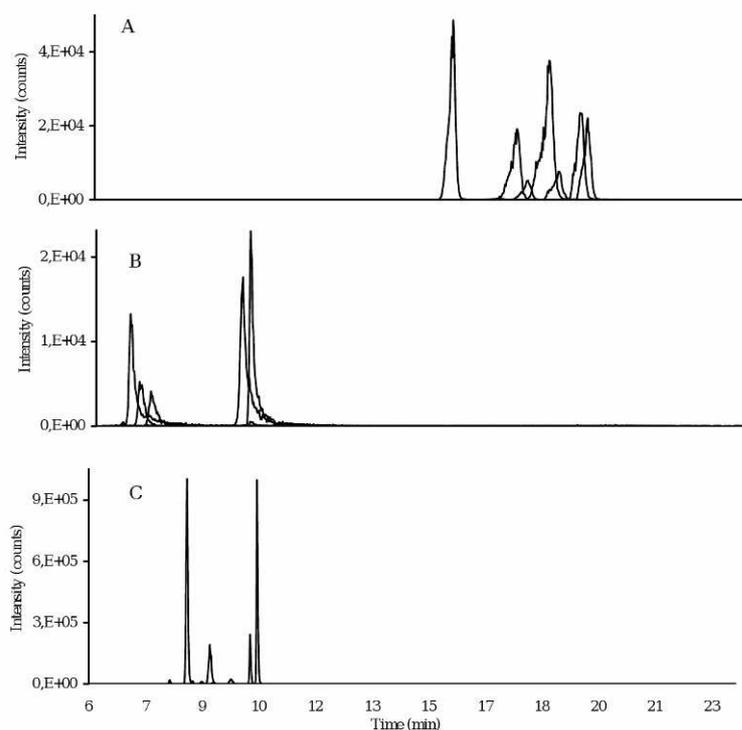
Il metodo (-)MRM qui proposto dimostra alta sensibilità come dimostrato nel §2.2.6 ma richiede l'uso di fasi mobili prive di additivi acidi, che causerebbero un decremento della ionizzazione. Le fasi mobili usate per la messa punto della separazione cromatografica avevano pH neutro o basico.

Sono state testate numerose fasi stazionarie (tabella 2.2) ma solo tre colonne hanno dimostrato una buona ritenzione cromatografica degli analiti di interesse: Phenomenex Synergi Fusion, Phenomenex Synergi Hydro e Zorbax Extend C<sub>18</sub>.

**Tabella 2.2.** Specifiche delle colonne C<sub>18</sub> a fase inversa testate in questo studio.

colonna	Dimensione particelle µm	Dimensioni pori A	Area superficiale m <sup>2</sup> /g	Carico di carbonio %	Endcapped	lunghezza mm	I.D. mm	pH range
Phenomenex Fusion RP	4	80	475	12	yes	100	2.0	1.5-10
Phenomenex Hydro RP	4	80	475	19	yes	50	4.6	1.5-7.5
Phenomenex Gemini C18	3	110	375	14	yes	100	2.0	1.0-12.0
Phenomex Gemini C6-Phenyl	3	110	375	12	yes	100	2.0	1.0-12.0
Phenomenex Luna NH2	3	100	400	9.5	no	100	2.0	1.5-11.0
Phenomenex Luna HILIC	3	200	200	5.7	no	150	2.0	1.5-8.0
Zorbax SB-C18	3.5	80	180	7	no	150	2.1	1.0-8.0
Zorbax Extend -C18	3.5	80	180	12.5	double	150	4.6	2.0-11.5
Waters XBridge Shield RP18	3.5	135	185	18	yes	100	2.1	1.0-12.0
Waters Sunfire C18	3.5	100	340	16	yes	150	2.1	2.0-7.0

Le migliori condizioni sono state ottenute per ognuna delle tre colonne, dopo aver testato diverse composizioni di fasi mobili e diversi gradienti. I cromatogrammi delle migliori separazioni cromatografiche ottenute con queste tre colonne sono riportati in figura 2.4.



**Figura 2.4.** Cromatogrammi relative alle migliori separazioni cromatografiche ottenute con le tre colonne

Il primo cromatogramma (figura 2.4.A) è relativo alla separazione ottenuta con la colonna Synergi Fusion 100x2 i.d. mm. Le fasi mobili impiegate prevedevano una soluzione acquosa come fase A e una miscela metanolo/acetonitrile (80:20) come fase B. La separazione è stata condotta utilizzando un flusso di  $200 \mu\text{L min}^{-1}$  mediante il seguente gradiente lineare: 0-2 min, 0% B; 4 min, 75% B; 10 min, 50% B; 15-20 min, 100% B; 27-37 min, 0% B.

Nella figura 2.4.B viene invece riportata la separazione condotta utilizzando la colonna Phenomenex Synergi Hydro 50x4.6 i.d. mm. Sono state usate acqua (fase A) e metanolo (fase B) come fasi mobili. La corsa cromatografica prevedeva un flusso di  $500 \mu\text{L min}^{-1}$  e il seguente gradiente lineare: 0-2 min, 40% B; 3-6 min, 55% B; 7-9 min, 75% B; 11-16 min, 100% B; 18-25 min, 0% B.

Infine la miglior separazione cromatografica, usata poi nell'applicazione alle matrici reali, è stata ottenuta utilizzando la colonna Zorbax Extend C18 (Rapid Resolution, 4.6x150 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies) (figura 2.4.C). L'eluizione prevedeva un gradiente lineare le cui fasi mobili erano una soluzione acquosa 19 mM di idrossido d'ammonio (fase A) e una miscela di metanolo/acetonitrile (80:20). La corsa cromatografica è stata condotta con un flusso di  $500 \mu\text{L min}^{-1}$  e il seguente gradiente

lineare: 0-1 min, 0% fase B; 1-3 min, 45% B; 7 min, 90% B; 9-15 min, 100% B; 17-27 min, 0% B. Il volume di iniezione è di 80  $\mu$ L.

È stato sperimentalmente dimostrato che i processi di allargamento di banda dei composti testati sono inibiti quando il gradiente iniziava con una composizione della fase mobile al 100% in fase acquosa. In queste condizioni i composti apolari analizzati mostravano una maggiore affinità per la fase stazionaria apolare rispetto la fase mobile polare. Le colonne Synergi sono delle fasi stazionarie prodotte da Phenomenex progettate per lavorare anche in assenza di solvente organico e si prestano al tipo di eluizione proposto. La colonna Zorbax Extend invece non prevederebbe la possibilità di lavorare in assenza di solvente organico, tuttavia questo diviene possibile in presenza di ammonio idrossido 19 mM nella fase A.

Il solvente che portava alla migliore ionizzazione in ESI è stato il metanolo [34] ma l'aggiunta di acetonitrile nella fase B è stata necessaria per incrementare la simmetria dei picchi dei composti analizzati.

Al fine di stabilire la miglior separazione cromatografica, è stato calcolato il fattore di selettività e quello di risoluzione. La selettività definisce la separazione tra due composti e viene calcolata come il rapporto tra i due fattori di capacità, ottenuti dalla differenza tra il tempo di ritenzione dell'analita e quello necessario affinché un'analita non ritenuto venga eluito dalla colonna. Un altro parametro che permette di valutare le separazioni cromatografiche è la risoluzione [43].

La selettività e la risoluzione sono stati calcolati per quattro coppie di microcistine, confrontando le colonne che hanno dimostrato una ritenzione accettabile (tabella 2.3).

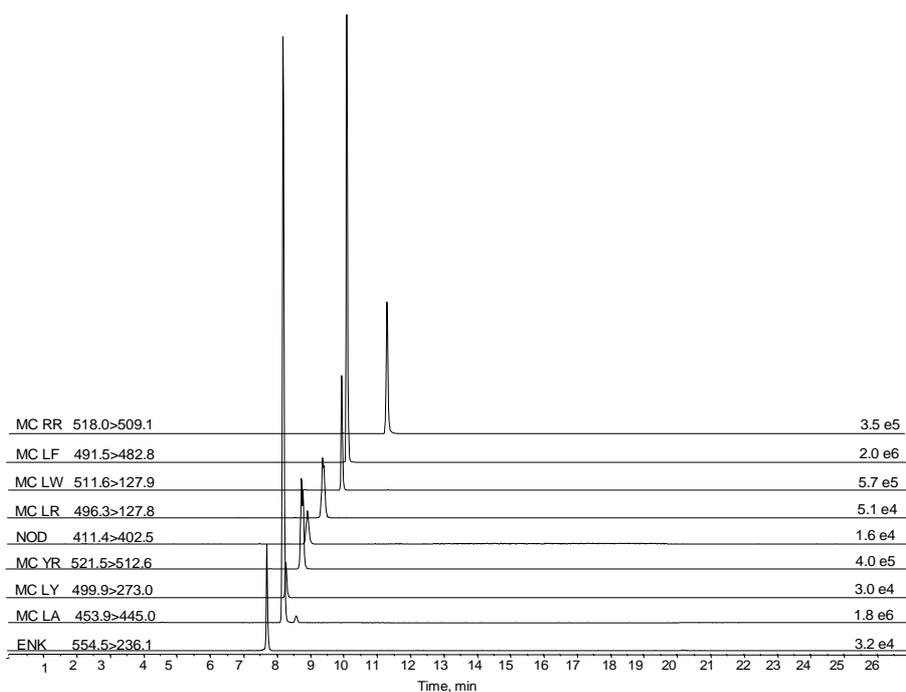
**Tabella 2.3.** Dati relativi alle performance cromatografiche dei metodi ottimizzati.

	Selectivity		
	Synergi Fusion	Synergi Hydro	Zorbax Extend
YR/LA	0,95	0,96	1,08
LR/LY	0,95	1,01	1,13
LR/LA	0,97	1,04	1,15
LR/YR	1,02	1,08	1,07
	Resolution		
	Synergi Fusion	Synergi Hydro	Zorbax Extend
YR/LA	0,55	0,17	1,37
LR/LY	0,68	0,05	1,84
LR/LA	0,41	0,19	2,40
LR/YR	3,09	3,70	2,94

Come si può notare dalla tabella 2.3, la selettività tra le tre colonne è molto simile per ciascuna coppia di microcistine in quanto questo parametro viene considerato solo per valutare l'effettiva ritenzione degli analiti senza considerare la forma del picco.

La risoluzione invece, in cui viene considerata anche la larghezza del picco, si dimostra un parametro discriminante fra le tre colonne. In generale, una risoluzione di 1.0 è sufficiente per un'analisi qualitativa mentre è necessario un valore di 1.5 per la quantificazione [44]. Dalla tabella 2.3 appare evidente come le due colonne Synergi non permettono analisi qualitative né tanto meno quantitative, mentre con la colonna Zorbax Extend si ottengono valori utili per un'analisi quantitativa.

Inoltre sperimentalmente è stato verificato che le colonne Synergi, utilizzate con fasi mobili neutre, subiscono degradazione con perdita nella riproducibilità delle analisi già dopo qualche settimana. Al contrario nella colonna Zorbax Extend non sono stati rivelati fenomeni degradativi a seguito dell'applicazione di questo tipo di analisi o all'impiego di soluzioni ad alto grado di alcalinità. Nonostante siano state condotte un migliaio di analisi, la colonna permette di ottenere la stessa separazione cromatografica inizialmente ottimizzata riportata in figura 2.5, dimostrando la robustezza del metodo cromatografico proposto. Come suggerito dal produttore, l'uso di una soluzione 19 mM di idrossido d'ammonio (pH 11) come eluente nella fase A inibisce le interazioni del composto basico non carico con la silice rimasta scoperta dalla funzionalizzazione e ne evita la degradazione.



**Figura 2.5.** Cromatogramma relativo alle transizioni più intense per ogni analita considerato

#### 2.2.4 Ottimizzazione della sorgente di ionizzazione

Lo sviluppo di un metodo quantitativo per l'analisi di composti in tracce necessita anche l'ottimizzazione dei parametri relativi alla sorgente di ionizzazione. La sorgente di ionizzazione impiegata in questo studio risulta la Turbo V utilizzata in Turbo Ion Spray (TIS) in modalità di ionizzazione negativa.

Una volta definita la composizione della fase mobile alla quale eluiscono gli analiti oggetto dell'ottimizzazione e il flusso di eluizione viene condotta in queste condizioni un'analisi in *flow injection analysis* (FIA) dove il sistema HPLC viene accoppiato allo spettrometro di massa senza la colonna cromatografica. Iniezioni ripetute di una miscela degli analiti a una concentrazione di  $10 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$  vengono effettuate al fine di valutare il potenziale applicato all'ago della sorgente (IS), la pressione del gas di nebulizzazione (GS1) e di desolvatazione (GS2), la temperatura (T) e i gas posti in controcorrente in uscita dallo skimmer con lo scopo di favorire la declusterizzazione (CUR). Anche la pressione del gas di collisione (CAD) è un parametro che viene verificato in questa fase. L'ottimizzazione del segnale viene in genere realizzata utilizzando un volume di iniezione relativamente piccolo ( $10 \mu\text{L}$ ) e indipendente dal volume poi applicato al metodo in quanto si cercano di ridurre l'allargamento di banda dovuto all'iniezione senza colonna.

I valori dei vari parametri ottimizzati nel metodo sono riportati in tabella 2.4.

**Tabella 2.4.** Parametri ottimizzati relativi alla sorgente di ionizzazione.

Metodo di acquisizione	MRM
Polarità:	negativa
Ion source:	turbo spray
Temperatura:	620°C
Gas 1:	25 psi
Gas 2:	60 psi
CUR:	25 psi
CAD:	6 psi
IS:	-4450 eV
EP:	-5 V

### 2.2.5 Linearità della risposta strumentale

In questo studio è stato utilizzato il metodo dello standard interno. La mancanza di standard di microcistine marcate isotopicamente ha reso necessario l'individuazione di una sostanza che presentasse delle caratteristiche chimico fisiche e cromatografiche simile e paragonabile comportamento in spettrometria di massa agli analiti di interesse. Lo standard interno usato nel presente lavoro è la leucina encefalina (ENK) che nonostante sia un peptide lineare (le microcistine sono cicliche) ha dimostrato buone performance come standard interno. I risultati sono stati poi corretti mediante un fattore di risposta strumentale valutato analizzando una soluzione contenente una miscela di microcistine e di standard interno ad una concentrazione nota in acqua ultrapura.

La linearità della risposta strumentale è stata verificata mediante la costruzione di una curva che individua la relazione tra il rapporto della concentrazione delle microcistine e nodularina e della ENK contro il rapporto fra le aree dei picchi cromatografici delle microcistine e quello della ENK.

La curva è stata ottenuta dall'iniezione di una serie di soluzioni standard preparate in acqua ultrapura di microcistine a concentrazione nota (0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5, 10, 20, 50, 75, 100  $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$ ) e di ENK a una concentrazione costante di 1  $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$ .

**Tabella 2.5.** Parametri relativi alla curva di calibrazione e precisione strumentale degli analiti investigati

	m	q	R <sup>2</sup>	CV% 0.05 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$	CV% 1 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$	CV% 10 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$	CV% 100 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$
NOD	0.1513	0.1421	0.9959	2	4	3	4
MC LA	0.6511	1.2516	0.9859	8	3	2	3
MC LY	0.1750	0.1889	0.9929	4	13	6	2
MC YR	0.4217	0.1014	0.9993	10	2	3	2
MC LW	0.2381	0.1526	0.9969	6	5	5	4
MC LF	0.8373	1.0850	0.9941	4	10	9	2
MC LR	0.3420	0.3328	0.9975	9	6	2	3
MC RR	0.5410	0.0488	0.9938	8	7	4	4

La tabella 2.5 riporta le equazioni della retta della risposta strumentale per ciascuna microcistina e nodularina con i valori di pendenza (m) ed intercetta (q). Si riporta inoltre il valore del coefficiente di regressione lineare (R<sup>2</sup>) che è stato dimostrato essere superiore a 0.99 per tutte le tossine nel range di concentrazione 0.01-100  $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$ . La

curva e il valore di  $R^2$  riportati in tabella 2.5 per la microcistina RR invece sono relativi al range 0.01-20  $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$ .

La precisione strumentale è stata valutata a quattro livelli di concentrazione (0.05, 1, 10, 100  $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$ ) iniettando per tre volte le soluzioni, ottenendo un coefficiente di variazione percentuale (CV%) inferiore al 10%.

### 2.2.6 Limiti di rilevabilità e quantificazione strumentale

I limiti di rilevabilità (LOD) e quantificazione (LOQ) strumentale sono stati valutati usando il metodo di Bliesner [45] in cui viene definito il LOD come la concentrazione di una soluzione standard il cui rapporto segnale/rumore è uguale a 3 mentre per il LOQ il valore deve essere uguale a 10. I valori di LOD e LOQ per ciascuna microcistina e la nodularina sono riportati in tabella 2.6 in  $\text{pg}$  assoluti considerando un volume di iniezione di 80  $\mu\text{L}$ .

**Tabella 2.6.** Limiti di rilevabilità (LOD) e quantificazione (LOQ) strumentali per ogni tossina analizzata

	LOD (pg)	LOQ (pg)
NOD	0.4	1.7
MC LA	0.4	1.4
MC LY	0.2	0.8
MC YR	0.7	3.8
MC LW	0.1	0.5
MC LF	0.1	0.2
MC LR	0.4	3.1
MC RR	0.2	0.7

Sono stati ottenuti dei valori di LOD compresi tra 1'1  $\text{fg } \mu\text{L}^{-1}$  (MC LW, MC LF) e i 9  $\text{fg } \mu\text{L}^{-1}$  (MC YR). In letteratura generalmente si riportano dei limiti di rilevabilità strumentali che variano tra i  $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$  e i  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  [24,35-39].

I limiti di rilevabilità ottenuti con questo metodo sono molto simili ai migliori LOD riportati in letteratura da Mekebri et al. [40] usando ESI (+)-MS/MS. Questo è un'ulteriore conferma che il metodo da noi proposto usando ESI(-)-MS/MS risulta un'ottima alternativa ai metodi presenti in letteratura.

### ***2.3 Sviluppo del metodo d'analisi delle microcistine e nodularina in modalità di acquisizione Precursor Ion Scan***

Per la quantificazione delle tossine, i metodi in spettrometria di massa messi a punto sono basati su una modalità di acquisizione MRM, in quanto permette alta selettività e sensibilità.

I limiti di rilevabilità di tali metodi, come descritto nei capitoli precedenti, variano tra 0.1 pg e 1.5 ng assoluti; tuttavia con questo metodo possono essere rivelati esclusivamente le varianti specificatamente inserite nel metodo. Qualsiasi altra molecola in cui sia presente un cambiamento strutturale, quale sostituzioni di gruppi funzionali o altri amminoacidi presenti nella sequenza, non può essere monitorata. Considerato che in commercio non sono disponibili più di una decina di varianti di microcistine, il metodo MRM può descrivere solo parzialmente la tossicità del campione analizzato, in quanto parte dell'informazione viene persa. L'analisi invece in *precursor ion mode* permette di rivelare anche altri congeneri delle microcistine e delle nodularine tutti caratterizzati dal medesimo ione prodotto.

L'analisi in *precursor ion mode* prevede che il primo quadrupolo lavori in modalità *full scan* mentre il terzo opera in modalità *single ion monitoring*.

A nostra conoscenza, questo è il primo studio in cui viene ottimizzato un metodo in *precursor ion scan* per l'analisi delle microcistine usando una polarità di ionizzazione negativa. Questo metodo permette quindi di identificare eventuali microcistine o nodularine non ancora commercialmente disponibili ma presenti nei campioni reali, andando a dare una corretta valutazione del grado di tossicità del campione che con il metodo MRM verrebbe sottostimata.

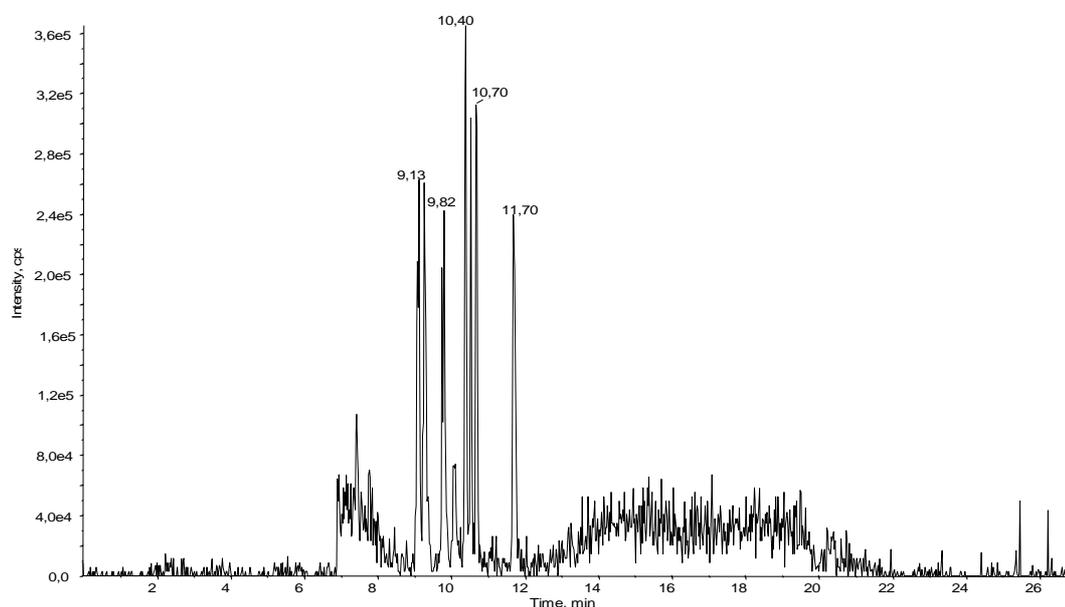
#### ***2.3.1 Sviluppo del metodo Precursor Ion scan***

Nell'ottimizzazione del metodo MRM in modalità negativa, è stato dimostrato che le transizioni con lo ione bicarica come precursore erano caratterizzate dal segnale più intenso, anche se l'ottimizzazione del metodo utilizzando gli ioni  $[M-H]^-$  è stata comunque realizzata, al fine di definire i migliori valori di DP, EP e quando era presente un'intensità sufficiente è stato valutato anche l'energia di collisione ottimale.

Come dimostrato da Dorr et al. [25], lo ione prodotto a  $m/z$  128 è generato sia dagli ioni precursori  $[M-H]^-$  che da  $[M-2H]^{2-}$ , relativo al prodotto della reazione di trasferimento di carica dell'unità acida ciclica.

Il primo quadrupolo è stato impostato per selezionare due range di  $m/z$ : 800-1150 per  $[M-H]^-$  e 400-575 per  $[M-2H]^{2-}$ . Non essendo commercialmente disponibili tutti i congeneri non è possibile sapere quali ioni precursori siano i più intensi pertanto è fondamentale considerare sia ioni monocarica che bicarica. Per entrambi le selezioni nel primo quadrupolo è stato impostato un valore di DP di -60 V mentre un'energia di collisione di -35 V e un valore di CXP di -10 V sono stati scelti, mediando tra i valori ottimizzati per il metodo MRM riportati in tabella 2.1. Le stesse condizioni cromatografiche riportate nel § 2.2.2 sono state utilizzate per l'applicazione di questo metodo di acquisizione e gli stessi parametri relativi alla sorgente riportati nel § 2.2.3 sono stati impostati.

In figura 2.6 viene riportato il cromatogramma relativo al segnale dello ione prodotto a  $m/z$  128 di una soluzione standard delle microcistine analizzate per l'ottimizzazione del metodo MRM a una concentrazione di  $10 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$  (tabella 2.1).

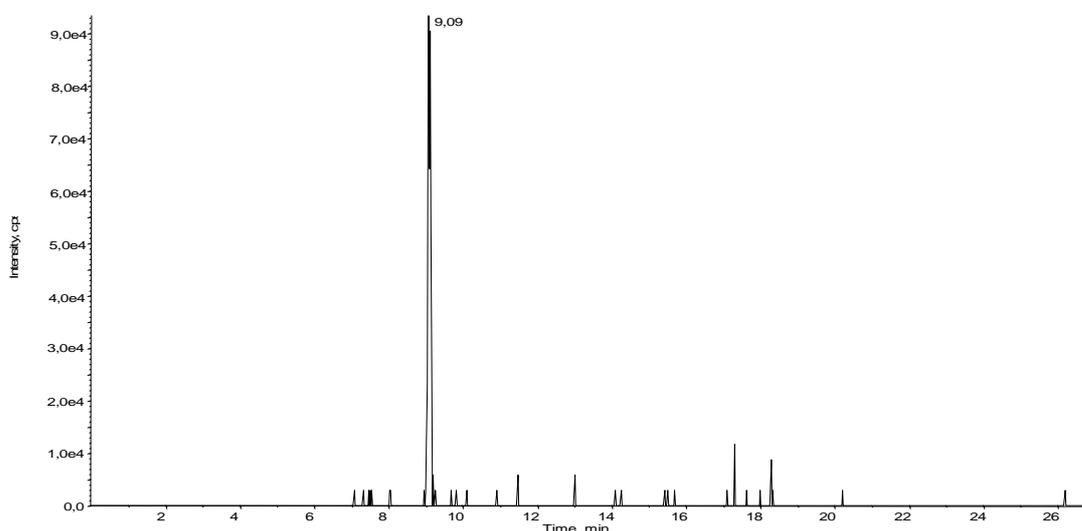


**Figura 2.6.** Cromatogramma acquisito in modalità Precursor Ion Scan di una miscela delle sette microcistine e nodularina oggetto del presente studio ad una concentrazione di  $10 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$

Il cromatogramma ottenuto (figura 2.6) è relativo al segnale dello ione frammento a  $m/z$  128. È possibile quindi estrarre il segnale relativo a tale frammento derivante da un singolo ione precursore.

In figura 2.7, ad esempio, viene riportato il cromatogramma relativo al segnale dello ione a  $m/z$  128 generato dagli ioni precursori compresi nel range  $453.5 \pm 0.4 m/z$ , che corrisponde allo ione precursore della microcistina LA  $[M-2H]^{2-}$ . L'ampiezza dell'intervallo di selezione dello ione precursore è stato scelto valutando l'accuratezza di massa strumentale.

Come si può notare dalla figura 2.7 il rumore risulta notevolmente ridotto dalla selezione nel range di  $m/z$ .



**Figura 2.7.** Cromatogramma *Precursor Ion Scan* relativo al segnale dello ione prodotto a  $128 m/z$  ottenuto selezionando nel Q1 il frammento  $453.5 \pm 0.4 m/z$  ad una concentrazione di  $10 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$

L'identificazione delle microcistine e nodularine non commercialmente disponibili avviene invece per confronto del tempo di ritenzione e valutando lo spettro di massa relativo agli ioni precursori che hanno generato lo ione prodotto del segnale analizzato.

L'iniezione della soluzione standard ha permesso di verificare l'utilizzo del metodo sviluppato per la determinazione qualitativa di tossine non rivelabili con il metodo MRM. Tale metodo quindi risulta estremamente utile per analisi di tipo qualitativo mentre l'utilizzo a fini quantitativi è oggetto di valutazione nel presente studio.

### 2.3.2 Valutazione delle performance del metodo a fini quantitativi

Questo metodo non permette l'impiego di uno standard interno per la quantificazione degli analiti in quanto si basa sull'analisi di un singolo ione prodotto che viene generato unicamente da questa famiglia di tossine.

La quantificazione delle tossine commercialmente disponibili è possibile mediante curva di calibrazione esterna mentre per le tossine incognite la quantificazione potrebbe essere condotta facendo riferimento alla curva di una specifica microcistina, ad esempio la microcistina LR. Simile approccio viene usato nei metodi ELISA come descritto nel §2.1. Questo metodo è proposto come uno strumento di screening qualitativo utile per una valutazione semiquantitativa delle tossine ancora non commercialmente disponibili, permettendo però di stimare singolarmente i congeneri che altrimenti non verrebbero rivelati col metodo MRM oppure verrebbero quantificati come cianotossine totali e riferiti alla tossicità della microcistina LR se venisse usato il metodo ELISA.

Sono state valutate le curve di calibrazione delle tossine oggetto di questo studio in un intervallo di concentrazione compreso tra 0.5 e 10 pg  $\mu\text{L}^{-1}$  e le pendenze (m), le intercette (q) e i coefficienti di regressione ( $R^2$ ) vengono riportati in tabella 2.7.

**Tabella 2.7.** Parametri relativi alla curva di calibrazione e precisione strumentale degli analiti investigati ottenuti applicando il metodo di acquisizione *Precursor Ion Scan*

	m	q	$R^2$	CV% 1 pg $\mu\text{L}^{-1}$	CV% 5 pg $\mu\text{L}^{-1}$	CV% 10 pg $\mu\text{L}^{-1}$
NOD	34309	+ 5756	0.9436	7	38	7
MC LA	102788	+ 34944	0.9497	22	12	9
MC LY	99800	- 24194	0.9694	38	22	11
MC YR	77506	+ 12219	0.9121	33	17	23
MC LW	77302	+ 4433	0.7982	52	13	47
MC LF	65843	+ 3804	0.9701	9	20	6
MC LR	81036	+ 19837	0.8710	90	58	12
MC RR	94051	+ 40639	0.9747	5	7	3

Come si può notare dalla tabella 2.7, le curve hanno valori di coefficienti di regressione inferiori a 0.99 e questo è principalmente dovuto alla scarsa precisione strumentale, determinata iniettando per tre volte soluzioni a tre concentrazioni diverse (1, 5, 10 pg  $\mu\text{L}^{-1}$ ).

I limiti di rilevabilità (LOD) e quantificazione (LOQ) strumentali, valutati come le concentrazioni alle quali il rapporto segnale rumore è rispettivamente 3 e 10, vengono riportati in tabella 2.8.

**Tabella 2.8.** Limiti di rilevabilità (LOD) e quantificazione (LOQ) strumentali per ciascuna tossina analizzata con la modalità di acquisizione Precursor Ion Scan. Volume di iniezione 100  $\mu\text{L}$

	LOD (pg)	LOQ (pg)
NOD	66	222
MC LA	120	400
MC LY	77	256
MC YR	26	87
MC LW	71	238
MC LF	52	172
MC LR	62	208
MC RR	46	153

Come si può notare dalla tabella 2.8 i valori di LOD e LOQ risultano molto maggiori rispetto a quelli riportati in tabella 2.6 di un ordine di grandezza dimostrando quindi come questo metodo non abbia elevata sensibilità se confrontato con il metodo MRM.

La precisione strumentale alla concentrazione di 1  $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$  risulta molto scarsa a causa della vicinanza al limite di rivelabilità anche se scarsa precisione si verifica anche a 10  $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$ .

Il metodo in modalità di acquisizione *Precursor Ion Scan* risulta essere efficace a scopi qualitativi mentre la quantificazione è preferibile con la modalità MRM.

## 2.4 Conclusioni

È stato messo a punto un metodo per la determinazione di sette microcistine e la nodularina usando un HPLC accoppiato a uno spettrometro di massa mediante una sorgente di ionizzazione negativa ESI. È stata sviluppata una separazione cromatografica che utilizza una colonna Zorbax Extend, la cui fase stazionaria ha permesso l'utilizzo di condizioni alcaline (pH 11) ottenendo così ottime performance cromatografiche.

Lo spettrometro di massa è stato ottimizzato per la messa a punto di un metodo quantitativo per la determinazione in tracce delle tossine utilizzando ionizzazione in polarità negativa e acquisizione MRM. Questo aspetto risulta innovativo in quanto in letteratura non era ancora stato dimostrato come la ionizzazione negativa portasse a maggiore sensibilità. I limiti di rilevabilità ottenuti con questo metodo risultano, infatti,

migliori di quelli riportati in letteratura, rendendolo un'ottima alternativa ai metodi già presenti.

Al fine di integrare il dato quantitativo con una valutazione qualitativa dei campioni e quindi individuare microcistine o nodularine presenti nel campione delle quali non è disponibile in commercio lo standard è stato ottimizzato un metodo in *Precursor Ion Scan*. Tale metodo, pur non dimostrando buone performance quantitative, ha dimostrato essere efficace nella rivelazione delle microcistine. L'analisi qualitativa, verificata con gli standard commercialmente disponibili, viene eseguita confrontando il tempo di ritenzione e valutando lo spettro di massa relativo agli ioni precursori selezionati nel primo quadrupolo.

## 2.5 Riferimenti bibliografici

- [1] T. Heresztyn, B.C. Nicholson, *Water Research* 35 (2001) 3049.
- [2] W.W. Carmichael, J. An, *Natural Toxins* 7 (1999) 377.
- [3] W.J. Fischer, I. Garthwaite, C.O. Miles, K.M. Ross, J.B. Aggen, A.R. Chamberlin, N.R. Towers, D.R. Dietrich, *Environmental Science & Technology* 35 (2001) 4849.
- [4] B.P. Burns, M.L. Saker, M.C. Moffitt, B.A. Neilan, *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 268 (2004).
- [5] I. Chorus, J. Bartram, in WHO (Editor), Spon Press, London, 1999.
- [6] P.R. Hawkins, S. Novic, P. Cox, B.A. Neilan, B.P. Burns, G. Shaw, W. Wickramasinghe, Y. Peerapornpisal, W. Ruangyuttikarn, T. Itayama, T. Saitou, M. Mizuochi, Y. Inamori, *Journal of Water Supply Research and Technology-Aqua* 54 (2005) 509.
- [7] K. Kaya, T. Sano, *Analytica Chimica Acta* 386 (1999) 107.
- [8] M. Namikoshi, F.R. Sun, B.W. Choi, K.L. Rinehart, W.W. Carmichael, W.R. Evans, V.R. Beasley, *Journal of Organic Chemistry* 60 (1995) 3671.
- [9] C. Edwards, L.A. Lawton, S.M. Coyle, P. Ross, *Journal of Chromatography A* 734 (1996) 163.
- [10] R.R. Stotts, M. Namikoshi, W.M. Haschek, K.L. Rinehart, W.W. Carmichael, A.M. Dahlem, V.R. Beasley, *Toxicon* 31 (1993) 783.
- [11] J. Meriluoto, *Analytica Chimica Acta* 352 (1997) 277.
- [12] L. Spoof, K. Karlsson, J. Meriluoto, *Journal of Chromatography A* 909 (2001) 225.
- [13] K.I. Harada, K. Matsuura, M. Suzuki, H. Oka, M.F. Watanabe, S. Oishi, A.M. Dahlem, V.R. Beasley, W.W. Carmichael, *Journal of Chromatography* 448 (1988) 275.
- [14] L.A. Lawton, C. Edwards, G.A. Codd, *Analyst* 119 (1994) 1525.
- [15] M.M. Watanabe, K. Kaya, N. Takamura, *Journal of Phycology* 28 (1992) 761.
- [16] S. Perez, D.S. Aga, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 24 (2005).
- [17] K.P. Bateman, P. Thibault, D.J. Douglas, R.L. White, *Journal of Chromatography A* 712 (1995) 253.
- [18] M.P. Boland, M.A. Smillie, D.Z.X. Chen, C.F.B. Holmes, *Toxicon* 31 (1993) 1393.
- [19] M. Craig, T.L. McCready, H.A. Luu, M.A. Smillie, P. Dubord, C.F.B. Holmes, *Toxicon* 31 (1993) 1541.
- [20] H. Tsuchiya, T. Hayashi, H. Naruse, N. Takagi, *Journal of Chromatography A* 234 (1982) 121.
- [21] T. Sano, K. Nohara, F. Shiraishi, K. Kaya, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 49 (1992) 163.
- [22] H. Murata, H. Shoji, M. Oshikata, K.I. Harada, M. Suzuki, F. Kondo, H. Goto, *Journal of Chromatography A* 693 (1995) 263.
- [23] L. Spoof, P. Vesterkvist, T. Lindholm, J. Meriluoto, *Journal of Chromatography A* 1020 (2003) 105.
- [24] S. Hiller, B. Krock, A. Cembella, B. Luckas, *Journal of Mass Spectrometry* 42 (2007) 1238.
- [25] F.A. Doerr, D. Oliveira-Silva, N.P. Lopes, J. Iglesias, D.A. Volmer, E. Pinto, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 25 (2011) 1981.
- [26] K.L. Howard, G.L. Boyer, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21 (2007) 699.
- [27] M. Welker, J. Fastner, M. Erhard, H. von Dohren, *Environmental Toxicology* 17 (2002) 367.
- [28] C.W. Diehnelt, S.M. Peterman, W.L. Budde, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 24 (2005) 622.
- [29] C.W. Diehnelt, N.R. Dugan, S.M. Peterman, W.L. Budde, *Analytical Chemistry* 78 (2006) 501.

- [30] M.-R. Neffling, L. Spoof, M. Quilliam, J. Meriluoto, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 878 (2010) 2433.
- [31] P. Ferranti, S. Fabbrocino, A. Nasi, S. Caira, M. Bruno, L. Serpe, P. Gallo, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23 (2009) 1328.
- [32] M. Maizels, W.L. Budde, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 1342.
- [33] J. Wang, X.L. Pang, F. Ge, Z.Y. Ma, *Toxicon* 49 (2007) 1120.
- [34] R. Kostianen, T.J. Kauppila, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 685.
- [35] O. Allis, J. Dauphard, B. Hamilton, A.N. Shuilleabhain, M. Lehane, K.J. James, A. Furey, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 3436.
- [36] L.F. Zhang, X.F. Ping, Z.G. Yang, *Talanta* 62 (2004) 193.
- [37] L.M. Cong, B.F. Huang, Q. Chen, B.Y. Lu, J. Zhang, Y.P. Ren, *Analytica Chimica Acta* 569 (2006) 157.
- [38] M. Dai, P. Xie, J. Chen, G.D. Liang, Y. Liu, T. Qiu, *Chromatographia* 68 (2008) 811.
- [39] J. Pietsch, S. Fichtner, L. Imhof, W. Schmidt, H.J. Brauch, *Chromatographia* 54 (2001) 339.
- [40] A. Mekebri, G.J. Blondina, D.B. Crane, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 3147.
- [41] M. Yuan, M. Namikoshi, A. Otsuki, K.L. Rinehart, K. Sivonen, M.F. Watanabe, *Journal of Mass Spectrometry* 34 (1999) 33.
- [42] C. Hummert, J. Dahlmann, K. Reinhardt, H.P.H. Dang, D.K. Dang, B. Luckas, *Chromatographia* 54 (2001) 569.
- [43] V.L. McGuffin (V.L. McGuffin), V.L. McGuffins), *Chromatography*, 6th edition, Erich Heflmann, 2004.
- [44] B. Ardrey, *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry. An Introduction*, Chichester, 2003.
- [45] D.M. Bliesner, *Validating chromatographic methods A Practical Guide*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2006.



## CAPITOLO 3

### Le cianotossine nell'aerosol atmosferico

#### 3.1 Introduzione

L'esposizione alle tossine cianobatteriche avviene principalmente per contatto diretto o indiretto con l'acqua contaminata. Recentemente, Backer et al. [1-3] hanno condotto alcuni studi dimostrando come queste tossine possono essere aerosolizzate e quindi essere una potenziale fonte di contatto per gli esseri viventi.

Le biotossine possono essere inalate ed entrare nel tratto respiratorio e nell'apparato digerente dopo essersi depositate nelle principali vie aeree [4]. Nel Regno Unito, sono stati riscontrati numerosi casi di malattie respiratorie in canoisti frequentatori di bacini idrici interessati da fioriture algali di *Microcystis* [5]. In letteratura si riportano diversi studi epidemiologici sull'esposizione umana a microcistine a seguito di attività ricreative svolte in prossimità dei bacini contaminati [6-8].

Nel caso in cui vi siano dei bassi livelli di cianobatteri i sintomi manifestati si sono limitati a infiammazioni dell'alto tratto respiratorio, arrossamenti cutanei o irritazione agli occhi [6] mentre l'aumento dell'estensione della fiorita comporta anche un incremento nell'intensità dei sintomi [8]. Chorus and Batram [9] suggeriscono di permettere attività ricreative in bacini contaminati da Cianoficee solo se la concentrazione di microcistine è al di sotto di  $400 \mu\text{g L}^{-1}$  e comunque l'esposizione, se vi è attestata la presenza, dovrebbe essere ridotta al minimo.

Studi tossicologici sui topi sono stati condotti al fine di definire i valori di Lc50, parametro che esprime la tossicità di una sostanza inalata, e quelli di LD50, ovvero la concentrazione letale per il 50% della popolazione. I valori di Lc50 possono essere approssimativamente convertiti ai valori più comunemente noti di LD50, usando il volume e la velocità respiratoria e il peso del soggetto.

La tossicità della microcistina LR inalata risulta essere paragonabile a quella degli organofosfati con valore Lc50 di  $180 \text{ mg min m}^{-3}$  e valore LD50 di  $43 \mu\text{g kg}^{-1}$  nei topi [10].

Nonostante l'aerosol sia una potenziale sorgente di esposizione e i sintomi respiratori causati dai bloom di cianoficee siano in aumento, la determinazione della concentrazione di microcistine e nodularina non è ancora normata e non è ancora considerata fondamentale al fine di valutare l'effettivo rischio per la salute umana.

In letteratura solo pochi studi riportano la determinazione di questi composti tossici nell'aerosol.

McGovern et al. [11] e Mittal et al. [12] hanno riscontrato la presenza nell'aerosol di cellule algali in concentrazione superiore a quella dei pollini.

Le cellule algali, i batteri e le tossine disciolte nell'acqua possono essere aerosolizzate da processi di "bubble-bursting" per azione del vento o delle onde. Le goccioline formate riescono a vincere la tensione superficiale dell'acqua ed, entrando nell'atmosfera, portano alla formazione di un aerosol ricco in sali, materiale organico, batteri e alghe [13].

Cheng et al. [1] hanno condotto delle simulazioni sulla formazione di aerosol contenente le microcistine, dimostrando come vi sia una stretta correlazione tra la concentrazione di microcistine nell'aerosol e le fioriture algali. Backer et al. [2,3], invece, hanno valutato gli effetti dell'aumento della concentrazione di microcistine sulla salute umana, determinandone la concentrazione in campionatori di aria personali, in tamponi nasali e nel plasma di persone venute a contatto con le fioriture algali. La concentrazione nel plasma umano era al di sotto del limite di rilevabilità ma la presenza di queste tossine nei tamponi nasali dimostra come l'atmosfera sia un efficace mezzo di contatto di queste tossine con l'uomo e quindi una potenziale minaccia.

Risulta quindi necessario in presenza di una fioritura algale monitorare la concentrazione di tali tossine nell'atmosfera circostante al fine di prevenire il rischio per la salute umana.

Uno degli scopi di questo lavoro consiste nella messa a punto di un metodo per la determinazione di microcistine e nodularina a livello di tracce mediante HPLC-MS/MS. Il metodo strumentale in modalità di acquisizione MRM ottenuto in questo lavoro e descritto nel §2.2 è stato quindi utilizzato per ottimizzare una procedura preanalitica per la determinazione delle cianotossine nei campioni di aerosol atmosferico.

La procedura validata è stata quindi applicata a dei campioni reali provenienti dalla laguna di Venezia, identificando la presenza di questi composti nell'ambiente veneziano. A nostra conoscenza questo è il primo studio che individua le microcistine nella laguna di Venezia.

### **3.2 Parte sperimentale**

#### *3.2.1 Campionamento*

I campioni analizzati in questo lavoro sono stati raccolti presso l'isola di Sacca San Biagio (Lat. 45° 25' 40.14" N Long. 12°18'36.73"E) posta in prossimità del nucleo urbano di Venezia in un periodo compreso tra giugno e ottobre 2007. Quest'area è caratterizzata da un andamento stagionale con alte temperature in estate (luglio-agosto 20-25 °C) e basse temperature d'inverno (dicembre-gennaio 0-5 °C), come registrato annualmente dalla stazione EZI-n°23 situata nella zona industriale dall'Ente della Zona Industriale di Marghera (EZI).

Il campionamento di aerosol è stato realizzato mediante campionatore ad alto volume TE 5000 (Tisch Environmental Inc., OH, USA) per la determinazione dei microinquinanti organici, dotato di un cilindro di schiuma in poliuretano per la raccolta della frazione "gassosa" e di un filtro in fibra di quarzo (QFF) (SKC Inc., Eighty Four, To-13 model) della porosità di 1 µm per la raccolta della frazione "particellata" dell'aerosol. I campioni di aerosol oggetto di questo studio sono i QFF preventivamente riscaldati in muffola a 400°C per 4 ore.

I campioni raccolti sono stati conservati in un doppio strato di alluminio ad una temperatura di -20 °C. Sono stati raccolti anche dei bianchi di campo, ovvero dei filtri che hanno subito tutte le fasi del campionamento senza accedere la pompa aspirante del campionatore, al fine di valutare possibili contaminazioni o interferenze legate al sistema di campionamento.

#### *3.2.2 Materiali*

Gli standard delle microcistine, della nodularina e dell'ENK e i solventi sono gli stessi riportati in § 2.2.1.

Sono stati inoltre utilizzati dei tubi da ultracentrifuga Safe-Lock da 2 mL (Eppendorf AG, Amburgo, Germania), dei filtri siringa in PTFE (ø 4 mm, 0.2 µm) (Phenomenex, Torrance, California, USA) e delle siringhe da 6 mL in polietilene. Il bagno ad ultrasuoni è stato acquistato da Ultrasonic, FALC (Treviglio, Italia). La concentrazione degli estratti è stata realizzata sotto flusso di azoto, grado ricerche (SIAD, Bergamo, Italia) ed è stato testato anche il concentratore Turbovap® II (Caliper Lifescience, Symark, Patterson, California, USA). L'agitazione dei campioni è stata realizzata

mediante agitatore Vortex (Velp Scientifica®). La colonna Zorbax Extend C18 (4,6 x 150 mm, 3,5 µm) è prodotta da Agilent Technologies (Waldbronn, Germania).

### *3.2.3 Preparazione del campione*

Una parte del filtro in fibra di quarzo (1/8) è stato spezzettato mediante pinze in acciaio e raccolto in un provetta da ultracentrifuga da 2 mL. Questo supporto è stato precedentemente lavato con acqua ultra pura e metanolo in bagno ad ultrasuoni.

Lo standard interno ENK ad una concentrazione assoluta di 100 pg è stato aggiunto ai filtri asciutti, i quali sono stati successivamente estratti con 1 mL di metanolo in bagno ad ultrasuoni per 30 minuti. L'estratto è stato filtrato utilizzando filtri in PTFE con porosità 0.2 µm al fine di rimuovere tutto il particolato e i pezzi di filtro rimasti in sospensione prima dell'analisi strumentale.

La soluzione filtrata è stata concentrata a secco sotto flusso di azoto (flusso massimo 5 psi) e poi ripresa con 100 µL di acqua ultrapura.

Il campione così ottenuto è stato mandato all'analisi HPLC-MS/MS utilizzando il metodo MRM precedentemente ottimizzato e descritto nel § 2.2.

## **3.3 Risultati e discussione**

### *3.3.1 Validazione del metodo*

In letteratura pochi sono gli studi in cui vengono riportate procedure estrattive per l'analisi delle microcistine in campioni di aerosol atmosferico [1-3]. Backer et al. [1-3] utilizzando come metodo di analisi i kit ELISA o i saggi PCR hanno messo a punto un metodo preparativo che si basa sull'estrazione dei filtri in esteri misti di cellulosa campionati in tampone fosfato. Ai nostri scopi questo solvente estraente potrebbe comportare problemi di ionizzazione nella sorgente ESI in quanto il tampone fosfato presenta una scarsa volatilità.

Considerate le caratteristiche chimico fisiche delle microcistine e della nodularina, il metanolo è stato scelto come solvente estraente. Il volume di 1 mL è stato ottimizzato al fine di minimizzare la diluizione ma contemporaneamente permettere alte rese di estrazione.

A causa della mancanza di un materiale certificato per le cianotossine nell'aerosol o nelle polveri, l'esattezza, la precisione e la resa del processo sono stati stimati

utilizzando dei filtri QFF non campionati sui quali sono state aggiunte quantità note di tossine e di standard interno. Tutte le prove sono state ripetute 5 volte al fine di valutarne la deviazione standard e quindi la precisione del dato.

I risultati ottenuti sono stati poi corretti mediante il fattore di risposta strumentale valutato analizzando una soluzione contenente sia le cianotossine che lo standard interno entrambi ad una concentrazione nota in acqua ultrapura.

Per la valutazione dei bianchi procedurali e dell'esattezza espressa come errore medio percentuale, lo standard interno ENK (100 pg ass) è stata aggiunto all'inizio della procedura di estrazione come descritto nel § 3.2.3. L'errore medio percentuale è stato stimato come la differenza tra una concentrazione di cianotossina inizialmente aggiunta ai filtri (100 pg ass) e il valore quantificato con il metodo dello standard interno.

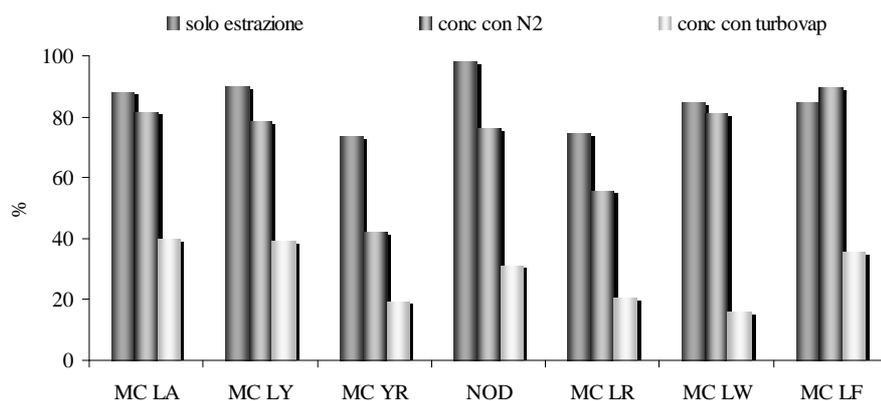
L'errore medio percentuale calcolato per ciascuna cianotossina variava tra i -10% (MC LR) e il 16% (NOD), dimostrando come la quantificazione con questo standard interno sia accurata.

La valutazione delle rese medie percentuali è stata possibile aggiungendo gli standard di cianotossine (100 pg ass) all'inizio della procedura, mentre lo standard interno ENK (100 pg ass) è stato aggiunto alla fine delle fasi pre-analitiche di cui si volevano valutare le performances.

Sono state confrontate le rese medie percentuali per ogni cianotossina della singola procedura di estrazione e dell'intera procedura preanalitica utilizzando una concentrazione mediante concentratore Rotavapor oppure una concentrazione mediante insufflazione diretta di azoto ultrapuro.

Come si può notare dalla figura 3.1, l'estrazione con metanolo porta a buone rese medie percentuali per tutte le cianotossine con valori che variano dal 74% (MC YR) al 98% (NOD).

La concentrazione risulta il passaggio critico della procedura preanalitica. L'utilizzo del concentratore Turpovap® a una temperatura di 30°C e un flusso di 5 psi comporta un'importante diminuzione delle rese percentuali (figura 3.1) dovute a una volatilizzazione degli analiti. L'insufflazione di azoto nella vial ad un flusso massimo di 5 psi invece porta a un leggero decremento delle rese che tuttavia rimangono comprese tra il 42% (MC YR) e l'89% (MC LF). La volatilizzazione, in questo caso, viene ridotta dalla diminuzione della temperatura della soluzione durante il processo di evaporazione.



**Figura 3.1.** Rese medie % delle singole cianotossine relative alle varie fasi della procedura preanalitica.

La precisione del metodo in termini di ripetibilità delle misure è stata calcolata dalla deviazione standard relativa ottenuta dall'analisi di cinque campioni ai quali sono stati aggiunti gli standard delle cianotossine (100 pg) e lo standard interno ENK (100 pg ass). La ripetibilità è risultata sempre inferiore al 9%, dimostrando le buone performance della procedura.

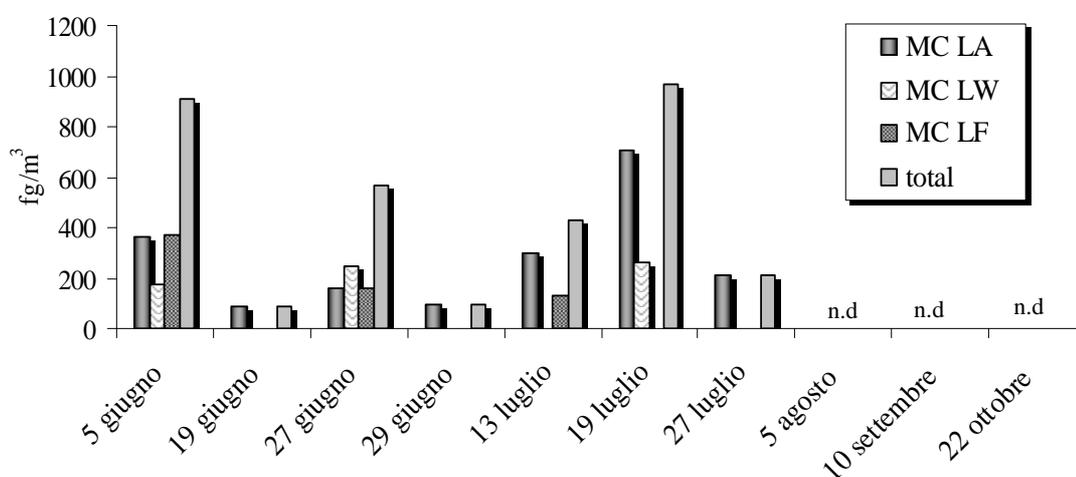
I limiti di rilevabilità della procedura analitica (MDL) sono stati valutati come tre volte la deviazione standard relativa all'analisi di cinque bianchi di campo.

I valori più bassi di MDL sono stati ottenuti per le microcistine LA (23 pg assoluti), LW (29 pg assoluti), LF (49 pg assoluti) e LY (55 pg assoluti) mentre valori più alti sono stati ottenuti per la microcistina YR (88 pg assoluti), la nodularina (140 ng assoluti) e la microcistina LR (164 pg assoluti). A nostra conoscenza, solo Cheng et al. [1] riporta un valore di MDL per la determinazione della microcistina LR nei campioni di aerosol atmosferico, che corrisponde 648 pg assoluti.

### 3.3.2 Applicazione del metodo

Il metodo ottimizzato e validato è stato applicato a dieci campioni di aerosol atmosferico raccolti nella laguna di Venezia in un periodo compreso tra giugno e ottobre 2007.

La concentrazione delle microcistine LY, YR, LR e della nodularina erano sotto i limiti di rilevabilità mentre le microcistine LA, LW e LF sono state trovate in alcuni campioni di giugno e luglio, come riportato nella figura 3.2.



**Figura 3.2.** Concentrazione di microcistine nei campioni di aerosol atmosferico nella laguna di Venezia

Le concentrazioni di microcistina LA erano comprese tra i 90 e i 706  $\text{fg m}^{-3}$ , i valori della LW tra i 177 e i 262  $\text{fg m}^{-3}$  mentre la microcistina era presente in concentrazioni comprese tra i 130 e i 269  $\text{fg m}^{-3}$ .

Il dato analitico è stato valutato criticamente al fine di dimostrare l'effettiva presenza delle microcistine nell'aerosol veneziano.

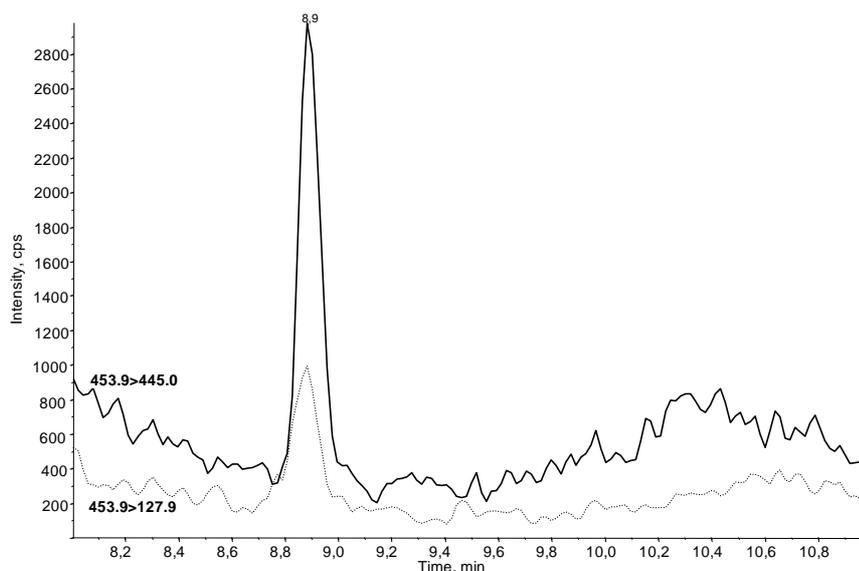
Sono stati considerati i rapporti tra le aree ottenute dalla transizione più intensa, usata per la quantificazione, e quelle della transizione meno intensa usata per confermare l'identità dell'analita (tabella 3.1). La differenza tra le abbondanze relative negli ioni frammento devono avere un grado di accordo del 20% rispetto all'abbondanza dello stesso ione nello standard di riferimento analizzato mediante le stesse condizioni sperimentali [14].

Questo principio è stato verificato in tutti i campioni dove la concentrazione delle microcistine era sopra il limite di rilevabilità.

**Tabella 3.1.** Calcolo dei rapporti tra le abbondanze relative alle transizioni usati per la quantificazione (I) e quelle usate per confermare l'identità dell'analita (II) per ogni campione sopra il limite di rilevabilità e relativo range di applicabilità ottenuto per confronto con i valori ottenuti da una soluzione standard a 50  $\mu\text{L}^{-1}$ .

	Microcistina LA			Microcistina LF			Microcistina LW		
	I	II	I/II	I	II	I/II	I	II	I/II
5 giugno	1.5E+04	5.2E+03	2.9	6.1E+03	1.4E+03	4.4	1.9E+03	1.2E+03	1.6
19 June	1.8E+04	4.4E+03	4.1						
27 June	1.2E+04	4.1E+03	3.1	5.1E+03	1.3E+03	3.8	1.8E+03	1.3E+03	1.5
29 June	1.4E+04	4.2E+03	3.2						
13 July	2.3E+04	7.8E+03	3.0	1.1E+04	2.6E+03	4.2			
19 July	1.1E+04	3.9E+03	2.7				1.2E+03	7.4E+02	1.6
27 July	1.2E+04	3.7E+03	3.3						
Soluzione standard 50 $\mu\text{L}^{-1}$	3.2E+06	9.2E+05	3.4	1.8E+06	3.9E+05	4.6	4.5E+05	3.0E+05	1.5
Range di accordo	2.7 - 4.1			3.7 - 5.5			1.2-1.8		

Si riporta in figura 3.3 a titolo esemplificativo il cromatogramma relativo alle due transizioni monitorate per la microcistina LA nel campione del 19 luglio, al fine di dimostrare come le due transizioni abbiano lo stesso tempo di ritenzione. La differenza tra i tempi di ritenzione dello ione usato per la quantificazione e di quello usato per confermare l'identità dell'analita è stata valutata per ciascun campione per ciascuna cianotossina individuata ed è sempre risultata inferiore al 2%, come previsto dalle linee guida [14].



**Figura 3.3.** Cromatogramma relativo alle transizioni usate per la determinazione della microcistina LA nel campione di aerosol atmosferico del 19 luglio.

L'identificazione dell'origine di queste microcistine presenti nell'aerosol della laguna di Venezia risulta piuttosto complicata in quanto le microcistine sono dei composti piuttosto stabili [15] e il materiale particolato su cui potrebbero essere adese potrebbe essere trasportato per chilometri senza che questi composti subiscano degradazione.

L'ipotesi secondo cui i bacini idrici contaminati da cianoficee siano un'importante fonte di cianotossine atmosferiche è stata avallata da Miller et al. [16].

Paoli et al. [17] hanno riportato la presenza di cianoficee nel mare Adriatico e nella laguna di Venezia ma ad oggi non vi sono studi che documentano la presenza di cianotossine nelle acque della laguna o del mare Adriatico.

In letteratura, l'analisi dei campioni di aerosol prelevati in zone prossime a fioriture di cianoficee ha rivelato concentrazioni comprese tra i  $\text{pg m}^{-3}$  e i  $\text{ng m}^{-3}$  [2,18].

Le concentrazioni di microcistine totali giornaliere determinate in questo studio oscillano tra i 91 e i 909  $\text{fg m}^{-3}$ , facendo quindi pensare che la fioritura non sia posta nelle vicinanze e che quindi vi sia un probabile trasporto *long range* delle microcistine nel particolato atmosferico. Tuttavia altri studi sono necessari per stabilire i processi di trasporto atmosferico di queste tossine nell'atmosfera veneziana.

### **3.4 Conclusioni**

È stato messo a punto un metodo sensibile per la determinazione di sei microcistine e la nodularina in tracce in campioni di aerosol atmosferico, usando il metodo strumentale precedentemente messo a punto nel § 2.2.

A causa della mancanza del materiale di riferimento certificato per l'analisi delle microcistine nel particolato atmosferico, la procedura è stata validata aggiungendo gli standard a dei filtri QFF non campionati. Il metodo preparativo ha dimostrato buona ripetibilità, buone rese e bassi errori percentuali per tutte le cianotossine considerate.

Il metodo è stato applicato a dieci campioni reali di aerosol atmosferico, raccolti nella laguna di Venezia. Sono stati individuate concentrazioni a livello di tracce delle microcistine LA, LF e LW mentre le altre cianotossine studiate sono risultate sotto il limite di rilevabilità. Questo è il primo studio preliminare che individua questi composti nell'ambiente veneziano.

Ulteriori ricerche dovrebbero essere condotte al fine di investigare l'origine e il destino di questi composti nell'atmosfera urbana.

### ***3.5 Riferimenti bibliografici***

- [1] Y.S. Cheng, Y. Zhou, C.M. Irvin, B. Kirkpatrick, L.C. Backer, *Marine Drugs* 5 (2007) 136.
- [2] L.C. Backer, W. Carmichael, B. Kirkpatrick, C. Williams, M. Irvin, Y. Zhou, T.B. Johnson, K. Nierenberg, V.R. Hill, S.M. Kieszak, Y.S. Cheng, *Marine Drugs* 6 (2008) 389.
- [3] L.C. Backer, S.V. McNeel, T. Barber, B. Kirkpatrick, C. Williams, M. Irvin, Y. Zhou, T.B. Johnson, K. Nierenberg, M. Aubel, R. LePrell, A. Chapman, A. Foss, S. Corum, V.R. Hill, S.M. Kieszak, Y.S. Cheng, *Toxicon* 55 (2010) 909.
- [4] G.A. Codd, S.G. Bell, K. Kaya, C.J. Ward, K.A. Beattie, J.S. Metcalf, *European Journal of Phycology* 34 (1999) 405.
- [5] P.C. Turner, A.J. Gammie, K. Hollinrake, G.A. Codd, *British Medical Journal* 300 (1990) 1440.
- [6] R. Philipp, A.J. Bates, *Journal of the Institution of Water and Environmental Management* 6 (1992) 613.
- [7] L.S. Pilotto, R.M. Douglas, M.D. Burch, S. Cameron, M. Beers, G.J. Rouch, P. Robinson, M. Kirk, C.T. Cowie, S. Hardiman, C. Moore, R.G. Attewell, *Australian and New Zealand Journal of Public Health* 21 (1997) 562.
- [8] I. Stewart, P.M. Webb, P.J. Schluter, L.E. Fleming, J.W. Burns, Jr., M. Gantar, L.C. Backer, G.R. Shaw, *Bmc Public Health* 6 (2006) 93.
- [9] I. Chorus, J. Bartram, in WHO (Editor), Spon Press, London, 1999.
- [10] R.M. Dawson, *Toxicon* 36 (1998).
- [11] J.P. McGovern, *Annals of allergy* 23 (1965).
- [12] A. Mittal, M.K. Agarwal, D.N. Shivpuri, *Annals of allergy* 42 (1979).
- [13] I.L. Blanchard, L.D. Syzdek, *Journal of Geophysic* 77 (1972) 5087.
- [14] L.Y.T. Li, D.A. Campbell, P.K. Bennett, J. Henion, *Analytical Chemistry* 68 (1996) 3397.
- [15] K. Tsuji, T. Watanuki, F. Kondo, M.F. Watanabe, S. Suzuki, H. Nakazawa, M. Suzuki, H. Uchida, K. Harada, *Toxicon* 33 (1995) 1619.
- [16] M.A. Miller, R.M. Kudela, A. Mekebri, D. Crane, S.C. Oates, M.T. Tinker, M. Staedler, W.A. Miller, S. Toy-Choutka, C. Dominik, D. Hardin, G. Langlois, M. Murray, K. Ward, D.A. Jessup, *Plos One* 5 (2010) e12576.
- [17] A. Paoli, M. Celussi, A. Valeri, C. Larato, A. Bussani, S.F. Umani, M.R. Vadrucci, C. Mazziotti, P. Del Negro, *Estuarine Coastal and Shelf Science* 75 (2007) 13.
- [18] S.A. Wood, D.R. Dietrich, *Journal of Environmental Monitoring* 13 (2011) 1617.

## CAPITOLO 4

### Le cianotossine nelle acque dolci

#### 4.1 Introduzione

Le microcistine e le nodularine sono un gruppo di potenti epatotossine prodotte da diverse cianofitiche acquatiche e la loro presenza è stata documentata nei corpi idrici di tutto il mondo [1].

Le cianotossine individuate più frequentemente sono le microcistine LR, RR e YR, dove la LR risulta la più abbondante con percentuali che variano tra il 23 e il 94 % della concentrazione totale [2]. Sebbene questa sia frequentemente al di sotto dei  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , Barco et al. [3] hanno individuato la LR a concentrazioni di  $270 \mu\text{g L}^{-1}$  sulle acque di fiume.

La contaminazione da cianotossine sembra essere strettamente legata al grado di eutrofizzazione dei corpi idrici e risulta anche influenzata dai cambiamenti climatici [4]. Oh et al. [5] hanno dimostrato che, se è presente una fioritura di *Microcystis*, è possibile valutare la variazione stagionale della concentrazione di microcistine mediante l'analisi combinata del fitoplancton, della concentrazione di clorofilla a e del rapporto azoto/fosforo.

Le cianotossine sono state individuate anche nell'acqua da bere, dimostrando quindi che i normali trattamenti delle acque non sono sufficienti per eliminarle. Questi processi, infatti, riescono a sequestrare efficacemente le cellule algali ma non riescono ad eliminare completamente le tossine, le quali molto spesso aumentano di concentrazione a causa della lisi cellulare [6].

La *World Health Organization* (WHO) nel 1998 ha pubblicato delle linee guida in cui è stato stabilito che la concentrazione di microcistina LR nell'acqua da bere non può essere superiore a  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Lo scopo di questo lavoro è lo sviluppo di una metodologia analitica che permetta la determinazione di sette microcistine (LA, LY, YR, RR, LR, LF, LW) e della nodularina in campioni di acqua dolce mediante HPLC-(-)ESI- MS/MS. Il metodo MRM, ottimizzato nel § 2.2, è stato utilizzato per la messa a punto di una procedura pre-analitica per l'analisi della frazione disciolta e di una per quella particellata dell'acqua dolce al fine di distinguere la concentrazione di ogni singola cianotossina all'interno della cellula algale da quella già emessa nel comparto acquoso. L'analisi

integrata delle due matrici permette di definire con maggior precisione il grado di tossicità degli analiti in quanto questi a seconda del comparto ambientale in cui sono presenti hanno un diverso grado di biodisponibilità.

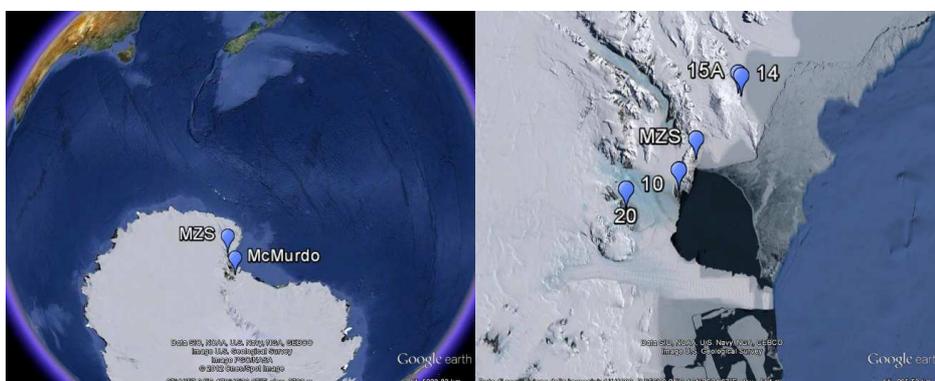
Il metodo MRM è stato inoltre applicato quantitativamente a otto campioni di acqua dolce campionata in quattro laghetti situati nel continente antartico al fine di rivelare la presenza delle otto cianotossine studiate. È noto infatti che la produzione di queste tossine è strettamente legata alla concentrazione di nutrienti e al grado di eutrofizzazione dell'area. Lo studio della presenza di queste sostanze in un territorio non contaminato dall'uomo potrebbe fornire indicazione sui parametri che influenzano la produzione di questi composti. È molto interessante capire come questi organismi si adattano in un ambiente estremo, verificando se questo può portare alla produzione di altri congeneri sconosciuti e non diffusi nelle zone temperate. A tale scopo è stata anche condotta un'analisi qualitativa in *Precursor Ion Scan*, come descritto nel § 2.3.

## 4.2 Parte sperimentale

### 4.2.1 Campionamento

La metodologia pre-analitica messa a punto in questo lavoro è stata applicata a otto campioni reali provenienti da quattro laghi del continente antartico. I campioni sono stati prelevati nell'ambito di un progetto relativo alla XXVII Spedizione in Antartide (2011/12) del Programma Nazionale Ricerche in Antartide.

I siti di campionamento, come si può notare dalla figura 4.1, sono localizzati nelle vicinanze della stazione scientifica Mario Zucchelli (MZS) (Lat. 74°42' S Long. 164°07' E).



**Figura 4.1.** Localizzazione dei siti di campionamento.

Il lago 14 (Lat: 74°19.741' S, Long: 165°08.031' E, altitudine 100 m) e il lago 15A (Lat: 74°18.775' S, Long: 165°04.189' E, altitudine: 0 m) si trovano nei pressi di Edmonson Point, località nota per ospitare una grande colonia di pinguini Adelle, ai piedi del vulcano in attività monte Melbourne. Nel terreno vulcanico e basaltico, sono presenti diversi laghetti formatisi dalla fusione della neve superficiale, alcuni dei quali rimangono scongelati anche nel periodo invernale, e come si può notare dalla figura 4.2 è chiaramente visibile la presenza di un *bloom* algale nel lago 14.



**Figura 4.2.** Lago 14 presso Edmonson Point

Il lago 20 è situato presso Tarn Flat (Lat: 74°58 S Long: 162°30' E, altitudine: -70 m), area completamente libera dai ghiacci e ricca di pozze e laghetti compresa tra i ghiacciai Larsen e Reeves. È una delle depressioni del continente antartico, formatasi per erosione glaciale e preservata dall'accumulo nevoso per azione del vento e del clima secco.

Infine il lago 10 è ubicato presso Inexpressible Island (Lat: 74°53' S Long: 163°43' E, altitudine: 30 m), isola situata in prossimità della Polynia (tratto di mare libero dai ghiacci tutto l'anno), come si può notare dalla figura 4.2.

I laghi sono stati campionati all'inizio dello scongelamento il 20 dicembre (lago 14 e 15A) e il 22 dicembre 2011 (laghi 20 e 10), mentre un secondo campionamento è stato nuovamente condotto il 7 gennaio 2012, con l'avanzamento della stagione estiva.

Il campionamento è stato eseguito per immersione di una bottiglia in vetro da 2.5 L, precedentemente lavata con acqua e metanolo e avvinata con la matrice da campionare. Durante il campionamento del 7 gennaio, è stato utilizzato un salinometro-conduttimetro YSI, che ha permesso di determinare la temperatura, la salinità e la

conduttività, mentre per la misura del pH è stato impiegato un pHmetro Orion da banco. È stata, inoltre, prelevata un'aliquota di campione per effettuare l'analisi dei nutrienti. 500 mL sono stati filtrati su filtri in esteri misti di cellulosa (Whatman) con porosità 0.2 µm e sia il filtrato che il filtro sono stati conservati a -20°C. Sul filtrato sono state rivelate le concentrazioni di azoto ammoniacale, nitriti e nitrati, di silicati e di ortofosfati mediante metodi spettrofotometri e colorimetrici standard oppure mediante cromatografia ionica.

Il campione da 2.5 L, una volta giunto presso la base Mario Zucchelli (MZS), è stata filtrato con filtri in fibra di vetro GF/F con porosità 0.7 µm. Il filtrato e il filtro sono stati conservati e trasportati a -20°C in Italia, dove sono stati processati per l'analisi delle microcistine e della nodularina come descritto nel § 4.2.3.

#### *4.2.2 Materiali*

Gli standard delle microcistine, della nodularina e dell'ENK e i solventi sono gli stessi descritti nel § 2.2.1.

Per l'analisi della frazione disciolta sono state impiegate delle cartucce SPE Oasis HLB da 6 cc, 200 mg di fase stazionaria (Waters), dei matracci da 500 mL in vetro, vial da stoccaggio in vetro ambrato da 7 mL (Supelco) e vial ambrate da autocampionatore da 2 mL (Agilent Technologies).

Per l'analisi della frazione particellata sono stati impiegati dei filtri in fibra di vetro GF/F (Whatman Maidstone, Kent, UK) precedentemente riscaldati in muffola per 4 ore a 400°C. Sono stati inoltre utilizzati dei tubi da ultracentrifuga Safe-Lock da 2 mL (Eppendorf AG, Amburgo, Germania), dei filtri siringa in PTFE (ø 4 mm, 0.2 µm) (Phenomenex, Torrance, California, USA) e delle siringhe da 6 mL in polietilene. Il bagno ad ultrasuoni è stato acquistato da Ultrasonic, FALC (Treviglio, Italia).

#### *4.2.3 Preparazione del campione*

La frazione filtrata e il filtro sono stati trattati separatamente per l'analisi delle cianotossine nella frazione disciolta e in quella particellata.

Il filtrato conservato in bottiglie di vetro ambrato viene scongelato e riportato a temperatura ambiente e quindi posto in un matraccio da 500 mL, precedentemente decontaminato ed avvinato, al quale viene aggiunto lo standard interno ENK ad una concentrazione assoluta di 50 ng e 10 mL di acido formico. Il campione così preparato

viene processato mediante tecnica di estrazione e purificazione *Solid Phase Extraction* (SPE). La fase stazionaria usata è la OASIS HLB (200 mg, 6 cc) commercializzata da Waters. La procedura prevede un primo lavaggio con 5 mL di metanolo, una fase di equilibratura con 5 mL di acqua ultrapura e quindi il caricamento dei 500 mL di campione ad una pressione di  $-0.4/-0.5$  bar al fine di evitare allargamenti di banda dovuti alla forza ionica della soluzione caricata. La fase stazionaria è stata quindi lavata con 5 mL di acqua ultrapura mentre 5 mL di metanolo sono stati utilizzati per eluire dalla cartuccia gli analiti di interesse a pressione atmosferica. Un'aliquota dell'eluato è stata diluita 1/5 con acqua ultrapura al fine di ridurre la quantità di solvente organico nell'iniezione per preservare la separazione cromatografica nell'analisi descritta nel § 2.2.3.

Separatamente è stato trattato il filtro in fibra di vetro sul quale è stato raccolto il materiale particellato dell'acqua di lago campionata. Riportato a temperatura ambiente, il filtro è stato finemente suddiviso e posto in un tubo da ultracentrifuga da 2 mL (Eppendorf). Al filtro vengono aggiunti 15 ng assoluti di standard interno ENK e 1.5 mL di una soluzione acquosa di metanolo (50:50). Il campione viene quindi posto in bagno ad ultrasuoni per 30 minuti a temperatura ambiente e quindi filtrato con un filtro a siringa in PTFE da 0.2  $\mu\text{m}$ . Il filtrato ottenuto è stato diluito 1/5 per diminuire il solvente organico e quindi analizzato mediante HPLC-MS/MS.

#### 4.2.4 Analisi dei nutrienti

L'acqua filtrata mediante filtro in esteri misti di cellulosa (porosità 0.2  $\mu\text{m}$ ) è stata impiegata per la determinazione di alcuni sostanze nutrienti delle acque: fosfati, silicati, ammoniaca, nitriti e nitrati.

Il fosforo è naturalmente presente nelle acque naturali e in quelle di scarico esclusivamente come fosfati. Questi sono classificati come ortofosfati, fosfati condensati (piro-, meta- e altri polifosfati) e fosfati legati alla sostanza organica. Gli ortofosfati, impiegati nell'agricoltura e in generale come fertilizzante da giardino, vengono trasportati nelle acque superficiali mediante i processi di dilavamento dei terreni. I fosfati organici invece sono formati da processi biologici oppure a partire dagli ortofosfati mediante trattamenti biologici. Il fosforo è essenziale per la crescita degli organismi e può rappresentare un nutriente limitante della produzione primaria nel

corpo idrico. Un incremento di tale nutriente può stimolare la crescita di micro o macroorganismi fotosintetici.

La determinazione dei fosfati è stata condotta mediante kit HI 713 (Hanna Instruments srl, Padova) nel quale viene applicato il metodo standard 4500-P E (metodo con acido ascorbico). Viene effettuata una prima conversione delle varie forme del fosforo in ortofosfati, i quali vengono poi determinati per via colorimetrica. Il molibdato d'ammonio e l'antimonil tartrato di potassio reagiscono in mezzo acido con gli ortofosfati formando un eteropoliacido, acido fosfomolibdico, che viene ridotto a molibdeno di colore blu intenso dall'acido ascorbico. Il range di applicabilità del kit varia tra i 0.01 mg L<sup>-1</sup> e i 2.5 mg L<sup>-1</sup>.

Il silicio non è presente come elemento in natura ma piuttosto come silice (SiO<sub>2</sub>) nei vari minerali. Il silicio si trova inoltre combinato con altri elementi a formare i silicati. Le forme maggiormente presenti nelle acque sono H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub> e H<sub>3</sub>SiO<sub>4</sub><sup>-</sup>. È un nutriente considerato non essenziale per molte piante ma essenziale per gli animali.

Per la determinazione dei silicati è stato impiegato il kit HI 770 (Hanna Instruments srl, Padova) dove viene applicato un adattamento del metodo standard 4500-SiO<sub>2</sub> C e i silicati vengono analizzati mediante metodo colorimetrico.

L'ammonio molibdato reagisce con i silicati e i fosfati per produrre un eteropoliacido di colore giallo intenso. Viene quindi aggiunto acido ossalico per eliminare l'acido molibdofosforico. Il range di applicabilità del kit varia tra 1 mg L<sup>-1</sup> e 200 mg L<sup>-1</sup>.

L'azoto è uno degli elementi più importanti per qualsiasi forma di vita e il ciclo dell'azoto è uno dei cicli dei nutrienti più rilevanti per gli ecosistemi naturali. Il normale ciclo può essere interferito da attività antropiche quali l'agricoltura, portando a inquinamento delle acque e all'eutrofizzazione del sistema a seguito di un eccessivo carico di nutrienti.

Per la determinazione dell'ammoniaca è stato impiegato il kit HI 3826 commercializzato da Hanna Instruments srl (Padova). La concentrazione di ammoniaca in mg L<sup>-1</sup> viene determinata per via colorimetrica utilizzando il reattivo di Nessler che, in condizioni alcaline, porta alla formazione di un complesso colorato giallo secondo la seguente reazione:



L'aggiunta di EDTA prima del reattivo di Nessler inibisce la precipitazione degli ioni calcio e magnesio dovuto alla presenza del reattivo.

Tale kit presenta un range di applicabilità che varia tra 0.5 e 2.5 mg L<sup>-1</sup>

Per la determinazione dei nitriti è stato impiegato il kit HI 764 (Hanna Instruments srl, Padova), il quale utilizza un adattamento del metodo EPA 354.1.

Il metodo si basa sulla formazione di un composto diazotato per reazione di diazotizzazione tra la sulfanilamide e i nitriti e tale composto viene fatto reagire con N-(1-naftil) etilendiamina per produrre un composto dal colore violetto, determinato per via colorimetrica. Il range di applicazione del kit varia tra 1 e 200 µg L<sup>-1</sup>.

L'uso di un kit colorimetrico per la determinazione dei nitrati non è stato possibile in quanto i valori ottenuti erano al di sotto del limite di rilevabilità.

Al fine di completare l'analisi delle varie specie azotate è stata impiegata un'analisi in cromatografia ionica utilizzando un metodo strumentale validato da Morabito et al. [7].

Il metodo prevede l'uso di un cromatografo ionico Metrohm 761 Compact sul quale è stata montata un colonna Metrosep A Supp 4-250 munita di colonna di guardia Metrosep A Supp 4/5 Guard. L'analisi viene condotta mediante eluizione isocratica con una fase mobile acquosa contenente 1 mmol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 3.2 mmol L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>. Il volume di iniezione impiegato nell'analisi è di 20 µL. La quantificazione dei nitrati è stata realizzata mediante curva di calibrazione a sei punti compresi tra 0.02 e 10 mg L<sup>-1</sup>. Il limite di rilevabilità del metodo per la determinazione dei nitrati è di 0.025 mg L<sup>-1</sup>.

### ***4.3 Risultati e discussione***

Lo scopo di questo lavoro prevede lo sviluppo di una procedura preparativa che permetta la determinazione delle microcistine e della nodularina nella frazione disciolta e in quella particellata delle acque dolci.

La filtrazione del campione immediatamente dopo il campionamento è fondamentale per garantire la rappresentatività dei campioni: è necessario evitare che la lisi cellulare porti in fase disciolta le cianotossine ancora contenute all'interno delle alghe.

In letteratura i filtri in fibra di vetro sono i più utilizzati per le cianotossine e la porosità in genere utilizzata è 1.2  $\mu\text{m}$  [8,9], mentre in questo lavoro sono stati usati dei filtri in fibra di vetro con una porosità di 0.7  $\mu\text{m}$  al fine di garantire un'efficace separazione tra la frazione particellata e quella disciolta. Una filtrazione con un *cut off* più alto avrebbe comportato inoltre dei problemi nella procedura di estrazione della frazione disciolta, con intasamenti nelle cartucce SPE.

La conservazione dei campioni in bottiglie in vetro ambrato è stata fondamentale in quanto Ikawa et al. [10] hanno dimostrato che alcuni additivi della plastica portano ad interferenze nella determinazione mediante spettrometria di massa delle microcistine. In particolare la presenza di resorcinolo monobenzoato o 2,4-diidrossibenzofenone possono interferire nella determinazione della microcistina LR, mentre la presenza di bisfenolo A può dare problemi nell'analisi della microcistina YR [10].

Il vetro ambrato inoltre evita possibili degradazioni del campione a seguito dell'irraggiamento. È noto infatti che le microcistine se irradiate da una luce UV subiscono processi di isomerizzazione sul diene del gruppo Adda, caratteristico delle cianotossine [11].

L'analisi diretta della frazione disciolta mediante HPLC-ESI-MS/MS è stata applicata da Cong et al. [12] per livelli di concentrazioni superiori ai 0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  previa diluizione 1:1. Questa procedura, pur essendo molto semplice nell'applicazione, risulta però poco sensibile in quanto i limiti di rilevabilità vengono raddoppiati e l'analisi può essere soggetta a intensi effetti matrice legati al fatto che nessuna procedura di purificazione è stata eseguita. Pur utilizzando il metodo dello standard interno, Cong et al. [12] non sembrano aver considerato possibili effetti matrice legati alla procedura, valutazione fondamentale per la validazione di una procedura analitica.

L'analisi delle cianotossine nella frazione disciolta mediante HPLC-ESI-MS/MS richiede un trattamento del campione che permetta di eliminare le sostanze che potrebbero interferire nel processo di ionizzazione e quindi sulla sensibilità del metodo. L'estrazione in fase solida SPE è una tecnica preparativa molto efficiente che permette di estrarre selettivamente le specie di interesse e contemporaneamente può portare a una concentrazione del campione, diminuendo i limiti di rilevabilità procedurali del metodo proposto.

La fase stazionaria HLB, caratterizzata sia da gruppi funzionali idrofilici che lipofilici, porta ad alte rese di estrazione anche utilizzando alti volumi di caricamento [12,13].

In questo studio è stata dapprima valutata la tipologia della fase stazionaria ottimale per l'estrazione delle microcistine e della nodularina, quindi la capacità di carico della colonna SPE (contenuto in mg di fase stazionaria) necessaria a supportare un volume di 500 mL e infine è stata valutata dal punto di vista cromatografico la composizione della matrice iniettata.

Uno screening iniziale è stato fatto utilizzando diverse fasi stazionarie quali SCX (scambio cationico), SAX (scambio anionico) e C18 (fase inversa) commercializzate da Alltech e Oasis HLB prodotte da Waters da 10 mg con un volume di caricamento di 10 mL. Rese molto basse (<40%) e scarsa riproducibilità (coefficienti di variazione >10%) sono stati ottenuti per le varie fasi stazionarie ad eccezione della Oasis HLB, utilizzando come soluzione di caricamento il campione acidificato con 2% acido formico. La cartuccia Oasis HLB è stata utilizzata nella validazione del metodo, operando uno *scale-up* e passando a 500 mL di soluzione caricata e 250 mg di fase stazionaria adsorbente.

È stato infine considerato il contenuto in solvente organico nell'iniezione, valutando l'efficienza della ritenzione nell'analisi cromatografica. Soluzioni a diverso grado di diluizione con acqua ultrapura dell'eluato in metanolo dalla cartuccia SPE sono state analizzate mediante il metodo descritto nel § 2.2. Una diluizione 1 a 5 è necessaria al fine di preservare la ritenzione ed evitare fenomeni di sdoppiamento di picco o di *fronting*. La procedura messa a punto in questo lavoro prevede quindi una concentrazione del campione 1 a 20 abbassando i limiti di rilevabilità e nello stesso tempo riducendo l'effetto matrice mediante purificazione e successiva diluizione del campione.

La procedura di preparazione dei filtri campionati con il particellato lacustre prevede invece una semplice estrazione con un solvente: una percentuale di metanolo superiore

al 50% risulta il solvente più efficiente per estrarre le cianotossine dalla frazione particolata [8,9].

#### *4.3.1 Validazione del metodo*

La validazione del metodo è stata eseguita mediante la stima dell'esattezza, della precisione, del bianco procedurale, delle resa di procedura e dei limiti di rilevabilità (MDL) e di quantificazione (MQL) della procedura analitica.

A causa della mancanza di un materiale certificato per l'analisi delle microcistine e della nodularina nelle acque dolci, è stato necessario validare il metodo aggiungendo a una matrice esente dagli analiti di interesse gli standard di microcistine e nodularina e lo standard interno.

##### *4.3.1.1 Frazione disciolta*

La matrice utilizzata per la validazione della procedura per la determinazione delle cianotossine nella frazione disciolta è l'acqua minerale di bottiglia. È stato evitato l'uso dell'acqua potabile in cui è presente del cloro in quanto potrebbe portare alla formazione di prodotti clorurati delle microcistine come dimostrato da Merel et al. [14]. L'acqua minerale in bottiglia invece non ha subito processi di clorurazione e nello stesso tempo contiene un certo contenuto di sali minerali. La forza ionica della matrice deve essere simile a quella dell'acqua lacustre per valutare correttamente la resa di estrazione nella procedura SPE, dove la ritenzione è influenzata anche dalla forza ionica della soluzione caricata nella cartuccia.

La quantificazione degli analiti è stata condotta utilizzando il metodo dello standard interno e le concentrazioni degli analiti sono stati corrette per un fattore di risposta al fine di eliminare le fluttuazioni legate al segnale strumentale. Il fattore di risposta corrisponde al coefficiente angolare della retta di calibrazione ottenuta ponendo in ascissa il rapporto tra la concentrazione di analita e quella dello standard interno e in ordinata il rapporto tra le loro aree. Questo valore si ricava quindi iniettando una soluzione contenente sia gli analiti di interesse che lo standard interno ad una concentrazione nota e diluiti in una matrice sintetica o reale.

La stima dell'esattezza espressa come errore medio percentuale permette la valutazione di quanto il valore quantificato si discosta dal valore noto aggiunto alla matrice.

25 ng assoluti di microcistine e nodularina e 50 ng assoluti di ENK sono stati aggiunti a 500 mL di campione acidificato al 2% in acido formico.

Nella valutazione della resa dell'intera procedura, invece, le tossine sono state aggiunte ai 500 mL di campione acidificato mentre l'ENK è stata posta subito dopo l'eluizione dalla cartuccia SPE e prima della diluizione, al fine di valutare l'efficienza estrattiva della tecnica. La deviazione standard delle misure ripetute permette di valutare la ripetibilità del metodo.

In tabella 4.1 vengono riportati i valori di errore percentuale, rese percentuali e i coefficienti di variazione della procedura descritta nel § 4.2.3.

**Tabella 4.1.** Valori di esattezza, resa percentuale e ripetibilità della procedura di preparazione del campione per la determinazione delle cianotossine nella frazione disciolta delle acque dolci

	LA	LY	YR	NOD	LR	LW	LF	RR
Errore medio (%)	-9	-5	-13	-7	-9	-29	-6	1
Resa media (%)	90 ± 3	91 ± 1	84 ± 6	96 ± 4	87 ± 10	72 ± 8	90 ± 7	95 ± 5
CV%	3	1	7	4	11	11	8	6

Lo standard interno ENK scelto per la determinazione delle microcistine permette una quantificazione molto accurata con valori di errori percentuali che oscillano tra il -13% (MC YR) e l'1% (MC RR). Una pesante sottostima nella quantificazione viene però ottenuto per la microcistina LW con valore di errore percentuale di -29% a causa della bassa resa di estrazione. La preparativa è infatti caratterizzata da alte rese di estrazione superiori all'80% per tutte le cianotossine ad eccezione della LW per la quale la resa è del 72%. Problemi di recuperi sono stati riscontrati per questa microcistina già da Lawton et al. [8] e sembra che questi siano legati alla presenza del triptofano all'interno della catena peptidica. Una possibile spiegazione per la bassa resa di estrazione della microcistina LW potrebbe derivare da una ritenzione troppo efficiente nella fase stazionaria HLB, la quale contiene dei gruppi aromatici che possono dare interazioni  $\pi$  con il gruppo indolico del triptofano. Avendo la microcistina LW e lo standard interno due rese di estrazione molto diverse, la quantificazione viene sottostimata come dimostrato dall'alto errore percentuale. Il metodo messo a punto in questo lavoro non può essere applicato pertanto alla quantificazione della microcistina LW.

In tabella 4.1 vengono inoltre riportati i valori di coefficiente di variazione relativi a tre prove ripetute delle rese del processo. I valori risultano inferiori o prossimi al 10% dimostrando come la procedura preanalitica risulti ripetibile.

I limiti di rilevabilità (MDL) e di quantificazione (MQL) della metodologia preanalitica sono stati valutati analizzando tre bianchi procedurali, ovvero tre campioni composti dalla matrice alla quale è stato aggiunto solo lo standard interno (50 ng assoluti). Il MDL e il MQL sono stati calcolati rispettivamente come tre e dieci volte la deviazione standard del bianco procedurale e vengono riportati in tabella 4.2.

**Tabella 4.2.** Valori di bianco medio e limiti di rilevabilità (MDL) e quantificazione (MQL) relativi alla quantificazione delle cianotossine nella frazione disciolta delle acque dolci

	LA	LY	YR	NOD	LR	LW	LF	RR
Bianco medio (ng L <sup>-1</sup> )	0.4	0.8	3.0	1.6	3.0	0.1	0.4	0.5
MDL (ng L <sup>-1</sup> )	0.2	0.4	0.3	0.3	0.6	0.1	0.1	0.3
MQL (ng L <sup>-1</sup> )	0.6	1.2	0.8	1.1	2.1	0.2	0.3	0.9

Perez et al. [2] hanno riassunto i vari limiti di rilevabilità trovati utilizzando varie tecniche analitiche tra cui analisi mediante saggi biochimici ma anche analisi mediante diverse tecniche ifenate di spettrometria di massa. Tra i MDL citati però i limiti più bassi sono stati ottenuti da Zhang et al. [15] con un sistema LC accoppiato a una trappola mediante (+)ESI che riesce a determinare la microcistina LR fino a una concentrazione di 2.6 ng L<sup>-1</sup>.

I migliori MDL trovati in letteratura, anche se non inferiori a quanto trovato in questo lavoro, sono stati riportati da Wang et al. [13], il quale riporta per le microcistine LR, RR, LW e LF rispettivamente dei valori di MQL di 2.5, 6.0, 2.5 e 1.3 ng L<sup>-1</sup>, ottenuti grazie a un sistema UPLC-MS/MS e ad una preconcentrazione 1 a 1000 mediante SPE.

I limiti di rilevabilità ottenuti mediante il metodo messo a punto in questo lavoro risultano di un ordine di grandezza più bassi di quanto riportato in letteratura [2,13,16] grazie all'uso di un metodo strumentale estremamente sensibile (§ 2.2.6) e a una procedura preparativa che permette di purificare e concentrare il campione di 20 volte.

Questo metodo permette di ottenere risultati migliori a quelli raggiunti utilizzando un sistema UPLC [13] molto più costoso rispetto il cromatografo utilizzato in questo lavoro e senza operare una pre-concentrazione troppo spinta che potrebbe incrementare notevolmente l'effetto matrice

I valori trovati sono nettamente inferiori al limite di 1 µg L<sup>-1</sup> imposto dalla *World Health Organization* per le acque destinate all'uso umano.

#### 4.3.1.2 Frazione particellata

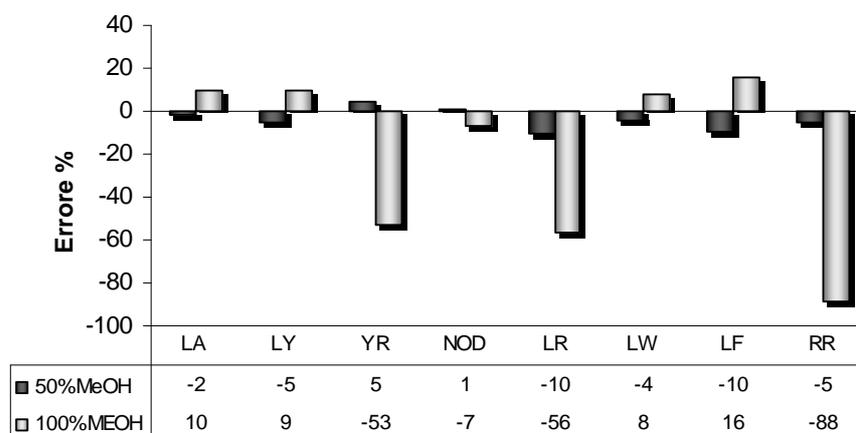
Una procedura di validazione è stata condotta anche per il metodo preparativo per la determinazione delle microcistine e nodularina nella frazione particellata. Lo standard interno ENK è stato utilizzato anche in questo caso per la quantificazione e una soluzione utilizzata per il calcolo del fattore di risposta (SFR) preparata in matrice è stata utilizzata per eliminare fluttuazioni strumentali.

Non essendo, anche in questo caso, disponibile in commercio un materiale di riferimento certificato, è stata valutata l'accuratezza e la resa della procedura per ogni analita impiegando come matrice dei filtri in fibra di vetro GF/F scaldati in muffola per 4 ore a 400 °C sui quali è stata filtrata l'acqua minerale in bottiglia utilizzata precedentemente per la validazione della frazione disciolta. Le prove sono state ripetute tre volte per valutare la ripetibilità delle misure.

L'ottimizzazione della procedura estrattiva è stata studiata testando due diversi solventi di estrazione: metanolo, usato anche per i filtri per l'aerosol nel § 3.3.1, e una soluzione acquosa di metanolo 50:50.

Per la valutazione dell'esattezza (errore percentuale), una soluzione standard di microcistine e nodularina (7.5 ng assoluti) e una di standard interno ENK (15 ng assoluti) sono state aggiunte ai filtri finemente suddivisi, seguendo poi la procedura riportata in § 4.2.3.

In figura 4.3 vengono confrontati i valori di errore percentuale ottenuti impiegando i due solventi di estrazione con diversa percentuale di metanolo.

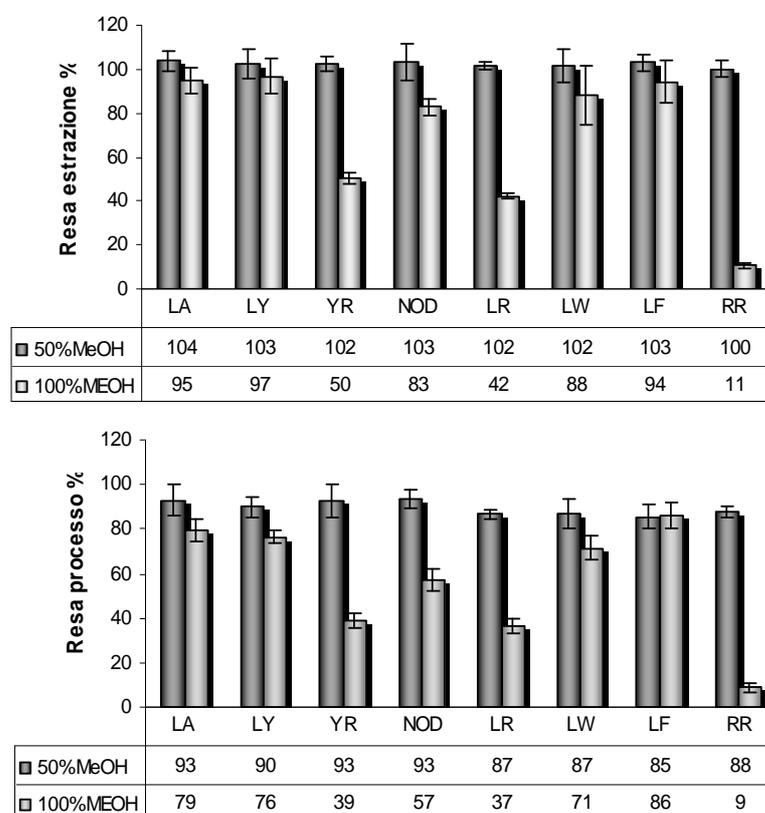


**Figura 4.3.** Confronto tra gli errori percentuali medi ottenuti con due solventi di estrazione per la determinazione delle cianotossine nella frazione particellata.

L'estrazione con un solvente a più alta polarità permette di ottenere degli errori percentuali inferiori o uguali al  $\pm 10\%$  per tutti gli analiti considerati nel presente lavoro mentre se l'estrazione avviene con solo metanolo le microcistine YR, LR e RR vengono pesantemente sottostimate (figura 4.3).

Per ciascuna cianotossina è stata valutata la resa di estrazione, aggiungendo lo standard interno prima della filtrazione e la resa per l'intero processo, aggiungendo l'ENK alla fine di tutta la procedura analitica. Nella figura 4.4 si può notare come l'estrazione con 50% metanolo risulti più efficiente per tutte le cianotossine considerate e in particolare per le microcistine YR, LR e RR le quali dimostrano rese di estrazione inferiori al 60% se viene usato solo metanolo. Questo è principalmente legato alle caratteristiche chimiche delle microcistine in quanto la YR, RR e LR sono caratterizzate da una maggiore polarità contenendo all'interno della catena peptidica almeno un residuo arginico. La filtrazione infine comporta mediamente una perdita di circa il 10% in concentrazione, come è dimostrato in figura 4.4.

Le basse rese percentuali ottenute per le microcistine YR, LR e YR con metanolo come solvente estraente hanno determinato importanti errori nella quantificazione di queste come si può notare dalla figura 4.3.



**Figura 4.4.** Confronto delle rese di estrazione e dell'intero processo per la frazione particellata ottenute estraendo le cianotossine con due diversi solventi.

Nella figura 4.4 sono inoltre riportate le barre di errore relative alle varie misure al fine di verificare la ripetibilità delle misure. I coefficienti di variazione percentuali risultano sempre inferiore al 10%.

Dalla valutazione complessiva degli errori percentuali, delle rese di estrazione e di quelle del processo è possibile stabilire che la procedura che impiega una soluzione acquosa al 50% di metanolo porta a un metodo analitico con migliori performances.

Sono stati valutati i limiti di rilevabilità (MDL) e di quantificazione (MQL) della procedura analitica, calcolati come tre e dieci volte la deviazione standard di tre bianchi procedurali, ovvero dei filtri ai quali è stato aggiunto solo lo standard interno processati secondo la procedura descritta al § 4.2.3. In questo caso i MDL e i MQL, riportati in tabella 4.3, vengono espressi in pg assoluti e il calcolo della concentrazione delle cianotossine per ogni filtro viene valutato dividendo la concentrazione trovata per il volume di acqua filtrata.

**Tabella 4.3.** Valori di bianco medio e limiti di rilevabilità (MDL) e quantificazione (MQL) relativi alla quantificazione delle cianotossine nella frazione particellata delle acque dolci

	LA	LY	YR	NOD	LR	LW	LF	RR
Bianco medio (pg)	2.2	3.7	14.4	6.9	3.0	0.9	2.1	1.0
MDL (pg)	0.8	1.3	2.0	1.4	1.5	0.3	0.6	0.1
MQL (pg)	2.5	4.4	6.5	4.8	5.1	1.0	2.1	0.4

I valori di MDL e MQL sono molto bassi e se si considera un volume di 500 mL filtrata variano tra i 0.2 e i 3.9 pg L<sup>-1</sup>, evidenziando come il metodo presenti un'elevata sensibilità se considerato il limite della WHO di 1 µg L<sup>-1</sup> di concentrazione totale (somma della frazione disciolta e particolata) di microcistina LR. In letteratura, la frazione particellata molto spesso non viene caratterizzata singolarmente ma vengono valutate le concentrazioni della frazione filtrata oppure la concentrazione in un campione non filtrato e sonificato per liberare il contenuto cellulare. Pertanto pochi lavori [8,9] valutano le procedure per l'estrazione delle microcistine o nodularine dai filtri contenenti il particellato. I limiti procedurali trovati in questo lavoro sono simili a quanto riportato da Spooft et al. [9] per la microcistina LR.

#### 4.3.2 Valutazione dell'effetto matrice

La cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem viene considerata il miglior metodo per una determinazione quantitativa. Tuttavia vi sono evidenze sperimentali [17] che dimostrano come l'analisi di un campione reale può essere soggetto al cosiddetto "effetto matrice". La coeluzione di componenti della matrice non rivelate dal metodo MRM possono interferire nel processo di ionizzazione portando a fenomeni di soppressione o accrescimento del segnale in massa. Nello sviluppo e validazione di un metodo quantitativo mediante HPLC-MS/MS, la valutazione dell'effetto matrice risulta fondamentale al fine di assicurarsi che la precisione, la selettività e la sensibilità non vengano compromesse [18].

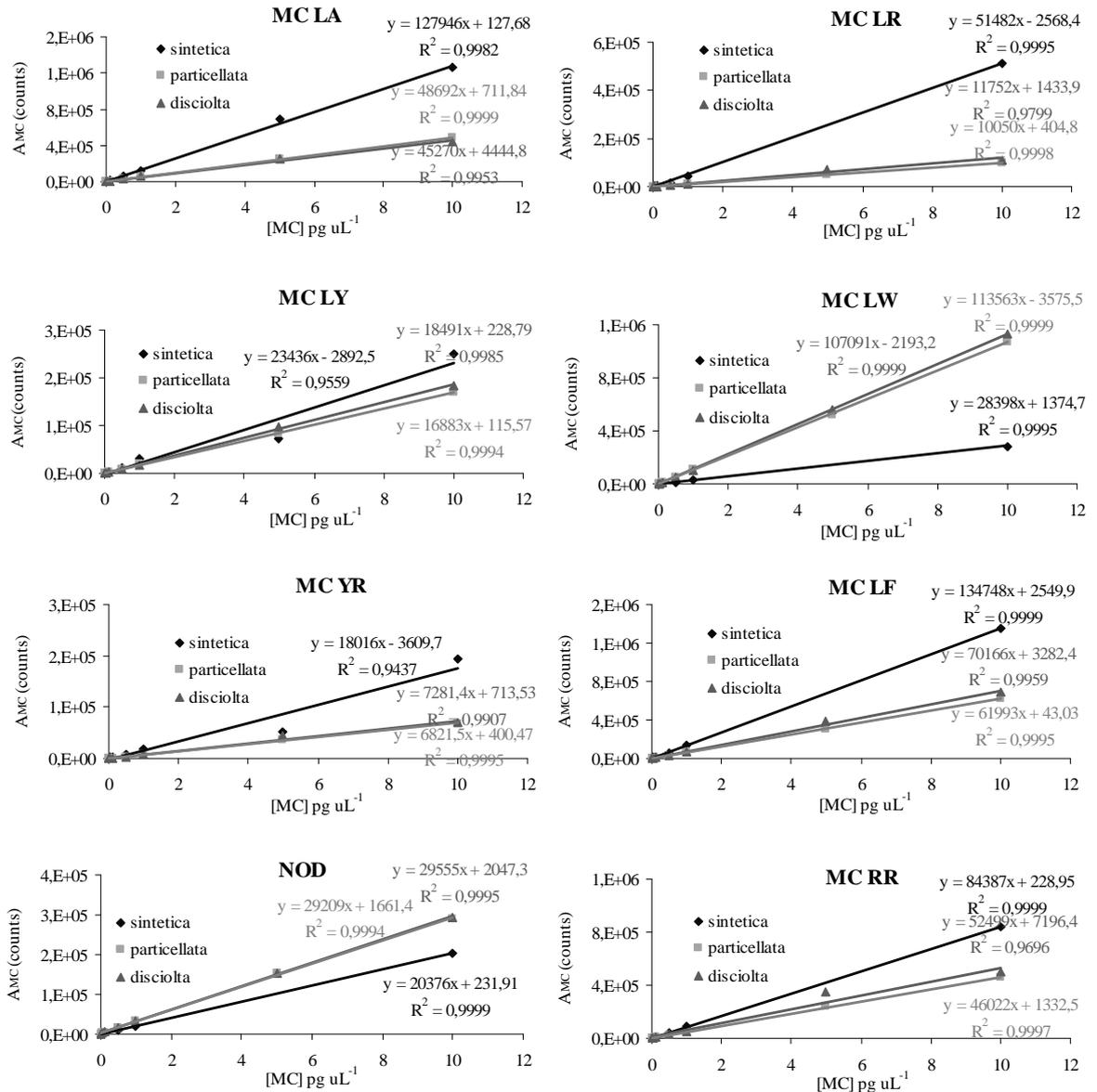
Il meccanismo e l'origine dell'effetto matrice è un argomento molto studiato ma non ancora del tutto compreso. King e al. [19] hanno dimostrato come la soppressione nella ionizzazione elettrospray derivi da un'alta concentrazione di sostanze non volatili, come solfati o fosfati, presenti nello spray assieme all'analita. L'interfase HPLC-MS può essere quindi paragonata a un reattore chimico dove degli ioni primari reagiscono con le molecole di analita in una serie di reazioni di trasferimento di carica o di ioni.

Una valutazione qualitativa dell'effetto matrice nello sviluppo di un metodo per la determinazione delle microcistine nelle acque dolci è stato condotto da Allis et al. [20]. Il metodo consiste nella valutazione della variazione del segnale in massa mediante infusione post-colonna di uno standard di microcistine contemporaneamente un'analisi cromatografica della matrice priva degli analiti.

Una valutazione qualitativa dell'effetto matrice può anche essere fatta se si confrontano le curve di calibrazione costruite ponendo in ascissa la concentrazione di ogni singola tossina e in ordinata la sua area e valutando come varia la pendenza se le tossine vengono diluite nella matrice analizzata (figura 4.5). Per ciascun analita è stata costruita una curva di calibrazione a sette livelli di concentrazione (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ) in acqua ultra pura (sintetica) e nelle matrici ottenute dalla procedura per la frazione particolata (particolata) e in quella per la frazione disciolta (disciolta) descritte nel § 4.2.3. Il coefficiente angolare di una curva di calibrazione indica la sensibilità di un metodo e quindi verificando come questo vari in funzione della matrice, è possibile valutare qualitativamente l'effetto di tale sistema.

Come si può notare dalla figura 4.5, le matrici investigate hanno un effetto simile sull'analisi portando a una sensibile variazione del segnale. Per tutte le cianotossine è

stata riscontrata una soppressione del segnale ad eccezione della microcistina LW e della nodularina in cui vi è un netto accrescimento.



**Figura 4.5.** Valutazione qualitativa dell'effetto matrice per ogni singola cianotossine studiata.

Una valutazione quantitativa dell'effetto matrice, come proposto da Matuszewski [21], è stata condotta in questo lavoro al fine di meglio definire quali siano gli aspetti critici nella quantificazione delle microcistine nelle acque dolci.

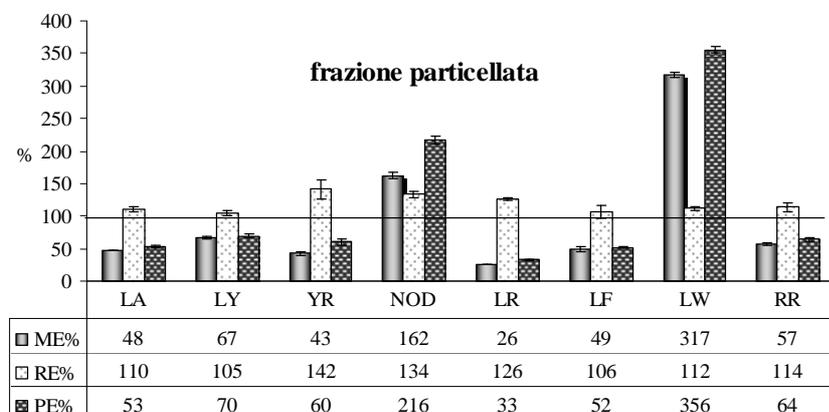
Sono stati valutati i segnali ottenuti iniettando ( $n=3$ ) una soluzione di cianotossine a  $1 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$  sciolta in acqua ultrapura e nelle matrici studiate con l'aggiunta della soluzione standard prima e dopo della procedura di preparazione.

La variabilità dei valori dei coefficienti di correlazione (CV%) permette di valutare se vi sono effetti nella precisione dell'analisi derivanti dalla presenza di una matrice ottenuta in seguito a processi di estrazione, purificazione e diluizione. Come si può notare dalla tabella 4.4 la precisione strumentale non viene inficiata dalla presenza della matrice, come si può notare confrontando i valori di CV% di una soluzione in acqua ultra pura e una in matrice con l'aggiunta degli standard dopo l'estrazione. Il confronto poi tra i CV% prima e dopo l'estrazione conferma la ripetibilità della procedura pre-analitica, già evidenziata nel § 4.3.1.

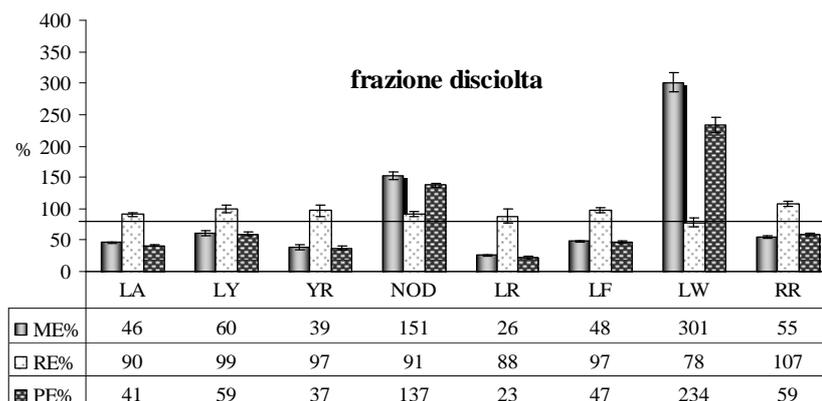
**Tabella 4.4.** Valutazione dei coefficienti di variazione (CV%) per le varie matrici per ogni cianotossina.

CV%	frazione disciolta			frazione particellata	
	acqua ultrapura	standard dopo estrazione	standard prima estrazione	standard dopo estrazione	standard prima estrazione
LA	3	1	3	1	4
LY	13	7	6	4	4
YR	2	9	9	7	9
NOD	4	4	3	3	3
LR	6	5	11	1	2
LF	10	3	4	7	2
LW	5	5	5	1	1
RR	7	4	3	4	5

Matuszewski et al. [21] definisce l'effetto matrice come il rapporto tra l'area di un analita sciolto in una matrice al quale è stato aggiunto dopo la procedura di preparazione del campione e l'area dello stesso analita sciolta in un solvente puro, nel nostro caso acqua ultrapura. L'efficienza di estrazione viene invece calcolata dal rapporto tra le area di un analita aggiunto prima e dopo la preparazione del campione mentre l'intero processo viene considerato come il prodotto tra l'effetto matrice e l'efficienza di estrazione.



**Figura 4.6.** Effetto matrice (ME), recupero (RE) ed efficienza del processo (PE) valutati per ogni singolo analita ottenuti con la procedura descritta nel § 4.2.3 per la frazione particolata.



**Figura 4.7.** Effetto matrice (ME), recupero (RE) ed efficienza del processo (PE) valutati per ogni singolo analita ottenuti con la procedura descritta nel § 4.2.3 per la frazione disciolta.

Nelle figure 4.6 e 4.7 vengono riportati i valori ottenuti per l'effetto matrice (ME), l'efficienza di estrazione (RE) e l'efficienza di processo (PE) ottenuti applicando le procedure di preparazione del campione riportate nel § 4.2.3 per la frazione particolata e per quella disciolta.

Come si può notare i dati quantitativi riportati in figura 4.6 e 4.7 sono concordi con quanto evidenziato in figura 4.5 e mettono in evidenza come l'effetto matrice porti a una soppressione di segnale per le varie cianotossine ad eccezione della microcistina LW e della nodularina. Il recupero risulta per entrambe le matrici prossimo al 100%, dimostrando l'efficienza del sistema di estrazione scelto in questo lavoro.

Infine l'efficienza del processo viene nettamente influenzata dall'effetto matrice, evidenziando come la procedura studiata non permette di eliminare completamente le interferenze presenti durante l'analisi.

Queste importanti osservazioni sottolineano come non sia possibile quantificare utilizzando una curva di calibrazione esterna preparata in un solvente puro, in quanto ci sarebbe una sottostima per la maggior parte delle microcistine e una sovrastima della LW e della nodularina.

L'uso di un metodo di calibrazione "matrix matched calibration" risulta fondamentale per una corretta quantificazione.

La quantificazione per diluizione isotopica risulta generalmente il metodo più efficace per ovviare ai problemi derivanti dall'effetto matrice ma nel caso delle microcistine non sono disponibili standard marcati isotopicamente.

In questo lavoro è stato utilizzato comunque uno standard interno con delle caratteristiche chimico fisiche simili che hanno permesso una buona quantificazione

delle cianotossine, come verificato nel § 4.3.1. Questo composto aggiunto all'inizio della procedura permette di ovviare a errori casuali derivanti dall'operatore e anche di minimizzare le variazioni del segnale strumentale.

I campioni sono stati quantificati correggendo il dato mediante un fattore di risposta, ovvero il coefficiente angolare di una retta di calibrazione ottenuta ponendo in ascissa il rapporto tra la concentrazione di analita e quella dello standard interno e in ordinata il rapporto tra le loro aree.

Questo metodo di quantificazione permette di evitare lunghi tempi di analisi dovuti all'iniezione per ogni batch di campioni della retta di calibrazione e contemporaneamente permette di eliminare le fluttuazioni del segnale strumentale.

Tuttavia al fine di eliminare i problemi di effetto matrice, la SFR è stata preparata in una matrice esente dagli analiti di interesse, permettendo un'accurata quantificazione.

#### 4.3.3 Applicazione del metodo

Il metodo messo a punto in questo lavoro permette la determinazione con elevata sensibilità della concentrazione di sette microcistine e della nodularina distinguendo tra la frazione disciolta e quella particellata dell'acqua dolce.

Il metodo è stata applicato a otto campioni provenienti da quattro laghi antartici al fine di verificare la presenza di microcistine nel territorio. I laghi dai quali è stata prelevata l'acqua sono situati nei pressi della base italiana Mario Zucchelli, localizzata sulla costa bagnata dal mare di Ross e vicino alla base americana McMurdo come si può vedere dalla figura 4.1.

In letteratura vi sono alcuni studi [22-25] che hanno messo in evidenza la presenza di cianobatteri e di microcistine in pozze formate dalle acque di fusione dei ghiacci o delle nevi nei pressi della base di McMurdo in Antartide. Le varianti di microcistine maggiormente individuate sono state la microcistina LR e la [D-Asp<sup>3</sup>]LR, anche se Wood et al. [25] hanno individuato nuovi congeneri caratterizzati per la maggior parte da demetilazioni nella catena peptidica. Hitzefeld et al. [22] e Jungblut et al. [23] hanno ipotizzato che le specie di organismi produttrici più probabili siano *Oscillatoria*, *Phormidium* e *Nostoc* e hanno verificato che le specie bentoniche sono quelle maggiormente presenti nelle pozze.

Data la vicinanza geografica con i siti vicini alla base americana di McMurdo, l'obiettivo di questo lavoro era caratterizzare i laghi siti nei pressi della base italiana.

Sono stati opportunamente scelti dei laghi che avessero delle caratteristiche particolari e il campionamento è stato ripetuto due momenti diversi al fine di verificare se la presenza delle tossine si manifestasse con l'avanzare della stagione estiva.

I laghi 14 e 15A nei pressi di Edmonson Point sono localizzati in una zona vicino al mare ma in cui è presente il pack per gran parte dell'anno. La presenza di fauna acquatica influenza l'apporto dei nutrienti e la presenza di batteri nell'area. Il lago di Tarn Flat invece si trova in una depressione in cui non sono presenti nevi, è un'area piuttosto isolata lontana da possibili influenze marine. Infine il lago 10 di Inexpressible Island è sito nei pressi della Polinia, zona marina molto interessante in quanto soggetta a forti raffiche di vento e in cui vi è una totale assenza di ghiaccio per tutto l'anno.

I parametri chimico fisici sono stati registrati solo il 7 gennaio a causa di problemi operativi riuscendo comunque a caratterizzare le aree di campionamento. Dalla tabella 4.5 si può notare come i laghi dimostrano valori di temperatura sempre inferiori ai 10°C, nonostante il 7 gennaio lo scongelamento era completo. L'alcalinità dell'acqua è marcata per il lago 14 mentre nel lago 15 il pH si avvicina alla neutralità.

**Tabella 4.5** . Parametri chimico fisici registrati durante il campionamento dei laghi il 7 gennaio 2012.

Lago	Temperatura, °C	Salinità, psu	Conduttività, µS	pH
Edmonson Point – lago 14	9.4	1.1	1545	9.44
Edmonson Point – lago 15	2.9	0.0	21.9	6.76
Inexpressible Island – lago 10	1.5	1.6	1737	7.92
Tarn Flat – lago 20	3.9	0.2	255.2	8.27

In tabella 4.6 si riportano le concentrazioni di nutrienti registrati per ogni singolo campione.

**Tabella 4.6**. Concentrazioni di silicati, fosfati, ammoniaca, nitriti e nitrati per ogni singolo campione di lago antartico. I valori di LOD per ogni singolo nutrienti sono riportati nel § 4.2.4. (nd = non disponibile).

nome lago	data campionamento	silicati mg L <sup>-1</sup>	fosfati mg L <sup>-1</sup>	ammoniaca mg L <sup>-1</sup>	nitriti µg L <sup>-1</sup>	nitrati mg L <sup>-1</sup>
Lago 14	20/12/2011	26	0.98	1.5	29	nd
Lago 14	07/01/2012	12	0.50	1.5	16	0.13
Lago 15	20/12/2011	3	0.10	0.5	3	0.13
Lago 15	07/01/2012	<LOD	0.32	0.5	4	0.13
Lago 10	22/12/2011	7	0.10	<LOD	12	nd
Lago 10	07/01/2012	<LOD	<LOD	<LOD	11	0.12
Lago 20	22/12/2011	6	0.09	0.5	10	0.47
Lago 20	07/01/2012	12	0.11	0.5	8	nd

Si può notare come le concentrazioni maggiori di nutrienti sono trovate nel lago 14 dove le concentrazioni di silicati e fosfati hanno lo stesso andamento dei nutrienti azotati. La forma azotata maggiormente presente in tutti i laghi risulta l'ammoniaca nonostante le concentrazioni di nitrati siano piuttosto simili nei laghi 20 e 10.

Le concentrazioni dei nutrienti riportate in tabella 4.6 dimostrano come vi siano condizioni favorevoli per la crescita di biomassa.

L'analisi dei campioni mediante il metodo HPLC-MS/MS con acquisizione MRM descritto nel § 2.2 ha evidenziato come le concentrazioni delle otto cianotossine investigate siano al di sotto del limite di rilevabilità.

I campioni sono stati inoltre analizzati mediante il metodo sviluppato in *Precursor ion mode* ma anche in questo caso non è stata riscontrata la presenza di nessun composto caratterizzato dal frammento a  $m/z$  128 del gruppo Adda.

I laghi monitorati, quindi nonostante presentino delle caratteristiche chimico-fisiche simili a quelle dei laghi studiati nelle vicinanze di McMurdo [22-25], non hanno dimostrato la presenza di tossine prodotte da cianobatteri.

#### **4.4 Conclusioni**

In questo lavoro sono stati sviluppati due metodi per la determinazione di otto cianotossine (microcistina LA, LY, YR, LR, RR, LW, LF e NOD) nella frazione disciolta e in quella particellata.

Il metodo dello standard interno è stato utilizzato al fine di ottenere una quantificazione accurata, dove vengono eliminati possibili errori casuali e fluttuazioni procedurali. Le fluttuazioni strumentali e l'effetto matrice vengono invece minimizzati quantificando mediante il fattore di risposta.

Le procedure sono state validate valutando per ciascuna matrice l'errore medio percentuale, la resa procedurale e la ripetibilità delle analisi.

Sia la procedura per la frazione disciolta che quella per la particella hanno portato a rese di estrazioni superiori all'80% e a errori percentuali inferiori a  $\pm 10$ . L'unica eccezione è rappresentata dalla microcistina LW, per la quale la procedura della frazione disciolta non è validata in quanto una bassa resa percentuale (72%) ha portato a una pesante sottostima nella quantificazione con errore percentuale di -29%.

Il metodo sviluppato per l'analisi della frazione disciolta delle acque dolci ha dimostrato dei valori di MDL che oscillano tra i 0.1 (MC LF) e i 0.6 (MC LR) ng L<sup>-1</sup> mentre per

l'analisi della frazione particolata i valori oscillano tra i 0.1 (MC RR) e i 2.0 (MC YR) pg assoluti. I limiti trovati in questo lavoro sono risultati inferiori o simili a quanto riportato in letteratura grazie alla sensibilità del metodo strumentale che conferma l'utilità della ionizzazione in polarità negativa e alle caratteristiche delle procedure pre-analitiche sviluppate.

La validazione del metodo è stata completata da una valutazione quantitativa dell'effetto matrice presente nell'analisi delle due matrici studiate, evidenziando come sia fondamentale la quantificazione mediante un fattore di risposta preparato in matrice al fine di evitare una sottostima nella quantificazione.

Il metodo è stato applicato a otto campioni di acqua lacustre proveniente dal continente antartico campionata durante la XXVII Spedizione in Antartide (2011/12).

Lo scopo di queste analisi era individuare la presenza di cianotossine e quindi cianobatteri nei laghi situati nei pressi della base italiana Mario Zucchelli e investigare quali condizioni ambientali ne avessero favorito la presenza. Questi composti non sono stati ancora individuati in questi siti ma le ricerche condotte in pozze situate vicino la base americana di McMurdo ne avevano fatto ipotizzare la presenza. L'analisi quantitativa mediante MRM e quella qualitativa in *precursor ion scan* non hanno dimostrato concentrazioni di cianotossine superiori ai limiti di rilevabilità.

#### 4.5 Riferimenti bibliografici

- [1] R.W. Zurawell, H.R. Chen, J.M. Burke, E.E. Prepas, *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews* 8 (2005) 1.
- [2] S. Perez, D.S. Aga, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 24 (2005) 658.
- [3] M. Barco, J. Rivera, J. Caixach, *Journal of Chromatography A* 959 (2002) 103.
- [4] J.M. Hernandez, V. Lopez-Rodas, E. Costas, *Medical Hypotheses* 72 (2009) 539.
- [5] H.M. Oh, S.J. Lee, J.H. Kim, H.S. Kim, B.D. Yoon, *Applied and Environmental Microbiology* 67 (2001) 1484.
- [6] B.C. Hitzfeld, S.J. Hoeger, D.R. Dietrich, *Environmental Health Perspectives* 108 (2000) 113.
- [7] E. Morabito, E. Zendri, R. Piazza, R. Ganzerla, S. Montalbani, E. Marcoloni, F. Bonetto, A. Scandella, C. Barbante, A. Gambaro, *Environ Sci Pollut Res* (2012).
- [8] L.A. Lawton, C. Edwards, G.A. Codd, *Analyst* 119 (1994) 1525.
- [9] L. Spooof, P. Vesterkvist, T. Lindholm, J. Meriluoto, *Journal of Chromatography A* 1020 (2003) 105.
- [10] M. Ikawa, N. Phillips, J.F. Haney, J.J. Sasner, *Toxicon* 37 (1999) 923.
- [11] K. Tsuji, T. Watanuki, F. Kondo, M.F. Watanabe, S. Suzuki, H. Nakazawa, M. Suzuki, H. Uchida, K. Harada, *Toxicon* 33 (1995) 1619.
- [12] L.M. Cong, B.F. Huang, Q. Chen, B.Y. Lu, J. Zhang, Y.P. Ren, *Analytica Chimica Acta* 569 (2006) 157.
- [13] J. Wang, X.L. Pang, F. Ge, Z.Y. Ma, *Toxicon* 49 (2007) 1120.
- [14] S. Merel, B. LeBot, M. Clement, R. Seux, O. Thomas, *Chemosphere* 74 (2009) 832.
- [15] L.F. Zhang, X.F. Ping, Z.G. Yang, *Talanta* 62 (2004) 193.
- [16] J. Pietsch, S. Fichtner, L. Imhof, W. Schmidt, H.J. Brauch, *Chromatographia* 54 (2001) 339.
- [17] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 882.
- [18] in F.a.D.A. Department of Health and Human Services (Editor), 2001, p. 28526.
- [19] R. King, R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein, T. Olah, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 11 (2000) 942.
- [20] O. Allis, J. Dauphard, B. Hamilton, A.N. Shuilleabhain, M. Lehane, K.J. James, A. Furey, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 3436.
- [21] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, *Analytical Chemistry* 75 (2003) 3019.
- [22] B.C. Hitzfeld, C.S. Lampert, N. Spaeth, D. Mountfort, H. Kaspar, D.R. Dietrich, *Toxicon* 38 (2000) 1731.
- [23] A.D. Jungblut, I. Hawes, D. Mountfort, B. Hitzfeld, D.R. Dietrich, B.P. Burns, B.A. Neilan, *Environmental Microbiology* 7 (2005) 519.
- [24] A.D. Jungblut, S.J. Hoeger, D. Mountfort, B.C. Hitzfeld, D.R. Dietrich, B.A. Neilan, *Toxicon* 47 (2006) 271.
- [25] S.A. Wood, D. Mountfort, A.I. Selwood, P.T. Holland, J. Puddick, S.C. Cary, *Applied and Environmental Microbiology* 74 (2008) 7243.

## **CAPITOLO 5**

### **Determinazione di microcistine e nodularina nei mitili**

#### ***5.1 Introduzione***

Le cianotossine vengono rilasciate nell'acqua durante la fioritura algale oppure per lisi cellulare, rappresentando così un pericolo per la salute umana e di tutti gli esseri viventi che vengono a contatto queste sostanze.

Sebbene il maggior numero di intossicazioni umane si è verificato a seguito del consumo di acqua contaminata [1], un'intossicazione cronica può verificarsi anche a seguito dell'ingestione di cibo contaminato da tossine cianobatteriche. L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha stabilito un limite di 0.04 µg su kg di peso corporeo al giorno come limite di tollerabilità di microcistine totali [2].

Si è dimostrato che i molluschi giocano un ruolo fondamentale nel trasferimento delle microcistine nell'uomo attraverso il consumo di cibo [3]. In letteratura, tuttavia, vi sono pochi studi sul meccanismo di accumulo di queste sostanze nei molluschi. Questo è legato al fatto che le maggiori fioriture di cianotossine si verificano in acque dolci o zone salmastre e il consumo di mitili proveniente da queste zone è poco diffuso in Europa e Nord America.

Il biota può accumulare le tossine cianobatteriche principalmente attraverso due vie: un trasporto transdermico delle tossine disciolte nell'acqua oppure per ingestione della cellula cianobatterica contenente le tossine [4].

A differenza delle fitotossine marine, la maggior concentrazione di cianotossine si trova nel materiale cellulare posto sulla superficie. In natura, la concentrazione delle microcistine disciolte è elevata in presenza della fioritura algale fluttuante sulla superficie dell'acqua ma un'elevata concentrazione, tale da giustificare l'accumulo negli organismi acquatici, ha vita breve e le tossine vengono disperse per azione delle onde o del vento [4]. Yokoyama e Park [5] hanno concluso che i molluschi accumulano microcistine attraverso l'ingestione di particellato contaminato mentre le tossine disciolte vengono scarsamente accumulate attraverso contatto transdermico.

Chen et al. [6] hanno studiato la dinamica che porta le microcistine all'interno dei molluschi bivalvi, dimostrando come questa sia legata al trasporto lungo la colonna d'acqua delle microcistine intracellulari. Quindi il livello di accumulazione nei molluschi bentonici è regolato dalla concentrazione delle microcistine nelle cellule

cianobatteriche. Le microcistine all'interno dei bivalvi si concentrano nel sistema epatopancreatico e in quello digestivo [7].

Molti studi hanno evidenziato come le tossine cianobatteriche vengano bioaccumulate nel biota acquatico [8,9]. In realtà il termine bioaccumulazione viene spesso usato impropriamente ad indicare la presenza delle tossine all'interno del mollusco. Iberling et al. [10] hanno dimostrato che vi sono scarse evidenze che supportano una bioaccumulazione e una biomagnificazione delle cianotossine negli organismi acquatici. In realtà l'accumulo delle microcistine decorre mediante un processo bifasico aumentando in concentrazione nell'organismo nei primi 4 giorni di esposizione e poi iniziando una lenta depurazione nei giorni successivi, che pur tuttavia porta solo a una piccola rimozione dei composti.

Lo scopo di questo lavoro consiste nella messa a punto di un metodo analitico che permetta la quantificazione di sette microcistine (LA, LR, RR, YR, LF, LW, LY) e della nodularina in una matrice alimentare, quale i molluschi, mediante un sistema HPLC-MS/MS. L'uso di questa tecnica, al contrario dei saggi biochimici, permette di quantificare il singolo congenere e quindi definire la reale tossicità del prodotto alimentare.

I principali aspetti innovativi del metodo proposto sono l'uso dello standard interno nella quantificazione, non ancora utilizzato per questa matrice in letteratura, e l'uso di una procedura preparativa molto semplice in cui venga eliminata la lunga e costosa fase di purificazione SPE.

## ***5.2 Parte sperimentale***

### *5.2.1 Materiali*

Gli standard di microcistine, nodularina e standard interno ENK nonché i solventi sono gli stessi usati nel § 2.2.1.

Sono stati utilizzati delle provette in polietilene da centrifuga da 15 mL (Iwaki), dei filtri siringa in PTFE ( $\phi$  25 mm, 0.45  $\mu$ m) (Phenomenex, Torrence, California, USA) montati su delle siringhe da 10 mL in vetro e delle beute in vetro da 50mL.

I campioni di molluschi sono stati trattati utilizzando un omogeneizzatore T10 basic Ultra-Turrax (IKA, Germany). Il bagno ad ultrasuoni è stato acquistato da Ultrasonic, FALC (Treviglio, Italia). La centrifuga Rotina 38 è stata fornita da Hettich Zentrifugen (Germany).

### *5.2.2 Preparazione del campione*

I molluschi provenienti dalla laguna nord appena pescati sono stati lavati con acqua corrente, sgusciati e conservati in due fogli di alluminio a -20°C.

Una volta riportati a temperatura ambiente, circa 20 g di molluschi sono stati omogeneizzati con l'aiuto di un mortaio e pestello in agata e una piccola quantità (circa 5 g) è stata trattata mediate omogenizzatore Ultra-Turrax, precedentemente decontaminato con acqua e metanolo.

20 mg del campione sono stati posti in una provetta da centrifuga da 15 mL in polietilene, decontaminata con metanolo, e 200 ng assoluti di standard interno ENK sono stati aggiunti al campione fresco. L'estrazione mediante bagno ad ultrasuoni è stata ripetuta due volte per 15 minuti ciascuno aggiungendo rispettivamente 10 mL di metanolo. Ad entrambe le estrazioni è seguita una fase di centrifugazione di 5 minuti a 3000 rpm. Il surnatante ottenuto è stato filtrato con siringa in vetro munita da filtro in PTFE ( $\varnothing$  25 mm, 0.45  $\mu$ m) in una beuta in vetro da 50 mL.

Il campione è stato infine diluito 1:5 in vial ambrata da autocampionatore da 2 mL ed analizzato mediante HPLC-MS/MS come descritto §2.2.

## **5.3 Risultati e discussione**

### *5.3.1 Validazione del metodo*

A causa della mancanza di un materiale di riferimento certificato per la quantificazione delle microcistine nei mitili, la valutazione dell'esattezza, delle rese di estrazione, della ripetibilità e dell'effetto matrice è stata condotta utilizzando una matrice esente dagli analiti alla quale sono state aggiunte delle quantità note di una soluzione contenente le cianotossine (50 ng assoluti) e di una contenente lo standard interno ENK (200 ng assoluti).

È stata valutata la linearità della risposta strumentale utilizzando delle soluzioni contenenti le cianotossine (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 pg  $\mu$ L<sup>-1</sup>) e lo standard interno (2 pg  $\mu$ L<sup>-1</sup>) diluiti nella matrice ottenuta come descritto in §5.2.3.

Le soluzioni così ottenute sono state iniettate ripetutamente (n=3) al fine di valutare come la precisione strumentale venga influenzata dalla matrice. In tabella 5.1 vengono riportati i parametri relativi alle curve di calibrazione ottenute in matrice e quelli della precisione strumentale.

**Tabella 5.1.** Parametri delle curve di calibrazione (m indica la pendenza e q l'intercetta) e della precisione strumentale a quattro livelli di concentrazione

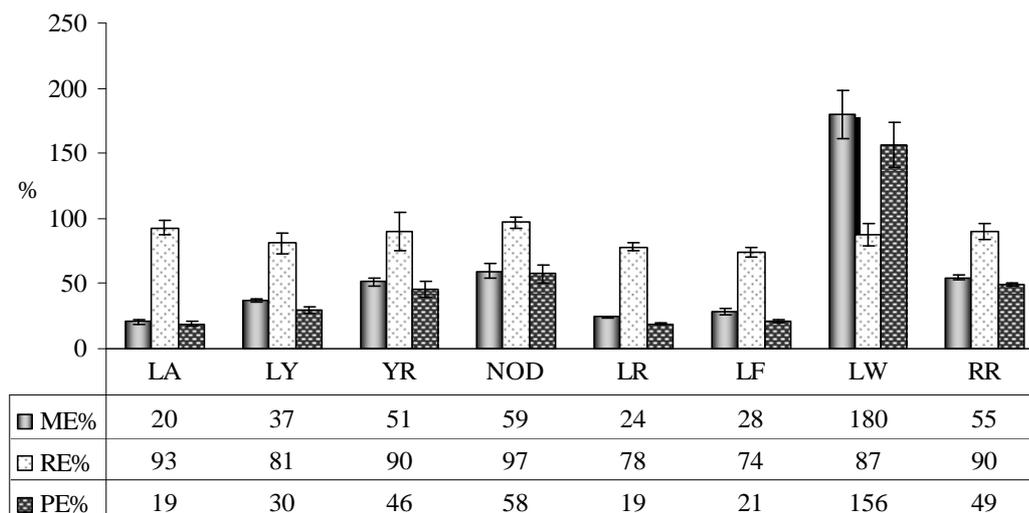
	m	q	R <sup>2</sup>	CV% 0.01 pg $\mu\text{L}^{-1}$	CV% 0.1 pg $\mu\text{L}^{-1}$	CV% 1 pg $\mu\text{L}^{-1}$	CV% 10 pg $\mu\text{L}^{-1}$
<b>MC LA</b>	0.4042	- 0.0182	0.9896	1	7	3	6
<b>MC LY</b>	0.1433	- 0.0103	0.9969	6	8	4	3
<b>MC YR</b>	0.1131	- 0.0048	0.9894	2	1	4	4
<b>NOD</b>	0.1825	- 0.008	0.9937	6	3	8	3
<b>MC LR</b>	0.1437	- 0.0081	0.9938	3	6	3	2
<b>MC LW</b>	0.9587	- 0.1122	0.9875	8	9	6	7
<b>MC LF</b>	0.5987	- 0.0482	0.9963	3	5	3	4
<b>MC RR</b>	0.7297	- 0.0363	0.9918	3	6	1	4

I valori del coefficiente di variazione percentuale (CV%) relativi al rapporto tra l'area del picco delle cianotossine e quella del picco dell'ENK risultano sempre inferiore al 10% (tabella 5.1), dimostrando come la matrice non incida sulla precisione strumentale. Karlsoon et al. [11] hanno condotto degli studi simili sullo sviluppo di un metodo per la determinazione delle cianotossine in tessuti animali e hanno evidenziato come l'analisi ripetuta di matrici estratte in una soluzione 75% metanolo non purificate portasse a delle deviazioni standard percentuali piuttosto elevate, sottolineando la necessità di introdurre una procedura SPE.

Il presente studio dimostra come l'uso di una piccola quantità di matrice (20 mg) diluita in 20 mL di metanolo e quindi ridiluita con acqua alla fine della procedura ha permesso di ridurre l'effetto matrice. Questo è stato possibile grazie all'utilizzo di un metodo strumentale estremamente sensibile descritto nel § 2.2 e all'uso di una SFR preparata in matrice.

L'effetto matrice che si verifica a seguito dell'analisi della matrice ottenuta mediante la procedura descritta nel § 5.2.3 è stato valutato come descritto da Matuszewski et al. [12]. In figura 5.1 si può notare come una quantificazione condotta mediante una curva di calibrazione preparata in acqua ultrapura porterebbe a una sottostima della concentrazione di ogni singola cianotossina ad eccezione della microcistina LW per la quale vi è un innalzamento del segnale. Questi risultati evidenziano come l'uso del metodo di quantificazione *matrix-matched calibration* è fondamentale per garantire un'affidabilità ai risultati. Lo standard interno pur eliminando problemi derivanti da errori casuali non riesce ad eliminare gli effetti matrice. Al fine di garantire un metodo accurato in cui l'effetto matrice venga minimizzato, la quantificazione è stata condotta usando uno standard interno preparato in matrice.

L'efficienza di estrazione viene calcolata dal rapporto tra il valore di concentrazione vero in matrice, ottenuto aggiungendo la soluzione standard dopo il processo di estrazione, e il valore ottenuto dopo l'estrazione. Come si può notare dalla figura 5.1 i valori risultano prossimi al 100%, indicando come l'uso di questa SFR risulti ideale ai fini della quantificazione.



**Figura 5.1.** Valutazione dell'effetto matrice (ME%), dell'efficienza di recupero (RE%) e dell'efficienza del processo (PE%) percentuali relativi all'area delle cianotossine in campioni di mitili processati come descritto in § 5.2.3

La valutazione dell'esattezza della procedura di quantificazione con lo standard interno ENK è stata fatta mediante la stima dell'errore percentuale medio, calcolato come la differenza tra il valore ottenuto e quello realmente aggiunto alla matrice. Alla matrice processata come descritto in § 5.2.3 sono stati aggiunti 50 ng assoluti di una soluzione contenente tutte le cianotossine investigate e 200 ng assoluti della soluzione dello standard interno ENK.

La soluzione dello standard interno invece è stata aggiunta alla fine del processo di filtrazione al fine di valutare la resa del processo preparativo. Le prove di esattezza e di resa riportate in tabella 5.2 sono state ripetute in triplo al fine di valutare la ripetibilità del metodo.

**Tabella 5.2.** Valutazione delle performance del metodo mediante stima dell'errore percentuale, resa e ripetibilità.

	LA	LY	YR	NOD	LR	LW	LF	RR
<b>Errore medio %</b>	4	8	-2	8	9	9	9	9
<b>Resa media %</b>	108 ± 9	107 ± 10	90 ± 3	101 ± 9	87 ± 7	101 ± 7	110 ± 10	100 ± 7
<b>CV%</b>	9	9	3	9	8	7	9	7

La procedura ideata permette di ottenere una quantificazione con il metodo dello standard interno accurata con errori medi percentuali sempre inferiori al  $\pm 10\%$  e la resa del processo risulta prossima al 100%. Questo è stato possibile grazie all'utilizzo di un opportuno solvente estraente posto in largo eccesso rispetto la matrice e alla ripetizione in doppio della procedura estrattiva.

La procedura preparativa risulta ripetibile come evidenziato dai coefficienti di variazione percentuale ottenuto dai replicati delle rese di processo.

I limiti di rilevabilità (MDL) e di quantificazione (MQL) procedurali sono stati valutati analizzando una matrice priva di cianotossine al quale è stata aggiunta una quantità nota (200 ng ass) di standard interno ENK. I valori di MDL e MQL sono calcolati rispettivamente come tre e dieci volte la deviazione standard del bianco procedurale, i cui valori sono riportati in tabella 5.3.

	LA	LY	YR	NOD	LR	LW	LF	RR
<b>Bianco (ng ass)</b>	0.50±0.01	0.56±0.01	3.44±0.01	3.38±0.01	0.59±0.02	0.05±0.01	0.89±0.01	0.30±0.02
<b>MDL (ng ass)</b>	0.04	0.04	0.02	0.03	0.05	0.04	0.02	0.05
<b>MDL (ng/g)</b>	2.21	1.97	1.04	1.72	2.34	2.24	0.99	2.45
<b>MQL (ng ass)</b>	0.15	0.13	0.07	0.11	0.16	0.15	0.07	0.16
<b>MQL (ng/g)</b>	7.35	6.57	3.47	5.75	7.80	7.46	3.31	8.16

I limiti di rilevabilità risultano piuttosto bassi e permettono la quantificazione delle cianotossine a livelli di ng/g, nonostante non venga effettuata nessuna operazione di concentrazione e anzi una diluizione 1 a 5 sia necessaria per diminuire il contenuto in solvente organico nell'iniezione e preservare la ritenzione cromatografica. Karlsoon et al. [11] hanno condotto uno studio nel quale viene riportato un confronto tra un metodo che utilizza la purificazione e pre-concentrazione mediante SPE e uno in cui questa fase viene omessa. I valori di MDL ottenuti nel presente lavoro sono paragonabili al metodo

di Karlsoon et al. [11] che utilizza la purificazione SPE mentre sono nettamente inferiori alla procedura che non la impiega.

Questo sottolinea come il metodo sviluppato possa essere una valida alternativa a un metodo che utilizza la più lunga e costosa procedura SPE.

#### ***5.4 Conclusioni***

È stato messo a punto un metodo quantitativo per la determinazione delle microcistine LA, LY, LR, YR, RR, LW e LF e della nodularina nei mitili mediante HPLC-(-)ESI-MS/MS.

È stata validata una procedura preanalitica molto semplice che consta in un'estrazione e una filtrazione senza l'impiego di una purificazione lunga e costosa. È stata valutato come tale procedura permetta di ottenere dei risultati simili a quelli in cui viene usata l'SPE. L'effetto matrice è stato considerato nella quantificazione mediante l'uso di una soluzione utilizzata per il calcolo del fattore di risposta preparato in matrice.

Questo è il primo lavoro che impiega lo standard interno per la quantificazione delle microcistine e della nodularina in campioni tessutali. La procedura risulta accurata, ripetibile e con alte rese di estrazione. È stato verificato che la precisione strumentale non viene inficiata dall'effetto matrice.

I limiti di rilevabilità procedurali risultano simili e inferiori a quelli riportati in letteratura permettendo di analizzare le microcistine a livelli di ng su g di campione analizzato.

### ***5.5 Riferimenti bibliografici***

- [1] I.R. Falconer, A.M. Beresford, M.T. Runnegar, *The Medical journal of Australia* 1 (1983) 511.
- [2] I. Chorus, J. Bartram, in WHO (Editor), Spon Press, London, 1999.
- [3] D.E. Williams, S.C. Dawe, M.L. Kent, R.J. Andersen, M. Craig, C.F.B. Holmes, *Toxicon* 35 (1997) 1617.
- [4] B.W. Ibelings, I. Chorus, *Environmental Pollution* 150 (2007) 177.
- [5] A. Yokoyama, H.D. Park, *Environmental Toxicology* 18 (2003) 61.
- [6] J. Chen, P. Xie, *Environmental Toxicology and Chemistry* 26 (2007) 1066.
- [7] J. Chen, P. Xie, L.G. Guo, L. Zheng, L.Y. Ni, *Environmental Pollution* 134 (2005).
- [8] A.P. Negri, G.J. Jones, *Toxicon* 33 (1995) 423.
- [9] V.O. Sipia, H.T. Kankaanpaa, S. Pflugmacher, J. Flinkman, A. Furey, K.J. James, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53 (2002) 305.
- [10] B.W. Ibelings, K. Bruning, J. de Jonge, K. Wolfstein, L.M.D. Pires, J. Postma, T. Burger, *Microbial Ecology* 49 (2005) 487.
- [11] K.M. Karlsson, L.E.M. Spoof, J.A.O. Meriluoto, *Environmental Toxicology* 20 (2005) 381.
- [12] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 882.

*II parte*

***LE TOSSINE MARINE:***

*l'acido domoico*



## CAPITOLO 6

### Le tossine marine

Il fitoplancton marino è costituito da microalghe presenti come forme unicellulari oppure raggruppate in piccole colonie di cellule. Questi organismi sono i produttori primari della materia organica e quindi rappresentano il primo anello della catena alimentare acquatica, oltre ad essere dei grandi produttori di ossigeno.

La proliferazione di microalghe si verifica periodicamente in diverse parti del mondo e nel caso in cui questo fenomeno sia associato alla produzione di tossine tale fioritura prende il nome di *harmful algal bloom* [1].

Le microalghe rappresentano la principale fonte di nutrimento per gli organismi che si alimentano per filtrazione dell'acqua di mare come i mitili, le ostriche e i bivalvi in genere. Questi organismi possono quindi accumulare le tossine prodotte dalle microalghe, chiamate fitotossine, nei propri tessuti quando questi vengono in contatto con una fioritura di alghe tossiche e quindi rappresentare una fonte di rischio per la salute umana.

Le fitotossine sono dei metaboliti secondari prodotti dai alcuni dinoflagellati e da alcune diatomee che hanno una grande importanza tossicologica in quanto sono la principale causa di intossicazioni umane legate al consumo di cibo contaminato o all'inalazione di aerosol contenente le tossine [2].

Le fioriture a seconda degli effetti prodotti possono essere distinti in quattro gruppi [1]:

- fioriture che portano a una intensa colorazione dell'acqua a seguito della numerosa presenza di organismi con conseguenti fenomeni di anossia. Sono principalmente dovuti a ceppi di *Noctiluca scintillans* (Dinoflagellati) e *Skeletonema costatum* (Diatomee);
- fioriture di specie produttrici di potenti tossine che possono bioaccumularsi nella rete trofica. I principali ceppi sono *Alexandrium*, *Gymnodinium* e *Dinophysis* (dinoflagellati) e *Nitzschia* e *Pseudonitzschia* (Diatomee);
- fioriture di microalghe tossiche solo per le specie marine quali pesci ed invertebrati. Alcuni esempi sono *Alexandrium tamarense*, *Gyrodinium aureolum*, *Nosularia spumigena*.
- fioriture di specie che producono tossine che possono essere trasportate nell'aerosol atmosferico anche a lunga distanza dal luogo della fioritura. Un esempio è rappresentato da *Gymnodinium breve*.

A seconda degli effetti sull'uomo le tossine prodotte dal fitoplancton marino si suddividono in [3]:

- *Paralytic Shellfish Poisoning* (PSP) comprende un gruppo di più di venti tossine tra cui la saxitossina, neosaxitossina, tetrodotossina, gonyaytossina. I ceppi responsabili di questa contaminazione appartengono al genere *Alexandrium*, *Pyrodinium* e *Gymnodinium* (dinoflagellati). L'intossicazione umana si verifica a seguito dell'ingestione di molluschi, gasteropodi, cefalopodi, crostacei e pesci planctofagi che hanno accumulato queste tossine nei loro tessuti. I sintomi più comuni sono di tipo gastrointestinale e di tipo neurologico. Sono le tossine più pericolose. In Italia il limite per le PSP è di 80 µg per 100 g di mitile edule (D.L. 530/1992).
- *Diarrhetic Shellfish Poisoning* (DPS) comprende tre categorie strutturali di tossine che si suddividono in acide (acido acadaico e derivati DTX), neutre (pectenotossine) e yessotossine. I ceppi tossici vengono prodotti da dinoflagellati quali *Dinophysis*, *Prorocentrum* e *Prorocentrum*. Anche in questo caso l'intossicazione si manifesta a seguito dell'ingestione di molluschi contaminati. Il limite fissato per l'acido acadaico e derivati e per le pectenotossine è di 160 µg per kg di mollusco edule e di 1 mg per kg per le yessotossine (CE 15.03.2002, Dir. 91/492/CE). La sintomatologia si manifesta a livello gastrointestinale e ad oggi non si riportano casi di morte a seguito di questa intossicazione.
- *Neurologic Shellfish Poisoning* (NSP) causato dalle brevetossine, polieteri ciclici liposolubili. I principali organismi produttori appartengono alla specie *Ptychodiscus brevis*, *Gymnodinium breve* (diatomee). In questo caso l'intossicazione, oltre a derivare dal consumo di molluschi contaminati, avviene anche per inalazione di aerosol contenete frammenti di cellule. In Italia non sono ancora stati fissati dei limiti per questo tipo di tossine. I principali sintomi consistono in sensazioni di paralisi alla bocca e alle dita, rallentamento del battito cardiaco e diarrea.
- *Ciguatera Fish Poisoning* (CFP) causato da un esteso gruppo di tossine quali gambiertossine, ostreotossine, scaritossine, ma soprattutto ciguatossine e maitotossina. I ceppi di microalghe che producono tali tossine sono numerosi e tra questi vi sono *Gambierdiscus toxicus*, *Coolia monotis*, *Prorocentrum lima*, *Amphidinium* spp., *Ostreopsis* spp. Numerosi sintomi sono riscontrati in seguito all'ingestione di alimenti marini contaminati tra i quali i maggiori sono a livello gastrointestinali, neurologico e cardiovascolare.

- *Amnesic Shellfish Poisoning* (ASP) legato alla produzione di acido domoico da parte delle diatomee del genere *Nitzschia* o *Pseudonitzschia*. I sintomi si manifestano a livello gastrointestinale e neurologico, portando anche a casi di morte per avvelenamento. In Italia, il limite di tollerabilità per l'acido domoico è 20 µg per g di mollusco edule.

Nonostante le fioriture algali stagionali siano un evento naturale, negli ultimi anni questo fenomeno si è accentuato a seguito di numerosi fattori [4]. Uno delle cause principali è legato al fenomeno dell'eutrofizzazione marina costiera, ovvero dell'arricchimento in nutrienti delle aree costiere. Le sostanze eutrofizzanti incentivano la crescita smisurata delle microalghe con conseguenti problemi di anossia. La proliferazione algale viene nettamente influenzata dal riscaldamento degli oceani, che comporta anche migrazione di alcune specie da certe zone geografiche verso nuove zone. Infine anche le acque di zavorra delle navi vanno considerate dei probabili vettori di plancton marino da una parte all'altra del globo [5].

### **6.1 Amnesic Shellfish Poisoning**

L'Amnesic Shellfish Poisoning è un'intossicazione causata da diatomee del genere *Pseudonitzschia* o *Nitzschia*, le quali producono come metabolita secondario l'acido domoico, sostanza neurotossica.

Le *Pseudonitzschia* sono un genere di diatomee pennate presenti negli ambienti marini e ampiamente diffuse in tutto il mondo. Hanno un tipico colore marrone dorato dato dalla presenza del pigmento fucoxantina e una parete cellulare composta da silicio cristallino che forma una specie di guscio chiamato frustolo. Sebbene la fioritura della maggior parte delle microalghe sia favorita da un aumento nella temperatura dell'acqua, la *Pseudonitzschia* si sviluppa maggiormente quando la temperatura è in calo ed essa può entrare in competizione con altre specie di fitoplancton. Il cambiamento della temperatura provoca un turnover della colonna d'acqua che rompe il termocline e quindi porta l'acqua con una maggiore concentrazione di nutrienti dal basso verso la superficie illuminata, dove le diatomee ne possono trarre vantaggio. Inoltre, le diatomee che hanno la tendenza ad affondare hanno bisogno di un flusso d'acqua turbolento per impedire che escano dalla zona eufotica. Le diatomee del genere *Pseudonitzschia* possono vivere in ambienti con un variabile intervallo di salinità (6-45‰) e questo ne permette la presenza in ambienti di estuario [6].

Il primo caso di intossicazione attribuito a *Pseudonitzschia* è stato registrato nel 1987 in Canada, quando un centinaio di persone hanno manifestato crampi addominali dopo aver consumato mitili raccolti in un allevamento di Prince Edward Island in Cardigan Bay [7]. Negli anni successivi, gli avvelenamenti più frequenti sono stati registrati presso la Baia di Monterey in California [8,9], anche se morie di animali sono state riscontrate anche in altre zone degli Stati Uniti [10] e in Scozia dove è stata vietata la raccolta di molluschi in un'area di circa 50.000 km<sup>2</sup> [11].

### 6.1.1 La produzione di acido domoico

L'acido domoico è un amminoacido neurotossico tricarbossilato che è stato isolato per la prima volta nel 1958 in Giappone dalle macroalghe della specie *Chondria armata* [12].

La produzione di questo metabolita secondario è influenzata da numerosi parametri chimico-fisici quali il pH, la temperatura, l'intensità luminosa, la concentrazione di nutrienti e la presenza di metalli in tracce (ferro e rame).

Bates et al. [13] hanno dimostrato che il silicio è un nutriente non soltanto essenziale per la costruzione del frustolo ma anche per la sintesi del DNA. La quantità di tossina prodotta è inversamente proporzionale alla concentrazione di silicati nell'ambiente. L'assorbimento di silicio avviene nella fase di crescita esponenziale della fioritura algale mentre si interrompe quando la fioritura entra nella fase stazionaria. Vi sono due momenti in cui l'alga produce acido domoico, il primo dei quali corrisponde proprio alla fase stazionaria di crescita in cui i livelli di silicio sono moderatamente bassi mentre il secondo, con una produzione 5 volte maggiore, si verifica quando vi è una forte limitazione di silicio [14].

La produzione di acido domoico può anche essere attivata da una carenza di fosforo, sebbene il meccanismo sia attualmente sconosciuto [15].

La struttura dell'acido domoico risulta simile ad alcuni fitosiderofori, agenti ferro-complexanti che legando il Fe<sup>3+</sup> lo solubilizzano e permettono l'assorbimento diretto del metallo all'interno degli organismi. Rue et al. [16] hanno dimostrato come la produzione della tossina sia legata alla disponibilità di ferro e rame nell'acqua. L'acido domoico aumenta la biodisponibilità del ferro mentre favorisce la disintossicazione delle acque andando a sequestrare efficacemente il rame. È stato verificato inoltre che a concentrazioni limitanti di ferro si ha un aumento nella formazione di acido domoico

mentre per il rame vi è un andamento opposto al ferro [17]. La disponibilità di ferro controlla infine i rapporti in cui vengono assimilate le sostanze nutritive come ad esempio il rapporto Si:N e quindi influenza la riproduzione cellulare delle *Pseudonitzschia* [18].

#### *6.1.2 Il meccanismo d'azione tossica dell'acido domoico*

L'acido domoico è un amminoacido con attività eccitatoria simile a una classe di composti chiamati kainoidi, il cui capostipite è l'acido kainico. L'acido domoico agisce come competitore nei confronti dei recettori dell'acido glutammico e dell'acido aspartico, due dei principali neurotrasmettitori del sistema nervoso centrale, ma l'affinità verso questi recettori risulta molto più elevata, tre volte più elevata del potente acido kainico e fino a cento volte rispetto al glutammato [19]. L'importanza dei recettori del glutammato risiede nella regolazione del passaggio di ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  attraverso i canali della membrana sinaptica con contemporanea espulsione di ioni  $\text{K}^+$  che induce la depolarizzazione dei neuroni. Quando la tossina si lega al recettore la concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta portando a un rigonfiamento e a disfunzione nella cellula, con conseguente morte della stessa. Questo meccanismo spiega in parte gli effetti neurotossici dell'acido domoico [20].

Tuttavia la sintomatologia da ASP non si limita al sistema nervoso ma agisce anche sul sistema digerente anche se qui l'intossicazione risulta molto più blanda rispetto le tossine PSP. Altri sintomi comuni da avvelenamento da ASP sono confusione, nausea, vomito, gastroenterite, crampi e diarrea entro 24 ore dal contatto con la sostanza tossica. Gli effetti da ingestione cronica sono finora sconosciuti [12].

La neurotossicità dell'acido domoico viene magnificata se la sostanza viene assunta attraverso mitili contaminati, in quanto la presenza di acido glutammico e aspartico nei tessuti amplifica gli effetti tossicologici della tossina [21].

## 6.2 Riferimenti bibliografici

- [1] G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson, A.D. Cembella, Manual on harmful marine microalgae, UNESCO, Parigi, 1995.
- [2] A. Zaccaroni, D. Scaravelli, Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection, CNR Institute of Biophysics, Pisa, Italy, 2007.
- [3] P. Ade, E. Funari, R. Poletti, in A.I.S. Sanità (Editor), 2003, p. 53.
- [4] E.M. Cosper, E.J. Carpenter, V.M. Bricelj, Novel phytoplankton blooms: causes and impacts of recurrent brown tides and other unusual blooms, Berlino, 1989.
- [5] F.M. Van Dolah, Environmental Health Perspectives 108 (2000) 133.
- [6] L. Mos, Environmental Toxicology and Pharmacology 9 (2001) 79.
- [7] J.S. Teitelbaum, R.J. Zatorre, S. Carpenter, D. Gendron, A.C. Evans, A. Gjedde, N.R. Cashman, New England Journal of Medicine 322 (1990) 1781.
- [8] K.L. McGinness, G.A. Fryxell, J.D. McEachran, Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie 73 (1995) 642.
- [9] L. Fritz, M.A. Quilliam, J.L.C. Wright, A.M. Beale, T.M. Work, Journal of Phycology 28 (1992) 439.
- [10] K.A. Lefebvre, C.L. Powell, M. Busman, C.J. Doucette, P.D.R. Moeller, J.B. Sliver, P.E. Miller, M.P. Hughes, S. Singaram, M.W. Silver, R.S. Tjeerdema, Natural Toxins 7 (1999) 85.
- [11] J. Fehling, D.H. Green, K. Davidson, C.J. Bolch, S.S. Bates, Journal of Phycology 40 (2004) 622.
- [12] M.C. Villac, D.L. Roelke, T.A. Villareal, G.A. Fryxell, Hydrobiologia 269 (1993) 213.
- [13] S.S. Bates, D.L. Garrison, R.A. Horner, Bloom dynamics and physiology of domoic acid producing *Pseudo-Nitzschia* species, 1998.
- [14] Y.L. Pan, D.V.S. Rao, K.H. Mann, R.G. Brown, R. Pocklington, Marine Ecology-Progress Series 131 (1996) 225.
- [15] Y. Pan, S.S. Bates, A.D. Cembella, Natural toxins 6 (1998) 127.
- [16] E. Rue, K. Bruland, Marine Chemistry 76 (2001) 127.
- [17] M.T. Maldonado, M.P. Hughes, E.L. Rue, M.L. Wells, Limnology and Oceanography 47 (2002) 515.
- [18] D.A. Hutchins, K.W. Bruland, Nature 393 (1998) 561.
- [19] E.C.D. Todd, Journal of Food Protection 56 (1993).
- [20] H. Ravn, Amnesic Shellfish Poisoning (ASP), 1995.
- [21] A. Novelli, J. Kispert, M.T. Fernandezsanchez, A. Torreblanca, V. Zitko, Brain Research 577 (1992) 41.

## CAPITOLO 7

### Messa a punto di un metodo strumentale per la determinazione dell'acido domoico mediante HPLC-MS/MS

#### 7.1 Introduzione

In letteratura vengono riportati numerosi metodi per determinazioni quantitative dell'acido domoico in diverse matrici quali tessuti, acque naturali e biota [1-7].

Saggi biochimici consentono di operare un rapido *screening* di un gran numero di campioni per valutare la presenza di acido domoico con buona accuratezza e bassa incidenza di falsi negativi. I saggi biochimici più usati sono *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) [8-13], ELISA elettrochimico [14], *radioimmunoassay* [8,15], saggi di citotossicità [16,17] e risonanza *surface plasmon* [18-20]. Questi metodi di analisi tuttavia portano spesso a dei falsi positivi a causa della presenza di sostanze interferenti che rispondono al saggio come la tossina. Risulta quindi fondamentale utilizzare un metodo chimico di analisi per confermare la positività all'acido domoico data dai saggi.

I metodi chimici per l'analisi dell'acido domoico utilizzando tecniche cromatografiche accoppiate a diversi tipi di rivelatore: i più comuni sono il rivelatore UV e a fluorescenza, anche se recentemente le tecniche di spettrometria di massa stanno soppiantando tali rivelatori. Determinazioni alternative possono essere condotte mediante tecniche meno diffuse per queste analisi quali cromatografia su strato sottile [21], elettroforesi capillare [22-25] o gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa [26].

La cromatografia liquida accoppiata alla rivelazione ultravioletta (LC-UV) è la tecnica analitica maggiormente diffusa in quanto disponibile nella maggior parte degli istituti di ricerca. La molecola dell'acido domoico infatti è un diene coniugato con assorbanza a una  $\lambda_{\max}$  di 242 nm, facilmente rilevabile con un detector UV. La tecnica LC-UV è suggerita dalla direttiva europea 97/61/CE per la quantificazione della tossina nei molluschi, benché non sia specificata la procedura da seguire anche se la Comunità Scientifica Internazionale ha proposto l'impiego di due metodi preparativi per analizzare l'acido domoico nei mitili [27,28].

La separazione cromatografica diventa un elemento essenziale quando la rivelazione UV viene utilizzata per l'analisi della tossina nei molluschi in quanto sono presenti

numerose specie interferenti che possono limitare la quantificazione a basse concentrazioni. L'interferente più comune è il triptofano, amminoacido a volte presente nei tessuti biologici, il quale presenta un comportamento cromatografico molto simile all'acido domoico. Il limite di rilevabilità della tecnica è di  $30 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$  [29].

La cromatografia liquida accoppiata a un rivelatore a fluorescenza (LC-FLD) è una delle tecniche più sensibile in cui la sensibilità varia a seconda dell'agente derivatizzante impiegato: il 9-fluorenilmetilcloroformiato porta a un limite di rilevabilità di  $15 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$  [30], il 6-aminochinolinil-N-idrossisuccinimideil carbammato un LOD di  $50 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$  [31], il 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzossadiazolo uno di  $1 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$  [32].

La cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa mediante sorgente di ionizzazione electrospray risulta l'unica metodologia di analisi che offra la sensibilità e la specificità necessaria per una determinazione inequivocabile dell'acido domoico e dei suoi isomeri [4,5]. De la Iglesia et al. [1] hanno, tuttavia, dimostrato che una fase inversa con dimensioni di sub- $2\mu\text{m}$  è necessaria per separare l'acido domoico dai suoi isomeri.

Numerosi metodi che utilizzando una cromatografia inversa accoppiata alla spettrometria di massa sono stati sviluppati per la determinazione dell'acido domoico [4,15,29,33], in cui i limiti di rilevabilità risultano confrontabili con quelli ottenuti con la tecnica LC-FLD. Dell'Aversano et al. [34] hanno studiato un metodo cromatografico che utilizza una fase stazionaria HILIC per la separazione di tossine cianobatteriche idrosolubili con un limite di rilevabilità per l'acido domoico di  $3 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ . La cromatografia inversa molto spesso richiede per risolvere questi composti l'utilizzo di agenti di *ion-pairing* con conseguente aumento del rumore di fondo e decremento nella ionizzazione in sorgente ESI. La cromatografia HILIC viene spesso impiegata per l'analisi di composti polari o analiti in cui sono presenti gruppi funzionali carichi [35] e non richiede l'uso di eluenti arricchiti in modificatori organici.

In letteratura la quantificazione dell'acido domoico è condotta utilizzando una retta di calibrazione preparata in un solvente opportuno [29] oppure in matrice al fine di considerare l'effetto matrice [5]. A causa della mancanza di uno standard di acido domoico marcato isotopicamente, in letteratura, a nostra conoscenza nessuno studio è stato sviluppato per determinare l'acido domoico mediante il metodo dello standard interno.

Lo scopo di questo lavoro consiste nello sviluppo di un metodo d'analisi mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa con elevata sensibilità che

impieghi come metodo di quantificazione il metodo dello standard interno. Pertanto parte del lavoro è stato focalizzato sulla ricerca di un analita che potesse fungere da buon standard interno per quantificare l'acido domoico in varie matrici.

## ***7.2 Sviluppo del metodo HPLC-ESI-MS/MS***

L'analisi strumentale è stata eseguita mediante HPLC-ESI-MS/MS. L'analisi cromatografia è stata effettuata utilizzando un cromatografo liquido Agilent 1100 series HPLC system (Agilent, Waldbronn, Germany) dotato di una pompa binaria, degasser, autocampionatore e vano colonna termostato. Tale strumentazione è stata accoppiata ad uno spettrometro di massa con analizzatore a triplo quadrupolo API 4000 (Applied Biosystem, MDS SCIEX, Toronto, Ontario, Canada) dotato di sorgente Turbo V in cui è presente una sorgente Turbo Ion Spray (TIS) e una sorgente APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*).

### ***7.2.1 Materiali***

L'acido domoico (purezza  $\geq 98\%$ ) è stato acquistato da Vinci Biochem (Firenze, Italy) mentre l'acetato idrato della leucina encefalina è stato ottenuto da Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). L'acido deidrocaïnico è stato acquistato da Sigma Aldrich (Steinheim, Germany), mentre la  $^{13}\text{C}$  prolina e il  $^{13}\text{C}_5$ -acido glutammico (purezza  $\geq 98\%$ ) sono stati acquistati da Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Andover, MA).

L'acqua ultrapura è stata prodotta da un sistema presente all'Università di Venezia fornito da Purelab Ultra system: impianto di purificazione Purelab Option R pure water system accoppiato a Purelab Ultra Analytic ultra pure water system (Elga Lab Water, High Wycombe, UK). Il metanolo e l'acetonitrile sono di grado UPS (Ultra Purity solvent per HPLC/MS), forniti dalla Romil Ltd (Cambridge, UK). L'acido formico ad elevata purezza ( $\geq 98\%$ ) specifico per l'uso come additivo nell'eluente in LC-MS è stato acquistato da Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). La colonna impiegata nella separazione cromatografia è ZIC® - HILIC 4,6  $\times$  150 mm, 100 Å (SeQuant AB, Umea, Sweden).

### 7.2.2 Messa a punto del metodo MRM

Lo scopo principale di questo studio è la determinazione di un metodo che permetta di quantificare l'acido domoico a livelli di tracce e sub-tracce utilizzando uno standard interno. Al fine di trovare le condizioni analitiche opportune è stata valutata la sorgente di ionizzazione appropriata. Sia la sorgente ESI (Electrospray ionization) che la sorgente APCI sono state testate ma solo la prima ha portato a una ionizzazione sufficiente a permettere analisi in tracce. Tale sorgente è stata impiegata sia in polarità positiva che negativa per la creazione di due metodi di acquisizione MRM.

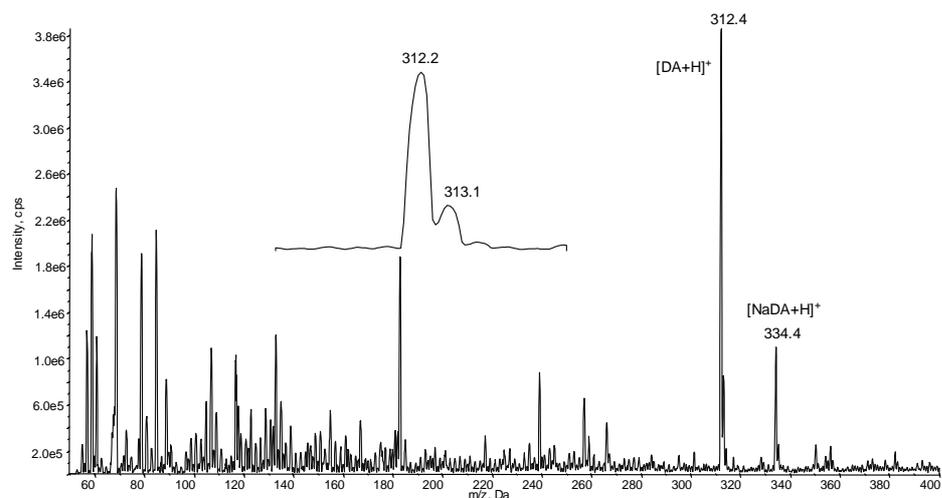
L'acquisizione dei dati è avvenuta con dwell time di 200 ms per ogni transizione. I quadrupoli Q1 e Q3 sono fissati con risoluzione unitari a  $0.7 \pm 0.1$  unità di ampiezza del picco a metà altezza.

La creazione del metodo di acquisizione MRM per lo spettrometro di massa è stata eseguita mediante infusione diretta delle soluzioni standard ad una concentrazione di  $1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  mediante una pompa siringa Model "11" (Harvard Apparatus Inc., Holliston, MA, USA) ad un flusso di  $10 \mu\text{L min}^{-1}$ .

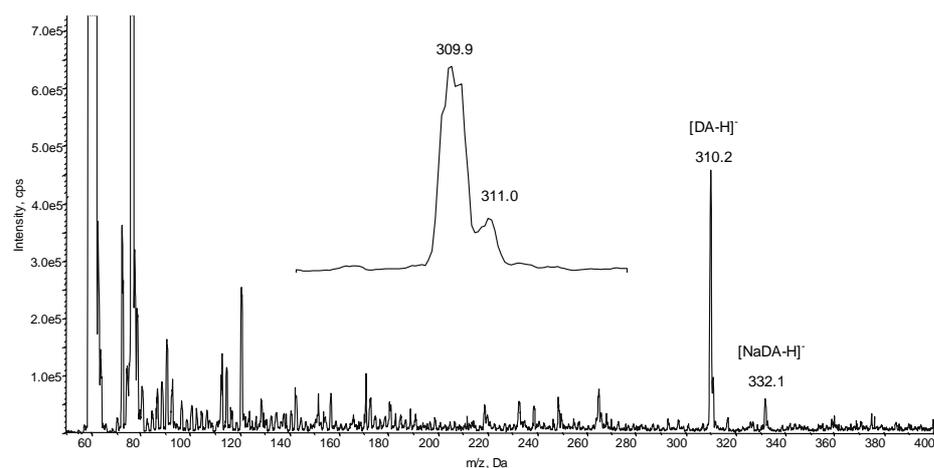
L'identificazione degli ioni precursori è stata ottenuta mediante analisi al primo quadrupolo in modalità *full scan*, ottimizzando i parametri di DP (*Declustering Potential*) e EP (*Entrance Potential*) al fine di ottenere la massima intensità del segnale. In figura 7.1 e 7.2 si riportano gli spettri di massa acquisiti in modalità *full scan* per l'acido domoico, ottenuti applicando rispettivamente un potenziale di ionizzazione positiva e negativa.

Applicando un potenziale positivo si può notare come la protonazione e la formazione del cluster con il sodio siano i principali processi di ionizzazione osservati con un picco base a  $m/z$  312 per la specie  $[\text{M}+\text{H}]^+$  e  $m/z$  334 per la specie  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . Sullo ione protonato sono stati individuati un DP ottimale di 60 V e un EP ottimale di 5 V.

Processo analogo avviene con una ionizzazione negativa dove il picco base risulta essere lo ione deprotonato a  $m/z$  310, pur rimanendo evidente l'addotto con il sodio a  $m/z$  332 che permane anche in ionizzazione negativa in quanto la molecola presenta tre gruppi carbossilici dove il sodio può andare a sostituirsi al protone. DP e EP, ottimizzati per lo ione molecolare, sono rispettivamente -45 e -5 V. Specie bi-cariche o tri-cariche non emergono negli spettri, in cui lo ione principale rimane comunque lo ione molecolare protonato per la ionizzazione positiva e de-protonato per la ionizzazione negativa.



**Figura 7.1.** Spettro di massa positivo dell'acido domoico acquisito nel primo quadrupolo in modalità *full scan* e cluster isotopico dello ione  $[M+H]^+$ .

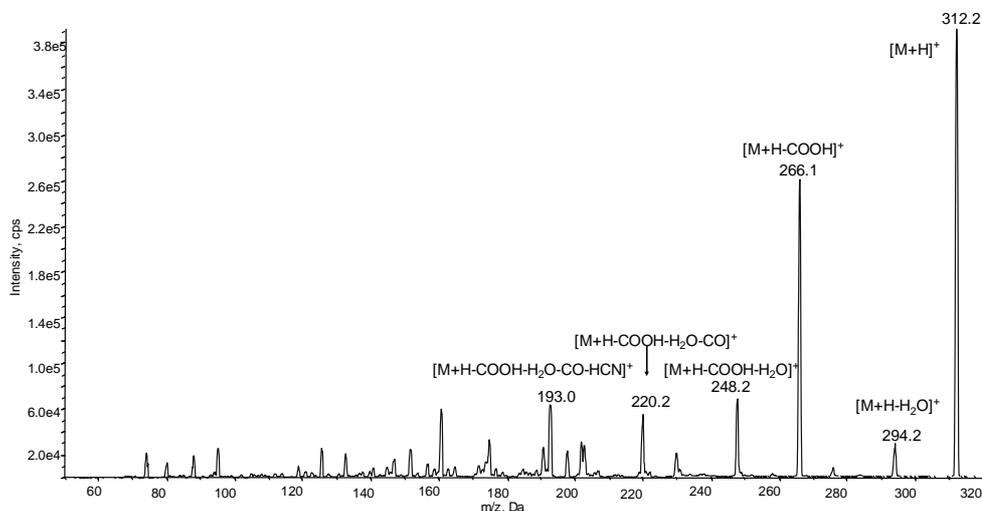


**Figura 7.2.** Spettro di massa negativo dell'acido domoico acquisito nel primo quadrupolo in modalità *full scan* e cluster isotopico dello ione  $[M-H]^-$ .

Per ciascun ione precursore è stato acquisito uno spettro in *full scan* anche con un range di massa di acquisizione di 10 u.m.a. al fine di meglio identificare il valore di  $m/z$  su cui ottimizzare i parametri e poter definire il cluster isotopico caratteristico dello ione precursore (figure 7.1 e 7.2).

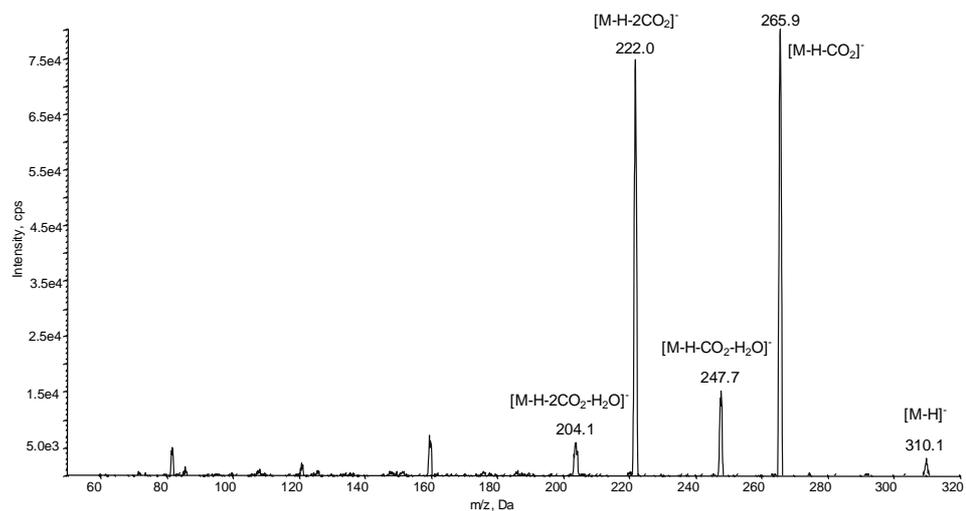
Gli spettri di frammentazione degli ioni precursori sono stati poi registrati in modalità di acquisizione *product ion scan* al fine di individuare i frammenti più intensi e significativi, sui quali sono stati poi ottimizzati i valori di CE (*Collision Energy*) e CXP (*Collision Cell Exit*).

Il pattern di frammentazione prodotto dallo ione  $[M+H]^+$  evidenzia principalmente la perdita di  $H_2O$  e  $CO$  (o  $HCOOH$ ) come si può notare dalla figura 7.3.



**Figura 7.3.** Spettro di frammentazione acquisito in modalità *product ion scan* dello ione  $[M+H]^+$  dell'acido domoico, usando un'energia di collisione di 25eV.

Lo spettro di frammentazione negativo invece riportato in figura 7.4 mostra perdite sequenziali di  $CO_2$  e  $H_2O$ .



**Figura 7.4.** Spettro di frammentazione acquisito in modalità *product ion scan* dello ione  $[M-H]^-$  dell'acido domoico, usando un'energia di collisione di 25eV.

Furey et al. [4] hanno condotto uno studio sul meccanismo di frammentazione dell'acido domoico utilizzando uno spettrometro di massa Finnigan MAT LCQ con sorgente di ionizzazione ESI positiva e analizzatore ion-trap. La possibilità di operare

esperimenti di MS<sup>n</sup> (n=1-5) ha permesso di stabilire un caratteristico pattern di frammentazione ed evitare identificazioni ambigue.

Tale studio è stato utilizzato in questo lavoro per identificare gli ioni prodotto generati dall'applicazione di un'energia di collisione pari a 25eV che ha permesso l'identificazione degli ioni utilizzati poi per la costruzione del metodo MRM.

Quattro frammenti (*m/z* 266, *m/z* 248, *m/z* 220, *m/z* 193) dello ione protonato dell'acido domoico a *m/z* 312 sono stati selezionati per lo sviluppo del metodo (tabella 7.1), escludendo lo ione a *m/z* 294 che corrisponde alla perdita di H<sub>2</sub>O in quanto tale frammento risulta poco selettivo. La transizione MRM a *m/z* 312>266 è stata utilizzata per la quantificazione mentre le altre tre servono per confermare l'eventuale presenza di acido domoico in presenza di interferenze derivanti dalla matrice analizzata. In tal caso è necessario verificare che le abbondanze relative assolute delle varie transizioni concordino del ±20% [36].

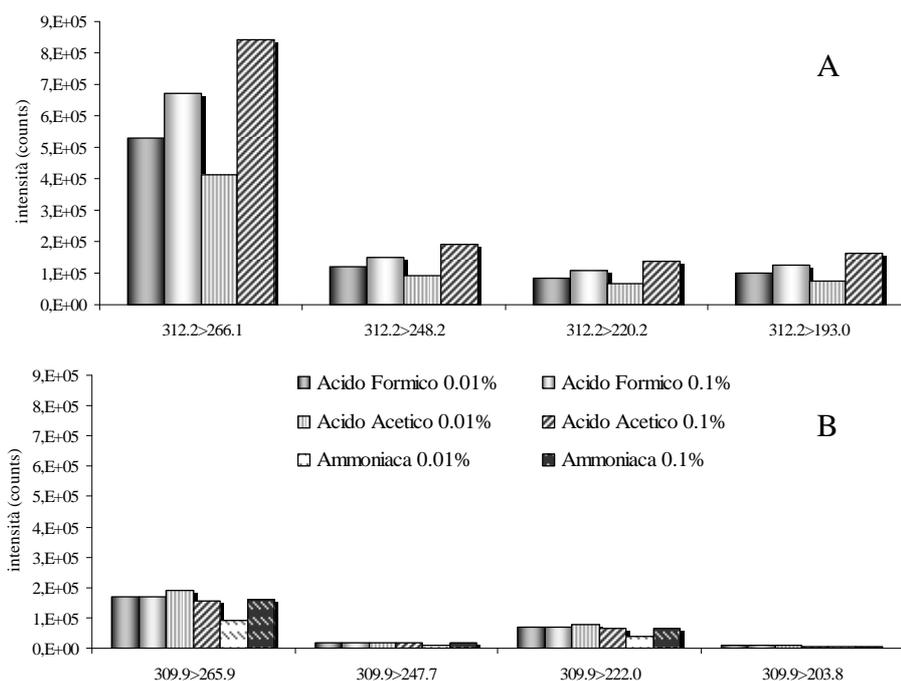
Considerazioni analoghe portano ad utilizzare per lo sviluppo del metodo MRM in polarità negativa quattro frammenti (*m/z* 266, *m/z* 248, *m/z* 222, *m/z* 204) dello ione deprotonato a *m/z* 310 e la transizione 310>266 viene utilizzata per la quantificazione.

Per ciascun frammenti sono stati ottimizzate le energie di collisioni (CE) e il potenziale in uscita dalla cella di collisione (CXP), i cui valori vengono riportate in tabella 7.1.

**Tabella 7.1.** Transizioni monitorate per l'acido domoico e relativi parametri strumentali

Ione precursore	Q1 ( <i>m/z</i> )	Q3 ( <i>m/z</i> )	CE (V)	CXP (V)
[M+H] <sup>+</sup>	312.2	266.1	23.8	7.6
		248.2	23.9	7.0
		220.2	29.0	6.1
		193.0	27.0	17.5
[M-H] <sup>-</sup>	309.9	265.9	-18.0	-12.3
		247.7	-23.0	-13.6
		222.0	-27.0	-10.7
		203.8	-28.0	-12.1

Uno studio teso ad individuare i solventi che portano a una migliore ionizzazione è stato realizzato andando a monitorare l'intensità relativa alle transizioni MRM (tabella 7.1). Soluzioni di acido domoico a una concentrazione di 1 ng μL<sup>-1</sup> sono state preparate diluendo il composto in soluzioni acquose di acido formico 0.01% e 0.1%, acido acetico 0.01% e 0.1% e ammoniacca 0.01% e 0.1%.



**Figura 7.5.** Istogramma relativo alle intensità delle transizioni ottimizzate nei metodi MRM positivo (A) e negativo (B) per soluzioni di acido domoico a  $1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  diluite in diversi solventi.

Come si può notare dalla figura 7.5, la ionizzazione positiva sembra essere favorita rispetto alla negativa. Tuttavia la presenza di acido non pregiudica la formazione dello ione deprotonato, portando anche a risultati simile al mezzo alcalino. Tale comportamento è sempre riconducibile alla presenza delle tre funzionalità acide insite nella molecola. Soluzioni basiche invece portano a soppressione del segnale dello ione protonato. Una più alta concentrazione di acido porta a una maggiore ionizzazione mentre l'acido acetico 0.1% favorisce la ionizzazione rispetto all'acido formico 0.1%. Tali considerazioni permettono di fare delle valutazioni preliminari che dovranno poi essere integrate alla valutazione del comportamento di tali eluenti nella separazione cromatografica.

Appare evidente tuttavia che l'uso di acido alla concentrazione dello 0.1% è preferibile rispetto a concentrazioni inferiori o a soluzioni acquose basiche.

### 7.2.3 Sviluppo del metodo cromatografico

Nel presente studio è stata impiegata una colonna ZIC® - HILIC 4,6 × 150 mm, 100 Å (SeQuant AB, Umeå, Sweden) la cui fase stazionaria è zwitterionica e contiene il gruppo funzionale  $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$  legato a un supporto siliceo.

Nonostante nella fase stazionaria siano presenti dei gruppi ionici si ritiene che la maggior parte delle cariche si annullino vicendevolmente, lasciando solamente deboli interazioni ioniche [35]. La natura polare di questi gruppi rimane però attiva nella formazione di uno strato acquoso necessario alla ripartizione HILIC, meccanismo non del tutto chiaro in cui potrebbe contribuire anche la matrice in silice sottostante.

Le fasi mobili prevedono acqua come fase A e acetonitrile come fase B entrambe acidificate con 0.1% acido formico. Il seguente gradiente di eluizione è stato utilizzato con un flusso di 500  $\mu\text{L min}^{-1}$ : 0-2 min 85% fase B; 5-10 min 15% fase B; 12-20 min 85% fase B. Il comportamento della cromatografia HILIC è simile a quella in fase normale con un aumento della ritenzione dell'analita con alte percentuali di solvente organico.

Nonostante l'acido acetico nell'infusione diretta portasse migliore ionizzazione, non è stato impiegato in quanto portava a fenomeni di *broadening*. L'acido formico alla concentrazione di 0.1% si è dimostrato l'additivo ideale al fine di ottenere una buona ritenzione dell'analita ( $t_R = 8$  min) e una buona efficienza cromatografica.

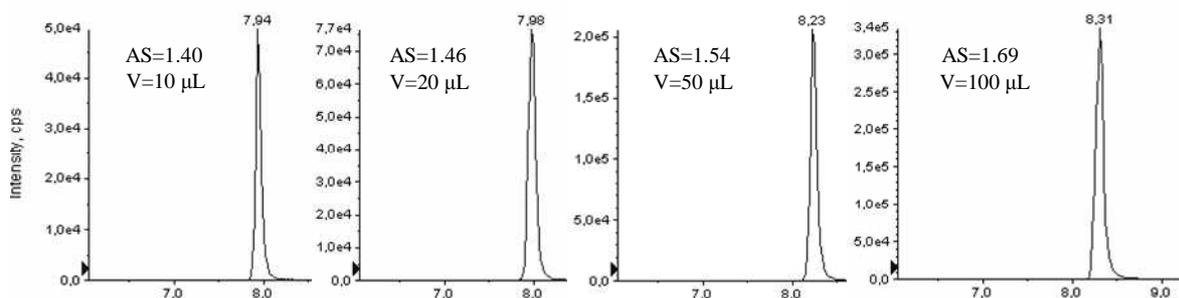
### 7.2.4 Ottimizzazione dei parametri relativi alla sorgente

L'individuazione del tempo di ritenzione e quindi della composizione alla quale l'analita viene introdotto nella sorgente di ionizzazione ha permesso l'ottimizzazione dei parametri della stessa sia in modalità positiva che in modalità negativa. Tale procedura viene condotta in *flow injection analysis* (FIA) in cui una soluzione standard di acido domoico (50  $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$ ) viene iniettata utilizzando l'HPLC senza la colonna alla composizione di fase mobile relativa al tempo di ritenzione dell'analita (15% B) e al flusso di 500  $\mu\text{L min}^{-1}$ . I parametri ottimali individuati mediante FIA prevedono la temperatura della sorgente a 600°C, i valori di gas coassiale (GS1) e a 45° dal probe (GS2) sono 70 e 30 psi mentre il *curtain gas* (CUR) e il *collision activated dissociation* (CAD) rispettivamente 25 e 4 psi. Questi risultano identici sia ionizzando positivamente che negativamente. Il voltaggio applicato sul probe al flusso di solvente in uscita (IS) risulta essere 5500V per la ionizzazione positiva mentre -4500V per quella negativa.

### 7.2.5 Ottimizzazione del volume di iniezione

Al fine di ottenere un limite di rilevabilità più basso è stato valutato il volume di iniezione ottimale.

In figura 7.6 si riporta i picchi relativi alla transizione 312>266 dell'acido domoico ottenuto con il metodo LC-MRM positivo a vari volume di iniezione (10, 20, 50, 100  $\mu\text{L}$ ) di una soluzione di acido domoico in metanolo a una concentrazione di 30  $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$ .



**Figura 7.6.** Cromatogrammi e fattori di asimmetria (AS) relativi alla transizione 312>266 dell'acido domoico ( $30 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ ) a vari volume di iniezione rispettivamente 10, 20, 50, 100  $\mu\text{L}$ .

Per ciascun picco è stato calcolato il fattore di asimmetria (AS) al fine di valutare se l'aumento di volume di iniezione portasse a un sovraccarico in colonna. Il fattore di asimmetria viene calcolato come il rapporto tra le distanze della curva dalla verticale tracciata nel punto di massimo del picco, misurate in corrispondenza del 10% dell'altezza del picco, rispettivamente a sinistra e a destra del punto massimo [37]. Idealmente il fattore di simmetria dovrebbe essere uguale a 1 o comunque vicino ad esso e nel caso in cui sia minore a 1 è presente *fronting* mentre se è maggiore vi è un fenomeno di *tailing*.

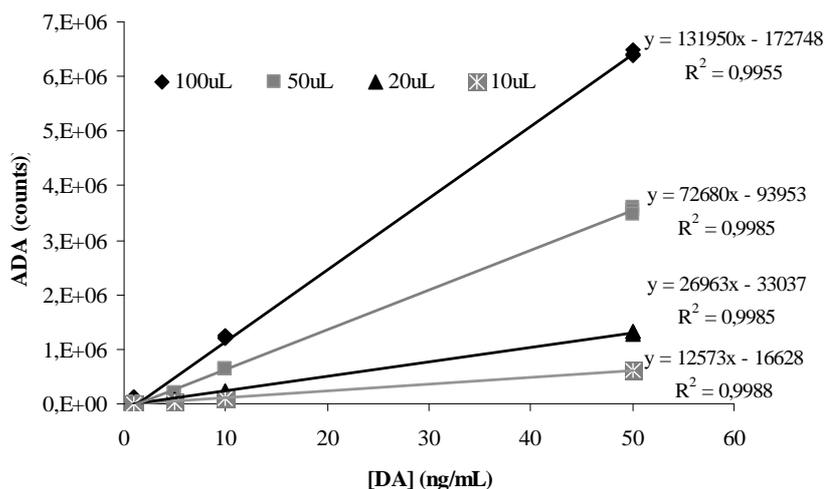
La separazione cromatografica messa a punto in questo lavoro presenta un leggero effetto di *tailing* come dimostrato dai valori di AS, riportati in figura 7.6.

L'aumento del volume di iniezione non comporta un aumento significativo del fenomeno di *tailing*, dimostrando come un volume di 100  $\mu\text{L}$  possa essere un buon compromesso per ottenere bassi limiti di rilevabili senza compromettere la qualità cromatografica.

Il volume di iniezione può essere un parametro critico da considerare anche per la sorgente di ionizzazione electrospray, la quale produce un segnale proporzionale alla concentrazione che aumenta notevolmente con il volume di iniezione. La linearità del segnale è stata valutata variando il volume di iniezione e ripetendo l'analisi di una

stessa concentrazione 3 volte al fine di valutare la precisione strumentale dell'iniezione. I valori di coefficiente di variazione percentuale di ogni punti ad ogni volume di iniezione è sempre stata inferiore al 10%.

In figura 7.7 si riportano il confronto tra le curve ottenute una soluzione di acido domoico in metanolo a quattro concentrazioni diverse (1, 5, 10, 50  $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$ ) per i volumi di iniezione sopra considerati.



**Figura 7.7.** Confronto della linearità del segnale strumentale dell'acido domoico per diversi volumi di iniezione.

Come si può notare l'aumento del volume di iniezione comporta un considerevole aumento della sensibilità dato dal coefficiente angolare delle rette e la linearità viene mantenuta per i volumi di iniezione considerati ( $R^2 > 0.99$ ), confermando come la sorgente riesca ad ionizzare efficacemente anche con un volume di iniezione di 100  $\mu\text{L}$ . Il volume di 100  $\mu\text{L}$  è stato utilizzato nel metodo di analisi in positivo e in negativo mediante HPLC-ESI-MS/MS.

#### 7.2.6 Individuazione dello standard interno

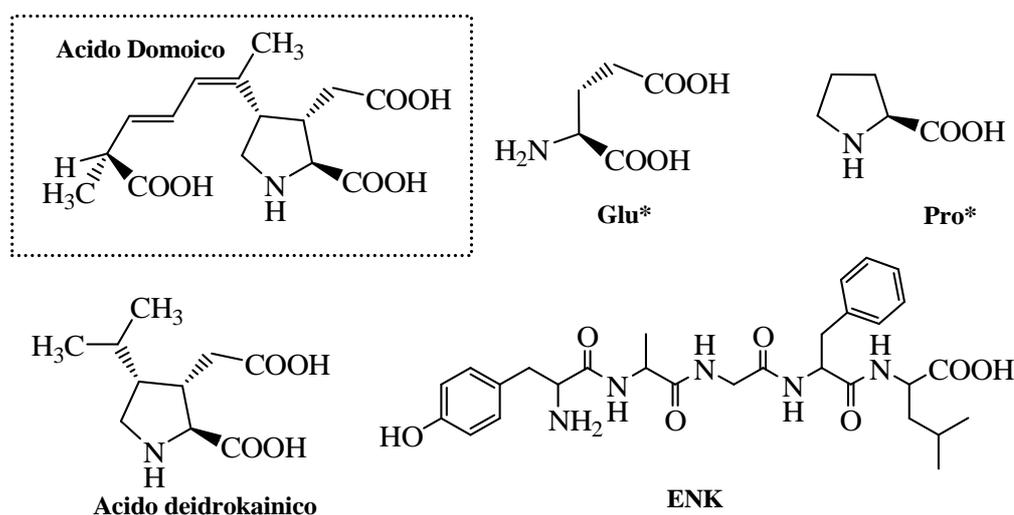
In letteratura la quantificazione dell'acido domoico nelle varie matrici viene condotta utilizzando una curva di calibrazione esterna, mentre il metodo dello standard interno non è stato preso in considerazione a causa della mancanza di uno standard di acido domoico marcato isotopicamente.

Il metodo dello standard interno presenta numerosi vantaggi legati alla possibilità di eliminare le fluttuazioni strumentali durante l'analisi, gli errori casuali dovuti alla procedura pre-analitica di preparazione del campione nonché permette la

quantificazione dell'analita considerando contemporaneamente la resa procedurale. L'uso di una soluzione preparata in matrice a concentrazione nota per il calcolo del fattore di risposta (SFR) permette di considerare anche l'effetto matrice nei campioni reali.

Lo standard interno ideale dovrebbe avere simile struttura chimica, simile comportamento in cromatografia, in spettrometria di massa e nella fase di preparazione del campione.

L'acido domoico (figura 7.8) è un aminoacido molto polare contenente tre funzionalità carbossiliche ( $pK_a$  1.85, 4.47, 4.75) e un gruppo amminico ( $pK_a$  10.60) [38]. È una specie zwitterionica con carica netta zero in un range di pH compreso tra 1.85 e 4.47.



**Figura 7.8.** Strutture chimiche dell'acido domoico e dei possibili standard interni.

Inizialmente le molecole prese in considerazione come standard interno sono state delle molecole, la cui struttura chimica è parte integrante dell'acido domoico: l'acido glutammico (Glu\*), la prolina (Pro\*) e l'acido deidrokaïnico (ADHK). L'acido glutammico e la prolina usati come standard interni sono state le forme marcate in quanto le forme native sono sostanze ubiquitarie e quindi sicuramente presenti nelle vari matrici a cui applicare il metodo, caratteristica non consona per usare le molecole come standard interno.

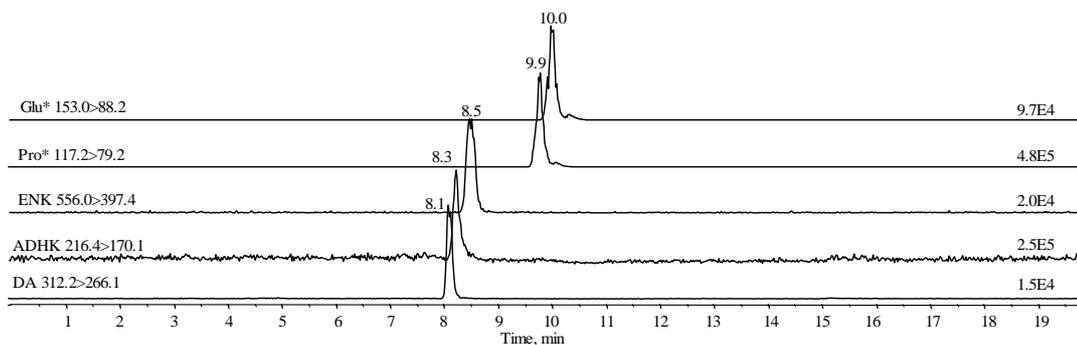
È stato inoltre valutato il comportamento della leucina encefalina (ENK), standard interno usato per le microcistine, in quanto questa molecola presenta numerosi gruppi funzionali acidi e amminici come l'analita studiato.

Per ciascun analita è stata ottimizzato un metodo MRM positivo, individuando lo ione precursore, i relativi frammenti e i potenziali ottimali dell'analizzatore, come descritto per l'acido domoico nel § 7.2.2.

**Tabella 7.2.** Transizioni monitorate in modalità positiva delle molecole studiate come possibili standard interni e relativi parametri strumentali. In grassetto viene riportata la transizione più intensa usata per la quantificazione.

Composto	Q1 ( <i>m/z</i> )	Q3 ( <i>m/z</i> )	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Glu*	153.0	134.9	39	10	13.3	12.0
		<b>88.2</b>	39	10	24.1	7.8
Pro*	117.2	<b>70.2</b>	40	10	24.3	6.0
		68.1	40	10	41	6.0
ADHK	216.4	<b>170.1</b>	62	10	26.1	14.7
		110.0	62	10	34.1	9.7
		425.4	78	5	24.0	13.5
ENK	556.6	<b>397.4</b>	78	5	29.0	12.5
		278.2	78	5	36.0	8.7
		136.0	78	5	54.0	13.2

Utilizzando il metodo cromatografico descritto in § 7.2.3 e i parametri della sorgente ottimizzati (§ 7.2.5) è stato valutato il comportamento strumentale degli analiti confrontandoli con l'acido domoico. Il cromatogramma riportato in figura 7.9 si riferisce all'iniezione di una soluzione contenente acido domoico e i vari possibili standard interni ad una concentrazione di  $10 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ . Tutte le molecole presentano un comportamento cromatografico simile all'acido domoico e vengono ritenuti dalla colonna HILIC con un tempo di ritenzione paragonabile all'analita di interesse. Gli amminoacidi acido glutammico e prolina tuttavia presentano un picco con una piccola impurezza vicina alla coda del picco, mentre la transizione più intensa dell'acido deidrokaninico mostra un alto rumore di fondo.



**Figura 7.9.** Cromatogramma dell'acido domoico e dei possibili standard interni ( $10 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ ).

Per ciascuno standard interno è stata costruita una curva di calibrazione ponendo in ascissa il rapporto tra la concentrazione di acido domoico e quella dello standard interno mentre in ordinata il rapporto tra le loro aree. È stato valutata la linearità del segnale in un range compreso tra i 50 fg  $\mu\text{L}^{-1}$  e i 100 pg  $\mu\text{L}^{-1}$  per quattro concentrazioni (0.1, 1, 10, 100 pg  $\mu\text{L}^{-1}$ ) è stata valutata la precisione strumentale espressa come coefficiente di variazione percentuale, risultato sempre al di sotto del 10%.

**Tabella 7.3.** Confronto della linearità del segnale ottenuto con i possibili standard interni.

	pendenza	intercetta	R <sup>2</sup>	CV% 0.1 pg $\mu\text{L}^{-1}$	CV% 1 pg $\mu\text{L}^{-1}$	CV% 10 pg $\mu\text{L}^{-1}$	CV% 100 pg $\mu\text{L}^{-1}$
Glu*	0.1937	-0.0037	0.9995	8	9	10	1
Pro*	0.0156	-0.0001	0.9996	8	6	2	2
ADHK	0.1820	+0.4146	0.9954	9	6	3	4
ENK	0.0225	-0.0175	0.9985	2	1	1	3

In tabella 7.3 sono stati riportate anche le equazioni delle curve, le quali non possono essere confrontate per valutare la sensibilità dei metodi in quanto le concentrazioni degli standard interni sono diverse (25 pg  $\mu\text{L}^{-1}$  per l'ADHK, 10 pg  $\mu\text{L}^{-1}$  per l'ENK e la Glu\* mentre 5 pg  $\mu\text{L}^{-1}$  per la Pro\*).

Dopo queste considerazioni possiamo concludere che dal punto di vista strumentale tutte e quattro le molecole proposte potrebbero essere utilizzate come standard interno in quanto presentano un comportamento simile in cromatografia e in spettrometria di massa, benché una volta applicate alla valutazione della metodologia pre-analitica di preparazione del campione, l'unico composto che si è dimostrato utile come standard interno è stato la leucina encefalina (capitolo 8).

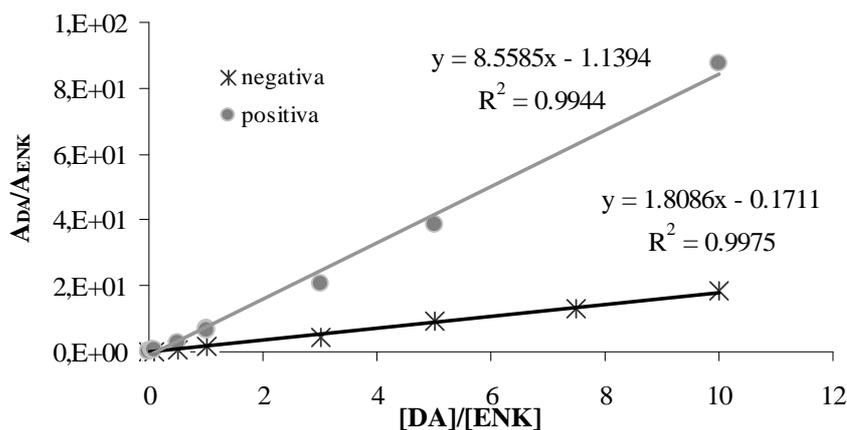
Al fine di confrontare le performance del metodo MRM in polarità positiva con quello in negativo sono stati ottimizzati i parametri MRM dell'ENK anche in modalità negativa e i valori vengono riportati in tabella 7.4.

**Tabella 7.4.** Transizioni monitorate in modalità negativa dello standard interno ENK e relativi parametri strumentali. In grassetto viene riportata la transizione più intensa usata per la quantificazione.

Ione precursore:	Q1 (m/z):	Q3 (m/z):	DP (V):	EP (V):	CE (V):	CXP (V):
		293.0	-97	-5	-40	-12
[ENK-H]-	554.5	<b>236.0</b>	-97	-5	-42	-12
		129.8	-97	-5	-52	-10

### 7.2.7 Linearità della risposta strumentale e limiti di rilevabilità e quantificazione strumentali

La linearità della risposta strumentale con un volume di iniezione di 100  $\mu\text{L}$  è stata valutata utilizzando l'ENK come standard interno sia in modalità di ionizzazione positiva che negativa in un range di concentrazione di acido domoico tra 0.05  $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$  e 100  $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$  mentre lo standard interno ENK è stato mantenuto a una concentrazione costante di 10  $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$ . Si riporta in figura 7.10 il confronto tra le curve di calibrazione ottenute nelle due modalità di ionizzazione dove in ascissa viene riportato il rapporto tra la concentrazione di acido domoico mentre in ordinata il rapporto delle aree. La precisione strumentale come coefficiente di variazione percentuale è stata verificata a tre concentrazioni (0.5, 10, 50  $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$  di acido domoico) ed è risultata sempre inferiore al 5%.



**Figura 7.10.** Confronto tra le curve di calibrazione dell'acido domoico con l'ENK come standard interno in modalità di ionizzazione positiva e negativa.

Come si può notare dalla figura 7.10, la risposta strumentale presenta un coefficiente di regressione superiore a 0.99 e la retta ottenuta in modalità positiva presenta un coefficiente angolare più alto rispetto quella negativa ad indicare un sensibilità maggiore.

I limiti di rilevabilità (LOD) e quantificazione (LOQ) strumentali sono stati definiti come la concentrazione di acido domoico in metanolo alla quale si ottiene rispettivamente un rapporto segnale/rumore di 3 e 10 [39]. Ionizzandosi positivamente, l'acido domoico presenta un LOD di 9  $\text{fg } \mu\text{L}^{-1}$  e un LOQ di 30  $\text{fg } \mu\text{L}^{-1}$ , mentre in

modalità negativa i valori sono rispettivamente 19 e 63 fg  $\mu\text{L}^{-1}$  con un volume di iniezione di 100  $\mu\text{L}$ .

Se confrontati con i valori di LOD riportati in letteratura i valori trovati in questo lavoro con una ionizzazione in polarità positiva sono inferiori ai 15 fg  $\mu\text{L}^{-1}$  riportati da Pocklington et al. [30] e ai 20 fg  $\mu\text{L}^{-1}$  di de la Iglesia et al. [1], ai 50 fg  $\mu\text{L}^{-1}$  di Sun e Wong [31] e al 1 pg  $\mu\text{L}^{-1}$  di James et al. [32], e anche in polarità negativa, nonostante sia leggermente meno sensibile alla positiva, porta a un LOD spesso più basso di quelli riportati in letteratura ottenuti con metodi fluorimetrici o di spettrometria di massa [32,40].

### **7.3 Conclusioni**

È stato messo a punto un metodo sensibile per la determinazione dell'acido domoico usando un sistema accoppiato di cromatografia liquida ad elevate prestazione e spettrometria di massa con analizzatore a triplo quadrupolo mediante una sorgente di ionizzazione electrospray.

La cromatografia utilizzata impiega una fase stazionaria HILIC zwitterionica con un diametro di 4.6 mm che ha permesso l'iniezione di un volume di 100  $\mu\text{L}$ , al fine di abbassare il limite di rilevabilità strumentale.

I parametri relativi allo spettrometro di massa sono stati ottimizzati sia utilizzando sia una modalità di ionizzazione positiva che negativa ottenendo due metodi di analisi ad elevata sensibilità. Il limite di rilevabilità strumentale ottenuto è infatti risultato inferiore ai metodi fino ad oggi presenti in letteratura per la ionizzazione positiva mentre molto simile per la ionizzazione negativa.

Un aspetto innovativo di questo metodo è stata l'individuazione di uno standard interno, la leucina encefalina, al fine di ottenere un dato quantitativo molto più accurato rispetto a quanto finora ottenuto impiegando la quantificazione con la retta di calibrazione esterna. Il metodo dello standard interno permette infatti di eliminare oltre gli errori strumentali dovute a fluttuazioni del segnale anche errori dovuti all'operatore.

Il metodo strumentale verrà quindi applicato a numerose matrici reali al fine di dimostrarne l'applicabilità.

#### 7.4 Riferimenti bibliografici

- [1] P. de la Iglesia, G. Gimenez, J. Diogene, *Journal of Chromatography A* 1215 (2008) 116.
- [2] A. Lopez-Rivera, B.A. Suarez-Isla, P.O. Eilers, C.G. Beaudry, S. Hall, M.F. Amandi, A. Furey, K.J. James, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381 (2005) 1540.
- [3] T. Kubo, M. Nomachi, K. Nemoto, T. Sano, K. Hosoya, N. Tanaka, K. Kaya, *Analytica Chimica Acta* 577 (2006) 1.
- [4] A. Furey, M. Lehane, M. Gillman, P. Fernandez-Puente, K.J. James, *Journal of Chromatography A* 938 (2001) 167.
- [5] P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, G.S. Magno, L. Tartaglione, M.A. Quilliam, A. Tubaro, R. Poletti, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19 (2005) 2030.
- [6] L.L. Mafra, Jr., C. Leger, S.S. Bates, M.A. Quilliam, *Journal of chromatography. A* 1216 (2009) 6003.
- [7] E.R. Tor, B. Puschner, W.E. Whitehead, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003) 1791.
- [8] H. Newsome, J. Truelove, L. Hierlihy, P. Collins, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 47 (1991) 329.
- [9] D.S. Smith, D.D. Kitts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (1995) 367.
- [10] K. Kawamura, I. Suzuki, Y. Fujii, O. Watanabe, *Naturwissenschaften* 81 (1994) 502.
- [11] P. Branaa, J. Naar, M. Chinain, S. Pauillac, *Bioconjugate Chemistry* 10 (1999) 1137.
- [12] M.P. Kreuzer, M. Pravda, C.K. O'Sullivan, G.G. Guilbault, *Toxicon* 40 (2002) 1267.
- [13] J.A. Maucher, J.S. Ramsdell, *Toxicon* 45 (2005) 607.
- [14] L. Micheli, A. Radoi, R. Guarrina, R. Massaud, C. Bala, D. Moscone, G. Palleschi, *Biosensors & Bioelectronics* 20 (2004) 190.
- [15] J.F. Lawrence, C. Cleroux, J.F. Truelove, *Journal of Chromatography A* 662 (1994) 173.
- [16] L. Beani, C. Bianchi, F. Guerrini, L. Marani, R. Pistocchi, M.C. Tomasini, A. Ceredi, A. Milandri, R. Poletti, L. Boni, *Toxicon* 38 (2000) 1283.
- [17] F. Leira, C. Alvarez, A.G. Cabado, J.M. Vieites, M.R. Vieytes, L.M. Botana, *Analytical Biochemistry* 317 (2003) 129.
- [18] M. Lotierzo, O.Y.F. Henry, S. Piletsky, I. Tothill, D. Cullen, M. Kania, B. Hock, A.P.F. Turner, *Biosensors & Bioelectronics* 20 (2004) 145.
- [19] Q.M. Yu, S.F. Chen, A.D. Taylor, J. Homola, B. Hock, S.Y. Jiang, *Sensors and Actuators B-Chemical* 107 (2005) 193.
- [20] R.C. Stevens, S.D. Soelberg, B.-T.L. Eberhart, S. Spencer, J.C. Wekell, T.M. Chinowsky, V.L. Trainer, C.E. Furlong, *Harmful Algae* 6 (2007) 166.
- [21] M.A. Quilliam, K. Thomas, J.L. Wright, *Natural toxins* 6 (1998) 147.
- [22] A.L. Nguyen, J.H.T. Luong, C. Masson, *Analytical Letters* 23 (1990) 1621.
- [23] J.Y. Zhao, P. Thibault, M.A. Quilliam, *Electrophoresis* 18 (1997) 268.
- [24] A. Gago-Martinez, J.M. Leao, N. Pineiro, E. Carballal, E. Vaquero, M. Nogueiras, J.A. Rodriguez-Vazquez, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 83 (2003) 443.
- [25] A. Gago-Martinez, N. Pineiro, E.C. Agnete, E. Vaquero, M. Nogueiras, J.M. Leao, J.A. Rodriguez-Vazquez, E. Dabek-Zlotorzynska, *Journal of Chromatography A* 992 (2003) 159.
- [26] S. Pleasance, M.A. Quilliam, A.S.W. Defreitas, J.C. Marr, A.D. Cembella, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 4 (1990) 206.
- [27] M.A. Quilliam, M. Xie, W.R. Hardstaff, *Journal of Aoac International* 78 (1995).
- [28] A. International, in P. Cunniff (Editor), *AOAC International*, Gaithersburg, MA, USA, 1997, p. 2.

- [29] P. Hess, S. Gallacher, L.A. Bates, N. Brown, M.A. Quilliam, *Journal of Aoac International* 84 (2001) 1657.
- [30] R. Pocklington, J.E. Milley, S.S. Bates, C.J. Bird, A.S.W. Defreitas, M.A. Quilliam, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 38 (1990) 351.
- [31] T. Sun, W.H. Wong, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (1999) 4678.
- [32] K.J. James, M. Gillman, M. Lehane, A. Gago-Martinez, *Journal of Chromatography A* 871 (2000) 1.
- [33] C. Hummert, A. Ruhl, K. Reinhardt, G. Gerdts, B. Luckas, *Chromatographia* 55 (2002) 569.
- [34] C. Dell'Aversano, G.K. Eaglesham, M.A. Quilliam, *Journal of Chromatography A* 1028 (2004) 155.
- [35] A.J. Alpert, *Journal of Chromatography* 499 (1990) 177.
- [36] L.Y.T. Li, D.A. Campbell, P.K. Bennett, J. Henion, *Analytical Chemistry* 68 (1996) 3397.
- [37] Z. Papai, T.L. Pap, *Journal of Chromatography A* 953 (2002) 31.
- [38] J.A. Walter, D.M. Leek, M. Falk, *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* 70 (1992) 1156.
- [39] D.M. Bliesner, *Validating chromatographic methods A Practical Guide*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2006.
- [40] M. Namikoshi, F.R. Sun, B.W. Choi, K.L. Rinehart, W.W. Carmichael, W.R. Evans, V.R. Beasley, *Journal of Organic Chemistry* 60 (1995) 3671.

## CAPITOLO 8

### Determinazione di acido domoico nell'acqua di mare

#### 8.1 Introduzione

L'acido domoico è una neurotossina marina prodotta da molte specie di diatomee marine del genere *Pseudo-nitzschia*, causa dell'avvelenamento amnesico di molluschi.

I molluschi sono una delle matrici più importanti da monitorare per verificare la presenza della tossina nel comparto ambientale. Tuttavia non è ancora del tutto chiarito il ruolo dell'acido domoico disciolto nelle acque e la distribuzione della tossina nella catena trofica.

L'analisi dell'acido domoico nell'acqua di mare non è ancora molto frequente in quanto devono essere sviluppati metodi molto sensibili (a livello di tracce) per la determinazione della tossina, che durante il bloom algale si trova a una concentrazione dell'ordine di poche parti per bilione (ppb = mg mL<sup>-1</sup>). Busse et al. [1] hanno determinato un massimo di concentrazione di acido domoico di 2.33 ppb in campioni di acqua di mare in prossimità della costa sud della California in presenza del bloom algale. Nel giugno del 1998 si è verificato presso la baia di San Francisco e Monterey, il più consistente fenomeno di fioritura algale tossica mai registrato fino ad oggi; in quell'occasione sono stati registrate concentrazioni di tossina superiori a 7.3 ppb, con conseguenti morie di numerosi mammiferi marini [2]. L'analisi di campioni di acqua raccolti in prossimità delle coste orientali del Canada ha dimostrato la presenza di acido domoico in concentrazioni variabili tra i 0.3 e 5.8 ng mL<sup>-1</sup> [3].

L'analisi delle biotossine nei molluschi bivalvi è preferita in quanto gli organismi tendono ad accumulare la tossina aumentandone la concentrazione che può essere più facilmente rivelata. Tuttavia se pur complessa, l'analisi nel comparto acquoso può aiutare a meglio definire il destino della tossina nel sistema acquatico. A tale scopo sono stati sviluppati alcuni metodi ad elevata sensibilità i cui limiti di rilevabilità variano tra 0.01 e 0.06 ng mL<sup>-1</sup> [3-6]. In generale la tecnica maggiormente utilizzata per la determinazione dell'acido domoico nell'acqua di mare è la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (HPLC-MS/MS) oppure con rivelatore fluorimetrico (HPLC-FLD) con derivatizzazione pre o postcolonna. Il rivelatore UV è stato raramente usato per l'analisi dell'acido domoico in campioni di acqua [3] anche se

un particolare metodo è stato sviluppato da Elena Vera-Avila et al. [6] in cui viene utilizzata una estrazione SPE on-line seguita da rivelazione UV.

L'interfaccia electrospray dello spettrometro di massa è molto sensibile all'effetto sale. L'iniezione diretta di un campione con un alto contenuto salino come l'acqua di mare porta a bassa ionizzazione, ad una diminuzione della sensibilità strumentale e del range dinamico lineare e ad una contaminazione dello spettrometro di massa a causa dell'accumulazione di sali derivante dal campione [7,8].

Chan et al. [9] hanno sviluppato un metodo per l'estrazione quantitativa dell'acido domoico dalle acque marine e la rimozione delle interferenze legate alla presenza di sali usando un fase stazionaria assorbente in titanio amorfo prima della derivatizzazione per l'analisi mediante HPLC-FLD.

Campioni con un'alta forza ionica (50-200 mM) richiedono una diluizione prima dell'introduzione nella colonna cromatografica oppure l'eliminazione dei composti che fluiscono in testa alla corsa cromatografica mediante *switching valve* prima dell'entrata nella sorgente di ionizzazione dello spettrometro di massa [10]. Altre procedure di purificazione del campione includono estrazioni in fase solida a scambio anionico forte [11] o estrazione in fase solida in fase inversa C18 come per i campioni di molluschi [12].

L'estrazione SPE in fase inversa è la procedura più comune per rimuovere i sali mentre gli analiti più idrofobici rimangono fortemente legati alla fase stazionaria. L'acido domoico presenta tre funzionalità acide (pKa 1.85, 4.47 e 4.75) e una amminica (pKa 10.60) [13] e a seconda del pH la molecola può assumere delle cariche complessive che variano tra -3 e 1. Al pH dell'acqua di mare (~ 8) tutti i gruppi funzionali dell'acido domoico sono carichi, attribuendo al composto una grande idrofilicità che rende difficoltosa un'estrazione mediante SPE in fase inversa. Wang et al. [4] hanno sviluppato una procedura di trattamento del campione mediante SPE in fase inversa per eliminare l'effetto dei sali e preconcentrare l'analita abbassando così il limite di rilevabilità. Un altro metodo di estrazione dell'acido domoico dall'acqua salina è stato sviluppato da de la Iglesia et al. [5] e prevede l'uso di dischi filtranti contenenti una fase stazionaria C18 che sequestra durante la filtrazione la tossina presente nell'acqua.

Lo scopo di questo lavoro consiste nello sviluppo di una procedura preanalitica per la determinazione dell'acido domoico nell'acqua di mare a bassi livelli di concentrazione. È stato studiato il miglior standard interno che permetta un'accurata determinazione quantitativa della tossina. Questo è il primo studio che usa questo metodo di

quantificazione in quanto nessuno standard marcato isotopicamente è disponibile in commercio e in letteratura sono riportati solo quantificazioni condotte mediante retta di calibrazione esterna costruita in solvente puro o nella matrice ottenuta dal trattamento del campione [3-5].

La procedura preanalitica è stata valutata in termini di recupero dell'analita e accuratezza nella quantificazione; l'effetto matrice è stato quantificato mediante il metodo di Matuszewski et al. [14] confrontando i risultati trovati applicando sia una ionizzazione positiva che quella negativa.

Il metodo validato è stato applicato a 28 campioni di acqua di mare provenienti dal mare di Ross (Antartide) al fine di valutare la presenza dell'acido domoico nella zona polare. La scelta di questo sito di campionamento ha l'obiettivo di individuare la tossina in un luogo in cui non vi siano fenomeni di eutrofizzazione che ne possono influenzare la produzione. I fattori che portano alla produzione della tossina non sono del tutto chiariti e la presenza delle diatomee produttrici non implica necessariamente la secrezione dell'acido domoico.

Al fine di applicare il metodo validato e verificare la presenza dell'acido domoico in un ambiente soggetto a fenomeni di eutrofizzazione, sono stati analizzati anche 21 campioni raccolti nella laguna di Venezia. La presenza delle diatomee del genere *Pseudo-nitzschia* è già stata verificata in questo ambiente [15] ma ad oggi a nostra conoscenza non vi sono studi che verifichino l'eventuale presenza di acido domoico nella matrice lagunare.

## **8.2 Parte sperimentale**

### *8.2.1 Campionamento nel mare di Ross (Antartide)*

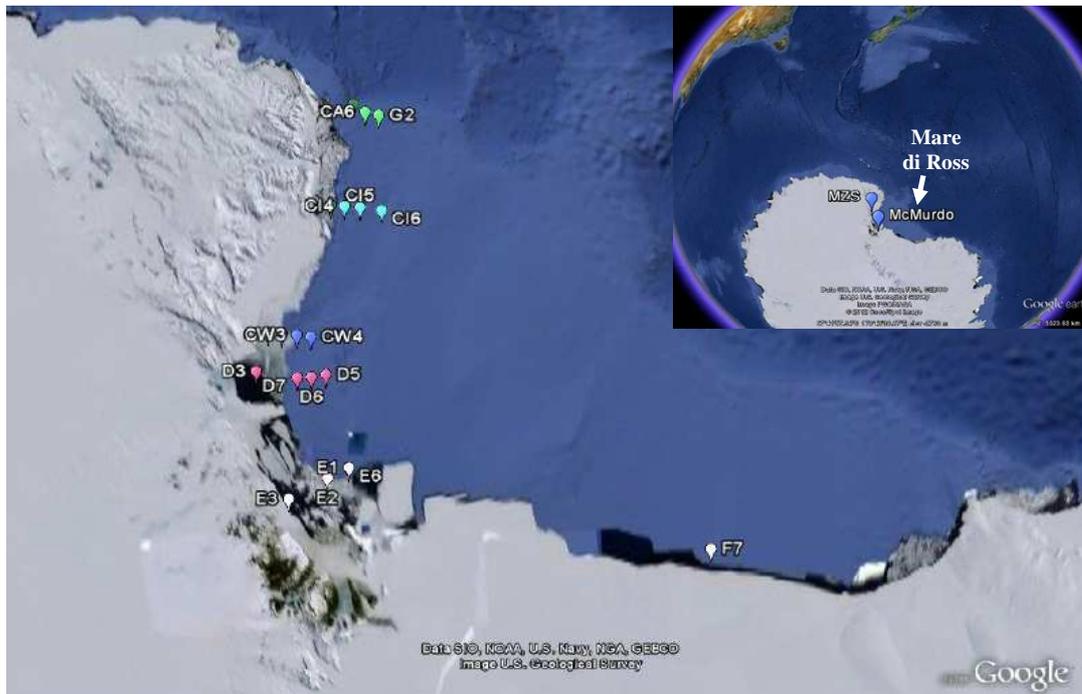
La metodologia preparativa messa a punto in questo lavoro è stata applicata a 28 campioni campionati nel mare di Ross situato nei pressi del continente antartico.

I campioni sono stati prelevati presso nave Italice durante la campagna oceanografica della XXVII Spedizione in Antartide (2011/12) del Programma Nazionale Ricerche in Antartide.

Il campionamento è stato effettuato mediante *rosette* composta da 24 bottiglie Niskin da 12 L e una sonda SBE9/11 plus (SeaBird Electronics) dotata di doppi sensori di temperatura e conducibilità, sensore di ossigeno, fluorescenza, trasmittanza e altimetro. Il sistema permette di ottenere dei profili in tempo reale in funzione della pressione ed

azionare da remoto la rosette per chiudere la bottiglia per il campionamento dell'acqua alla quota desiderata.

Durante la chiusura della bottiglia vengono memorizzati tutti i parametri chimico-fisici associati alla quota della chiusura, utili per l'associazioni future dopo l'analisi dell'acqua del campione.



**Figura 8.1.** Distribuzione spaziale dei punti di campionamento presso il mare di Ross.

In ogni punto di campionamento sono state prelevate tre aliquote di acqua di mare nel punto di massima fluorescenza, parametro che fornisce un'indicazione della presenza di biomassa. Una prima aliquota è stata subito filtrata su un unico filtro in fibra di vetro GF/F (il volume viene riportato in tabella 8.1) e filtro e filtrato sono stati analizzati per la determinazione dell'acido domoico e trattati come descritto in § 8.2.3. Una seconda aliquota da 500 mL è stata campionata per la determinazione dei nutrienti nel caso in cui vi fossero state delle concentrazioni di acido domoico sopra il limite di rilevabilità. Una terza aliquota da 1 L è stata fissata con formalina 4% come previsto dal metodo ISPRA per la conta fitoplanctonica [16,17].

In quattro punti è stata prelevata anche un'aliquota di campione sopra e un'altra sotto il massimo di fluorescenza al fine di verificare l'eventuale presenza di fenomeni diffusi della tossina.

**Tabella 8.1.** Caratteristiche dei punti di campionamenti nel mare di Ross e volume filtrato su filtro in fibra di vetro (GF/F) per la determinazione dell'acido domoico nella frazione particellata.

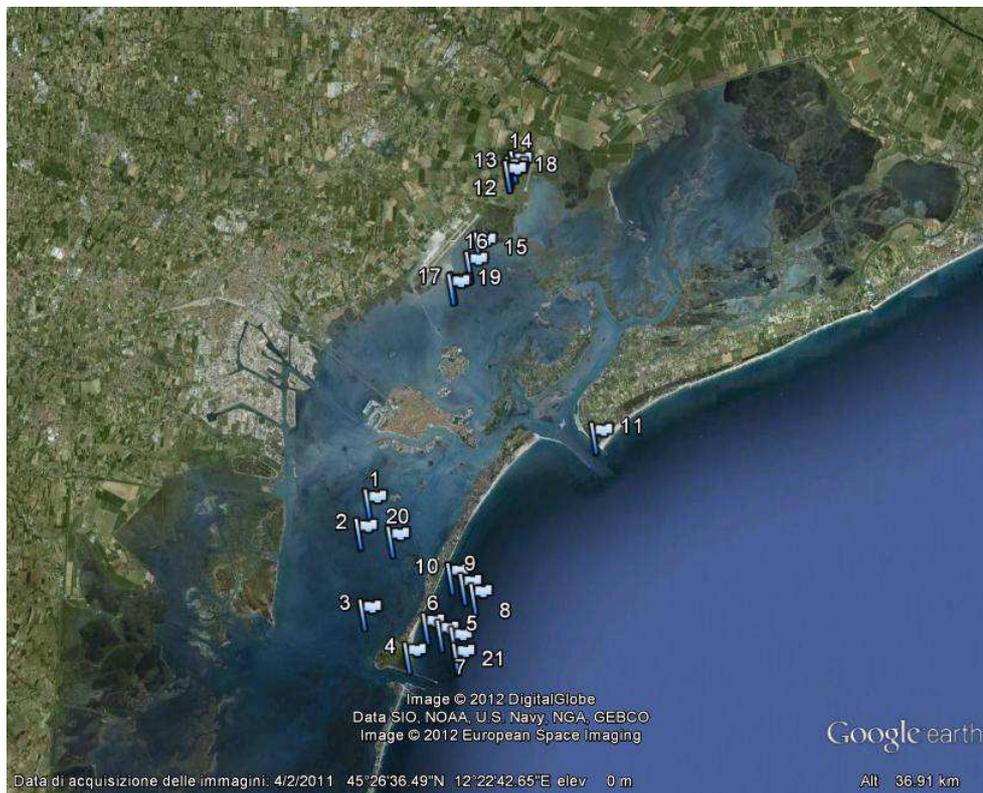
sito di campionamento	coordinate	data e ora locali	profondità (mt)	volume filtrato su GF/F (mL)
G2	72°23.56' S 172°58.20' E	26/01/12 20.44	50	1800
CA5	72°10.86' S 172°04.59' E	27/01/12 02.35	50	1800
CA6	72°18.86' S 172°27.86' E	27/01/12 00.20	85	1800
CI3	73°22.94' S 170°08.07' E	28/01/12 08.35	50	1950
CI4	73°26.18' S 170°41.71' E	28/01/12 10.35	50	1810
CI5	73°30.04' S 171°19.94' E	28/01/12 12.40	38	1950
CI6	73°36.24' S 172°12.24' E	28/01/12 15.00	48	1900
CW1	74°42.85' S 165°43.93' E	01/02/12 01.28	29	2050
CW2	74°46.91' S 166°19.42' E	01/02/12 03.05	28	2075
CW3	74°51.54' S 166°58.52' E	01/02/12 06.15	22	2000
CW4	74°55.99' S 167°35.54' E	01/02/12 08.25	15	2075
D5	75°26.97' S 167°42.76' E	01/02/12 17.38	10	2250
D6	75°25.58' S 166°59.71' E	01/02/12 20.45	10	1800
			2	1900
D7	75°22.66' S 166°19.79' E	01/02/12 23.25	10	1800
			60	1800
			5	1925
D3	75°08.09' S 164°33.36' E	02/02/12 12.33	18	1975
			112	1900
F7	78°20.80' S 173°07.84' W	04/02/12 17.17	108	2000
			1.5	1900
E1	76°40.02' S 167°20.16' E	06/02/12 13.30	12	1950
			70	1950
E2	76°42.69' S 166°02.85' E	06/02/12 16.00	29	1900
		06/02/12 21.47	1	1900
E3	76°48.06' S 163°39.69' E	06/02/12 21.47	29	2000
		06/02/12 21.47	70	2000
E6	76°39.94' S 167°18.46' E	08/02/12 10.31	20	2000

### 8.2.2 Campionamento nella laguna di Venezia

La procedura pre-analitica messa a punto in questo lavoro è stata applicata a 21 campioni prelevati nella laguna di Venezia, nel tratto di mare adiacente alla laguna e nelle zone di interfase mare-laguna al fine di verificare la presenza dell'acido domoico e di studiarne la distribuzione spaziale in tale ambiente.

I primi diciassette campioni sono stati campionati il 19 luglio 2012 mentre gli ultimi quattro sono stati prelevati l'8 agosto per verificare la distribuzione a distanza di alcune settimane.

La distribuzione spaziale dei campioni viene presentata in figura 8.2 e nella tabella 8.2 vengono riportati le caratteristiche relative a ciascun campione.



**Figura 8.2.** Punti di campionamento presso la laguna di Venezia

**Tabella 8.2.** Punti di campionamento nella laguna di Venezia e relativi parametri chimico fisici. Le frecce (↑) e (↓) indicano l'andamento di marea.

campioni	coordinate		luogo	ora e marea	T (°C)	pH
1	45°23'45.14"N	12°18'33.01"E	laguna	9.30 (↑)	27	8.3
2	45°23'04.31"N	12°18'14.98"E	laguna	9.45 (↑)	27	8.2
3	45°21'10.80"N	12°18'23.29"E	laguna	10.00(↑)	29	8.2
4	45°20'10.39"N	12°19'51.89"E	porto di Malamocco	10.30 (↑)	28	8.2
5	45°20'41.76"N	12°20'56.50"E	mare	10.45 (↑)	28	8.4
6	45°20'51.64"N	12°20'28.14"E	mare	10.50 (↑)	29	8.2
7	45°20'32.35"N	12°21'23.11"E	mare	11.00 (↑)	28	8.3
8	45°21'32.80"N	12°22'02.57"E	mare	11.15 (↑)	28	8.2
9	45°21'46.98"N	12°21'41.80"E	mare	11.20 (↑)	28	8.2
10	45°22'01.81"N	12°21'16.60"E	mare	11.25 (↑)	27	8.3
11	45°25'19.13"N	12°26'01.54"E	porto di Lido	12.10 (↑)	29	8.2
12	45°31'27.48"N	12°23'10.20"E	fiume Dese	14.00 (↓)	30	8.0
13	45°31'33.66"N	12°23'12.90"E	fiume Dese	14.05 (↓)	30	7.8
14	45°31'41.70"N	12°23'21.78"E	fiume Dese	14.07 (↓)	30	8.0
15	45°29'47.10"N	12°22'10.20"E	laguna interna	14.30 (↓)	30	8.2
16	45°29'19.80"N	12°21'53.16"E	laguna interna	14.40 (↓)	30	8.0
17	45°28'49.74"N	12°21'21.42"E	laguna interna	14.45 (↓)	31	8.1
18	45°31'27.48"N	12°23'10.38"E	fiume Dese	10.39 (↑)	31	8.0
19	45°28'48.30"N	12°21'18.12"E	laguna interna	11.05 (↑)	31	8.3
20	45°22'53.10"N	12°19'18.48"E	laguna	11.48 (↑)	31	8.2
21	45°20'09.08"N	12°21'28.25"E	mare	12.11 (↑)	31	8.2

I campioni sono stati prelevati nella zona fotica ad una profondità di circa un metro mediante una pompa ad immersione. I campioni sono stati conservati in una bottiglia di polietilene precedentemente lavata con acqua ultrapura e metanolo e avvinata con il campione.

In ciascun punto di campionamento sono state prelevate due aliquote di campione da 2L e poste a 4°C fino al momento della filtrazione, avvenuta nella stessa giornata del campionamento per preservare la speciazione tra frazione disciolta e frazione particellata.

La prima aliquota è stata filtrata mediante un unico filtro in fibra di vetro GF/F (porosità 0.7 µm) e il filtro e il filtrato sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'analisi per la determinazione dell'acido domoico mediante il metodo strumentale descritto nel capitolo 7.

Della seconda aliquota 500 mL sono stati filtrati su filtri in esteri misti di cellulosa (porosità 0.2  $\mu\text{m}$ ) per la determinazione delle clorofille mediante estrazione del filtro e analisi dei nutrienti dal filtrato. Filtro e filtrato sono stati conservati a  $-20^\circ$  fino al momento dell'analisi.

### *8.2.3 Materiali*

Lo standard di acido domoico e dell'ENK e i solventi sono gli stessi descritto nel § 7.2.1.

Per l'analisi della frazione disciolta sono stati impiegate delle cartucce SPE Oasis HLB da 6 cc, 200 mg di fase stazionaria (Waters), dei matracci in vetro da 500 mL, vial da stoccaggio in vetro ambrato da 7 mL (Supelco) e delle vial ambrate da autocampionatore da 2 mL (Agilent Technologies).

Sono stati impiegati dei filtri in fibra di vetro GF/F (Whatman Maidstone, Kent, UK) per raccogliere la frazione particellata dell'acqua di mare. Tali filtri sono stati estratti utilizzando delle provetta da ultracentrifuga Safe-Lock da 2 mL (Eppendorf AG, Amburgo, Germania), dei filtri in PTFE con porosità 2  $\mu\text{m}$  (Phenomenex, Torrence, California, USA) montati su delle siringe in polietilene da 6 mL. È stato impiegato un bagno ad ultrasuoni acquistato da Ultrasonic, FALC (Treviglio, Italia).

### *8.2.4 Preparazione del campione*

Una volta campionata l'acqua di mare è stata immediatamente filtrata su filtri su fibra di vetro GF/F con porosità 0.7  $\mu\text{m}$  e le due frazioni sono state conservate separatamente a  $-20^\circ\text{C}$  e trasportate in Italia dove sono state trattate per l'analisi dell'acido domoico.

La frazione acquosa filtrata conservato in bottiglie in polietilene è stato riportato a temperatura ambiente e quindi posto in un matraccio da 500 mL al quale sono stati aggiunti 10 mL di acido formico e 50 ng assoluti di standard interno ENK. Al campione viene applicata una procedura di estrazione in fase solida (SPE) al fine di preconcentrare e di rimuovere i sali che potrebbero interferire nella sorgente di ionizzazione ESI.

La fase stazionaria impiegata per l'estrazione SPE è la OASIS HLB prodotta da Waters, che è composta da un materiale siliceo sul quale sono presenti dei gruppi lipofilici e idrofilici brevettati. La procedura prevede un primo lavaggio con 5 mL di metanolo seguito da un condizionamento con 5 mL di acqua ultrapura e quindi il caricamento

sotto vuoto (-0.4/-0.5 bar) dei 500 mL del campione precedentemente preparato. Un lavaggio con 5 mL di acqua ultrapura precede un'eluizione con 5 mL di metanolo. L'estratto così ottenuto è stato analizzato mediante HPLC-ESI-MS/MS come descritto nel capitolo 7.

I filtri in fibra vetro riportati a temperatura ambiente sono stati finemente suddivisi in una provetta da ultracentrifuga e 45 ng assoluti di ENK sono stati aggiunti prima dei 1.5 mL di una miscela 1:1 acqua/metanolo usata come solvente estraente. L'estrazione viene condotta per 30 minuti a temperatura ambiente su bagno ad ultrasuoni e l'estratto viene quindi filtrato su filtri in PTFE da 0.2 µm su una vial da autocampionatore. Il campione così ottenuto è stato analizzato mediante il metodo descritto nel capitolo 7.

#### *8.2.5 Analisi delle clorofilla a e dei nutrienti*

La clorofilla a è utilizzata come indicatore di biomassa autotrofa in quanto rappresenta il pigmento indispensabile per il processo di fotosintesi per tutti gli organismi autotrofi e costituisce l'1-2% del peso secco della sostanza organica delle alghe. Dalla misura della clorofilla a è possibile risalire al contenuto di sostanza organica utilizzando opportuni fattori di conversione. Il rapporto tra carbonio organico e clorofilla varia tra le specie e in funzione delle condizioni ambientali e fisiologiche; ad esempio in ambiente marino tale rapporto è compreso tra 23-79.

Il metodo d'analisi della clorofilla utilizzato in questo lavoro è quello spettrofotometrico [18], particolarmente indicato in acque ad elevata trofia.

Il filtro in esteri misti di cellulosa viene estratto con una miscela 90:10 acetone/acqua e la concentrazione viene determinata tramite lettura dell'assorbanza. A pH acido la clorofilla a perde un atomo di magnesio dal nucleo porfirinico e si converte quantitativamente in feofitina a.

L'analisi dei fosfati, nitriti, silicati e ammoniaca sono state condotte come descritto nel § 4.2.4, mentre i nitrati sono stati determinati mediante il kit Spectroquant 1.14942.0001 fornito dalla Merck (Darmstadt, Germany). Il range di applicabilità di questo kit varia tra 0.2 e 17.0 mg L<sup>-1</sup>.

#### *8.2.6 Analisi del fitoplancton*

I campioni appena raccolti su bottiglia in polietilene oscurata con alluminio sono stati fissati con formalina e sono stati studiati secondo il metodo descritto da Utermöhl [19]

mediante un microscopio rovesciato Leitz DMIRB. Per ogni campione proveniente dalla laguna di Venezia sono stati fatti sedimentare da 5 a 10 mL per 24 ore in appositi cilindri di sedimentazione, mentre un volume di 75 mL per 48 ore è stato utilizzato per i campioni antartici. Il materiale depositato per gravità è stato raccolto in una vaschetta che poi è stata osservata al microscopio con l'ingrandimento 640x e poi con l'ingrandimento 320x. In entrambi i casi, si è proceduto alla classificazione ed al conteggio dei vari taxa microalgali. Conoscendo il volume fatto sedimentare, l'area di campo e l'area della superficie interna della vaschetta di sedimentazione, si è potuto stimare la quantità di organismi per volume d'acqua unitario (cellule per litro).

### **8.3 Risultati e discussione**

Lo scopo principale di questo lavoro consiste nello sviluppo di un metodo quantitativo per la determinazione dell'acido domoico nell'acqua di mare mediante standard interno. In letteratura a nostra conoscenza non si riportano metodi in cui viene usato questo sistema di quantificazione mentre viene utilizzato la *matrix matching calibration* [3-5]. Nel capitolo 7.2.6 è stato verificato come l'acido glutammico e la prolina marcati, l'acido deidrocaïnico e la leucina encefalina siano dei buon standard interni dal punto di vista strumentale. Tuttavia l'uso di questi composti nella procedura pre-analitica comporta delle sostanziali differenze.

La frazione disciolta dell'acido domoico, determinata sul filtrato, necessita una fase di estrazione in fase solida SPE al fine di rimuovere i sali e preconcentrare la tossina, presente nell'acqua di mare a livelli di tracce.

Una prima fase stazionaria C18- MAX 6cc (Grace Italia) è stata testata utilizzando 10 mL di campione acidificato contenente acido domoico (167 ng assoluti) e tutti gli standard interni studiati (167 ng assoluti), seguendo la procedura messa a punto da Wang et al. [4]. Si può notare come tutti gli standard interni valutati dimostrino delle caratteristiche completamente diverse dal campione e quindi non possono essere usati per la quantificazione.

Fasi stazionarie a scambio cationico (SCX) e anionico (SAX) commercializzate da Alltech sono state valutate seguendo i protocolli suggeriti dalla ditta ma anche in questo caso gli standard interni non permettono una quantificazione accurata.

Torr et al. [20] suggerisce l'uso di una fase stazionaria HLB (Waters) per estrarre l'acido domoico dalle urine e dal siero secondo una procedura che prevede

un'acidificazione al 2% e un'eluizione con una miscela 1:1 acqua/metanolo. Tuttavia è stato verificato sperimentalmente che tale procedura non permette la ritenzione di composti polari quali gli amminoacidi o l'acido deidrocaïnico che quindi non possono essere usati come standard interni. La leucina encefalina (ENK) invece viene ritenuta da questa fase stazionaria come dimostrato nel capitolo 4.

È stato quindi necessario adattare il protocollo di estrazione per poter eluire l'acido domoico e l'ENK con alti recuperi e quindi utilizzare l'ENK come standard interno per la quantificazione.

Cong et al. [21] hanno investigato la percentuale di una miscela acqua metanolo per l'estrazione dell'ENK dalla cartuccia HLB riportando come una percentuale superiore al 60% sia necessaria per ottenere il totale recupero del composto, condizione indispensabile affinché l'ENK possa essere usata come standard interno. Nonostante una miscela 50% metanolo sia sufficiente per l'eluizione dell'acido domoico, è stato verificato sperimentalmente con un volume di caricamento di 10 mL di campione che eluendo con metanolo puro lo standard interno viene eluito completamente con alte rese anche per l'acido domoico.

Una volta definita la fase stazionaria e il protocollo di estrazione, è stato operato uno *scale-up* passando da una fase stazionaria di 60 mg a una di 250 mg e da un volume di caricamento del campione di 10 mL a 500 mL al fine di abbassare i limiti di rilevabilità procedurali.

La procedura analitica per la determinazione dell'acido domoico nella frazione particellata prevede invece l'estrazione del filtro mediante ultrasuoni. Sono stati investigate diverse miscele metanolo/acqua tra il 100% e il 50% di metanolo e la resa di estrazione più alta è stata ottenuta con una miscela 1:1 acqua/metanolo.

Le procedure di preparazione dei campioni per l'analisi dell'acido domoico nella frazione disciolta e in quella particellata sono le stesse di quelle utilizzate per l'analisi delle cianotossine, permettendo quindi di utilizzare uno stesso campione per l'analisi di più tossine.

### 8.3.1 Validazione del metodo

La validazione della procedura pre-analitica è stata condotta mediante la stima dell'accuratezza, della precisione, del recupero, dei bianchi procedurali e dei limiti di rilevabilità (MDL) e di quantificazione (MQL) procedurali.

I campioni sono stati analizzati sia in modalità positiva che negativa per verificare le performance dei due metodi strumentali messi a punto nel capitolo 7 e valutare se un diverso effetto matrice, chiaramente presente nelle due diverse ionizzazioni, porti a diversi risultati.

Poiché in commercio non è disponibile un materiale di riferimento certificato per l'analisi dell'acido domoico nell'acqua di mare, l'intera validazione è stata realizzata aggiungendo acido domoico a una matrice: acqua salmastra prelevata nella laguna di Venezia in cui sono stati verificati i bianchi procedurali.

La quantificazione della tossina prevede l'uso dello standard interno e le concentrazioni di acido domoico sono state corrette per il fattore di risposta calcolato dall'analisi di una soluzione a concentrazione nota preparata in matrice (SFR) al fine di eliminare fluttuazioni legate al segnale e minimizzare l'effetto matrice.

Per quanto riguarda la frazione disciolta in cui è prevista l'estrazione SPE, la SFR è stata preparata aggiungendo gli standard prima dell'estrazione, prendendo in considerazione così le differenze nei recuperi tra lo standard interno e l'analita di interesse. Per utilizzare questo tipo di fattore di risposta è stato necessario verificare che i recuperi di acido domoico e di ENK fossero costanti al variare della concentrazione iniziale della tossina. Sono stati quindi iniettate ripetutamente 3 soluzioni a diversa concentrazione di acido domoico (0.5, 10 e 50 pg  $\mu\text{L}^{-1}$ ) e concentrazione costante di ENK (10 pg  $\mu\text{L}^{-1}$ ) preparate aggiungendo gli standard prima dell'estrazione SPE e analizzate sia in modalità positiva che negativa. Ponendo in ascissa il rapporto tra le concentrazioni e in ordinata quello tra le aree si ottiene una retta di equazione  $y=9.8802+0.3889$  ( $R^2 = 0.9996$ ) per la modalità di ionizzazione in polarità positiva e una retta di equazione  $y= 0.95+0.0319$  ( $R^2=0.9988$ ) per quella in polarità negativa. In ciascun punto è stata verificata la ripetibilità dell'analisi con un coefficiente di variazione percentuale sempre inferiore al 10%.

Per la frazione particellata la SFR è stata ottenuta diluendo gli standard a concentrazione nota nella matrice ottenuta dal protocollo di estrazione di filtri bianchi.

La stima dell'accuratezza e del resa percentuali sono state condotte a tre livelli di concentrazione di acido domoico sia per la frazione disciolta (5, 100 e 500 fg  $\mu\text{L}^{-1}$ ) che per quella particolata (0.75, 15 e 75 ng assoluti) mantenendo una concentrazione costante di standard interno (100 fg  $\mu\text{L}^{-1}$  per la frazione disciolta e 45 ng assoluti per la particellata) e ciascuna prova è stata ripetuta in triplo per verificare la ripetibilità delle procedure. Mentre per il calcolo dell'errore percentuale acido domoico e ENK vengono

aggiunti all'inizio delle procedure descritte nel § 8.2.4, per la valutazione del recupero lo standard interno viene aggiunto alla fine della procedura.

Si riporta in tabella 8.3 i valori di errore percentuale, le rese percentuali ottenute con il metodo dello standard interno e quelle ottenute con le rette preparate in matrice (§ 8.3.2) per la frazione disciolta ottenuti con le due modalità di ionizzazione.

Le rese percentuali ottenute con il metodo dello standard interno sono state calcolate quantificando l'acido domoico rispetto allo standard interno posto alla fine della procedura mentre il calcolo della resa con la retta di calibrazione esterna è stato fatto quantificando l'acido domoico posto all'inizio della procedura con la retta di calibrazione esterna e poi confrontando il valore ottenuto con il valore reale aggiunto all'inizio della procedura. La resa percentuale viene calcolata ponendo in rapporto il valore quantificato con i due metodi e il valore reale moltiplicato per cento.

La stima dell'errore percentuale invece viene calcolata come differenza tra il valore trovato e il valore reale diviso per il valore reale e moltiplicato per cento.

**Tabella 8.3.** Parametri relativi alla validazione della procedura per la determinazione dell'acido domoico nella frazione disciolta dell'acqua di mare applicando le due modalità di ionizzazione.

		POSITIVA		NEGATIVA	
<b>Accuratezze</b>					
	[DA]quantificata	fg $\mu\text{L}^{-1}$	Errore %	fg $\mu\text{L}^{-1}$	Errore %
[DA] teorica					
	5 fg $\mu\text{L}^{-1}$	5.1±0.1	3	5.1±0.2	2
	100 fg $\mu\text{L}^{-1}$	109±2	9	107±5	7
	500 fg $\mu\text{L}^{-1}$	503±4	1	501±2	1
<b>Rese con standard interno</b>					
	[DA]quantificata	fg $\mu\text{L}^{-1}$	Resa %	fg $\mu\text{L}^{-1}$	Resa %
[DA] teorica					
	5 fg $\mu\text{L}^{-1}$	3.1±0.2	61	3.4±0.1	69
	100 fg $\mu\text{L}^{-1}$	56±2	57	61±1	61
	500 fg $\mu\text{L}^{-1}$	316±4	61	350±1	69
<b>Rese con retta in matrice</b>					
	[DA]quantificata	fg $\mu\text{L}^{-1}$	Resa %	fg $\mu\text{L}^{-1}$	Resa %
[DA] teorica					
	5 fg $\mu\text{L}^{-1}$	2.3±0.2	45	2.7±0.8	57
	100 fg $\mu\text{L}^{-1}$	57±1	58	55±7	59
	500 fg $\mu\text{L}^{-1}$	328±9	66	364±5	73

Confrontando le rese percentuali ottenute con il metodo dello standard interno e quelle con la retta di calibrazione esterna preparata in matrice si può notare come i risultati siano confrontabili. Le rese di estrazione dell'acido domoico mediante la procedura SPE hanno valori attorno al 60% e risultano confrontabili nei tre valori di concentrazione con i quali è stata fatta la validazione, dimostrando come il metodo sia applicabile ad un ampio *range* di concentrazione. Inoltre non si notano delle significative differenze nei due sistemi di ionizzazioni.

Le misure sono inoltre ripetibili come evidenziato dalle basse deviazioni standard nonché dai coefficienti di variazione percentuali che si sono dimostrati sempre inferiori al 10%.

La procedura di preparazione del campione studiata in questo lavoro ha lo scopo principale di permettere di quantificare l'acido domoico con il metodo dello standard interno. In letteratura [3,4,9,22], vi sono alcuni metodi preparativi in cui vengono ottenuti dei valori di resa attorno al 90% e questo aspetto è fondamentale nel caso venga usato come metodo di quantificazione la retta di calibrazione esterna. Nel nostro caso nonostante si ottengano rese più basse (circa 60%) la quantificazione con lo standard interno permette degli errori percentuali molto bassi in quanto lo standard interno subisce le stesse perdite dell'analita in oggetto. Inoltre la grande sensibilità del metodo strumentale messo a punto nel capitolo 7 permette di ottenere un metodo molto sensibile anche se la preparativa comporta una resa più bassa di quella riportata in letteratura.

La procedura preanalitica studiata in questo lavoro risulta molto accurata con un errore percentuale medio tra le tre concentrazioni validate del 4% per il metodo positivo e del 3% per il metodo negativo.

La stessa procedura di validazione è stata condotta per la frazione particellata e i valori ottenuti sono riportati in tabella 8.4.

**Tabella 8.4.** Parametri relativi alla validazione della procedura per la determinazione dell'acido domoico nella frazione particellata dell'acqua di mare applicando le due modalità di ionizzazione.

		POSITIVA		NEGATIVA	
<b>Accuratezze</b>					
DA teorico	DA quantificato	pg ass	Errore %	pg ass	Errore %
	0.75 pg assoluti	0.75±0.04	-1	0.78±0.04	4
	15 pg assoluti	15.6±0.4	4	14.9±0.9	-1
	75 pg assoluti	80±5	8	71±2	-5
<b>Rese con standard interno</b>					
DA teorico	DA quantificato	pg ass	Rese %	pg ass	Rese %
	0.75 pg assoluti	0.64±0.01	85	0.62±0.02	82
	15 pg assoluti	12.3±0.4	82	11.4±0.5	76
	75 pg assoluti	61±2	81	54±2	73
<b>Rese con retta in matrice</b>					
DA teorico	DA quantificato	pg ass	Rese %	pg ass	Rese %
	0.75 pg assoluti	0.64±0.04	86	0.58±0.06	77
	15 pg assoluti	13±1	87	12±1	77
	75 pg assoluti	66±2	87	53±4	71

Le rese della procedura preanalitica per la determinazione dell'acido domoico nella frazione particellata dell'acqua di mare sono sempre maggiori all'80% e la quantificazione condotta con lo standard interno risulta paragonabile a quella fatta con la retta di calibrazione in matrice sia in termine di resa media percentuale che di ripetibilità della misura. L'estrazione risulta efficiente e costante per i tre punti di validazione dimostrando come il metodo possa essere applicato ad un ampio range di concentrazione.

Il metodo dello standard interno per la determinazione dell'acido domoico nella frazione particellata porta a errori percentuali sempre inferiori al  $\pm 10\%$  sia per la ionizzazione positiva che per quella negativa, dimostrandosi quindi una valida alternativa al metodo di quantificazione *matrix matching calibration*.

Sono stati valutati i bianchi procedurali per la frazione disciolta analizzando 500 mL di acqua di laguna al quale sono stati aggiunti 50 ng assoluti di ENK, mentre per la frazione particellata analizzando dei filtri GF/F bianchi ai quali sono stati aggiunti 45 ng assoluti di ENK.

I valori di MDL e di MQL sono stati calcolati come 3 e 10 volte la deviazione standard del bianco procedurale, che viene sottratto ad ogni punto della validazione e nei campioni reali.

In tabella 8.5 si riportano i valori di bianco procedurale con il relativo errore e i valori di MDL e MQL per la frazione disciolta espressi come concentrazione nel campione ( $\text{fg } \mu\text{L}^{-1}$ ) e per quella particellata espressi in quantità assoluta nel filtro (pg ass) utilizzando la ionizzazione positiva e quella negativa.

**Tabella 8.5.** Valori di limite di rilevabilità (MDL) e quantificazione (MQL) dell'acido domoico nelle due frazioni dell'acqua di mare ottenute con le due modalità di ionizzazione.

	Ionizzazione positiva		Ionizzazione negativa	
	Frazione disciolta	Frazione particellata	Frazione disciolta	Frazione particellata
Bianco procedurale	$0.96 \pm 0.09 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$	$0.6 \pm 0.1 \text{ pg ass}$	$0.7 \pm 0.2 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$	$4 \pm 2 \text{ pg ass}$
MDL	$0.3 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$	$0.4 \text{ pg ass}$	$0.6 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$	$6 \text{ pg ass}$
MQL	$0.9 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$	$1.4 \text{ pg ass}$	$2.0 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$	$21 \text{ pg ass}$

In letteratura il più basso valore di MDL ( $10 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$ ) è stato ottenuto da Wang et al. [22], valore simile a quanto trovato da Pocklington et al. [23] in cui viene usato la cromatografia liquida con un rivelatore fluorimetrico con derivatizzazione precolonna con 9-fluorenilmetilcloroformato.

Performance simili sono state ottenute da de la Iglesia [5] con un sistema cromatografico ad alta risoluzione accoppiato a uno spettrometro di massa QTRAP e un'estrazione mediante dischi assorbenti. I valori di MDL e di MQL sono rispettivamente  $20$  e  $60 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$ .

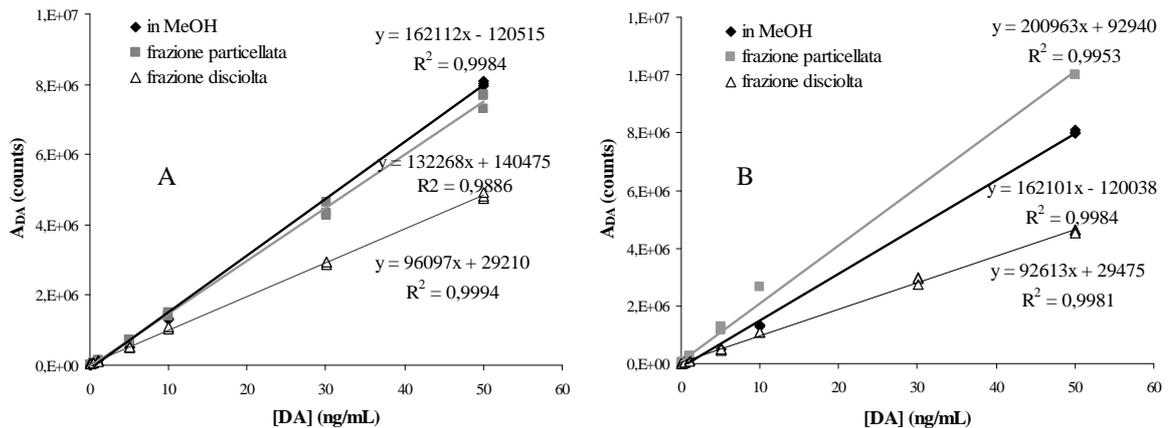
Il metodo sviluppato in questo lavoro risulta di quasi due ordini di grandezza più sensibile (tabella 8.5) di quelli presenti in letteratura, grazie alla sensibilità del metodo strumentale e ad una concentrazione di 1 a 100 per la frazione disciolta.

La frazione particellata in letteratura viene scarsamente considerata. Pan et al. [24] riporta l'analisi di tale frazione mediante saggio receptor-binding il cui limite di rilevabilità risulta  $1.9 \mu\text{g}$  di acido domoico per litro. Un limite di rilevabilità procedurale di  $1 \text{ ng L}^{-1}$  è stato ottenuto da Schnetzer et al. [25] con il metodo ELISA. Se si considera che nel nostro studio sono stati filtrati mediamente  $500 \text{ mL}$ , si ottengono dei MDL di  $0.8 \text{ pg L}^{-1}$  (ionizzazione positiva) e  $12 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$  (ionizzazione negativa). Il metodo presenta una sensibilità nettamente superiore a quanto riportato in letteratura.

### 8.3.2 Valutazione dell'effetto matrice

La valutazione dell'effetto matrice risulta fondamentale nel caso in cui venga usata per la determinazione quantitativa una cromatografia liquida accoppiata allo spettrometro di massa. La presenza di sostanze interferenti non osservabili con il metodo MRM può portare a fenomeni di soppressione o di accrescimento del segnale nella sorgente di ionizzazione che devono essere studiati per assicurarsi che la precisione, l'accuratezza e la sensibilità non vengano compromesse.

Una valutazione qualitativa dell'effetto matrice può essere fatta confrontando le curve di calibrazione preparate in una soluzione sintetica di metanolo e nelle matrici ottenute mediante le procedure pre-analitiche (§ 8.2.4) per la determinazione dell'acido domoico nella frazione disciolta e in quella particellata dell'acqua di mare (figura 8.3). Le curve sono state costruite preparando dieci soluzioni di acido domoico in un range di concentrazione che varia tra  $0.05 \text{ ng mL}^{-1}$  e  $50 \text{ ng mL}^{-1}$ .



**Figura 8.3.** Valutazione qualitativa dell'effetto matrice.

Si riporta il confronto per la polarità di ionizzazione positiva (A) e quella negativa (B).

Con la ionizzazione positiva (figura 8.3 A) l'effetto matrice derivante dalla frazione particellata porta a una minima soppressione del segnale, che diventa invece più marcata per la frazione disciolta. Nella ionizzazione negativa invece (figura 8.3 B) la matrice ottenuta dalla frazione particolata porta ad un innalzamento del segnale mentre quella dalla frazione disciolta porta lo stesso effetto di soppressione riscontrato nella ionizzazione positiva.

Vi sono diversi accorgimenti che possono essere impiegati per cercare di ridurre l'effetto matrice. La sorgente di ionizzazione *atmospheric pressure chemical ionization*

(APCI) è meno soggetta a fenomeni di effetto matrice, tuttavia è già stato verificato (§7) che tale modalità di ionizzazione non è molto efficiente per l'acido domoico.

Anche la ionizzazione in polarità negativa nella sorgente ESI può molto spesso ovviare a problemi di effetto matrice in quanto è considerata più specifica e meno soggetta alla soppressione ionica. In questo caso sembra però che questo approccio non porti a sostanziali miglioramenti.

Il meccanismo su cui si basa la ionizzazione electrospray prevede la competizione delle sostanze interferenti con l'analita per raggiungere la superficie delle gocce sulla quale viene applicata la ionizzazione. Al fine di andare a modificare la tensione superficiale di queste gocce sono state realizzate delle prove iniettando le stesse soluzioni utilizzate per la curva di calibrazione con un'infusione postcolonna di trietilammina, di isopropanolo e di surfattante a catena alchilica lineare (LAS). Le curve ottenute presentano gli stessi effetti riscontrati senza infusione post-colonna.

La preparazione del campione rappresenta un passaggio fondamentale per ridurre l'effetto matrice. La procedura di estrazione in fase solida (SPE) è determinante per poter analizzare l'acqua salata in quanto rimuove i sali ivi contenuti. Tuttavia in figura 8.3 si può notare come le procedure validate non riescano a eliminare l'effetto matrice.

Una valutazione quantitativa dell'effetto matrice può essere fatta utilizzando il metodo proposto da Matuszewski et al. [14].

La variabilità nei coefficienti di variazione (CV%) permette di valutare se la matrice comporta delle variazioni nella precisione del dato. In tabella 8.6 vengono riportati i CV% relativi alle aree dell'acido domoico ottenute variando il solvente nel quale viene diluito a tre diversi livelli di concentrazione (5, 10 e 50 pg  $\mu\text{L}^{-1}$ ).

**Tabella 8.6.** Precisione espressa come coefficiente di variazione % riferita alle aree dell'acido domoico diluito nelle varie matrici: sintetica, quella della frazione particellata e quella della frazione disciolta.

pg $\mu\text{L}^{-1}$	sintetica	frazione particellata		frazione disciolta	
	in MEOH	dopo estrazione	prima estrazione	dopo estrazione	prima estrazione
0.5	0,3	1,4	0,1	5,9	3,0
10	1,2	3,4	1,5	3,4	3,8
50	0,9	3,0	7,0	2,0	1,8

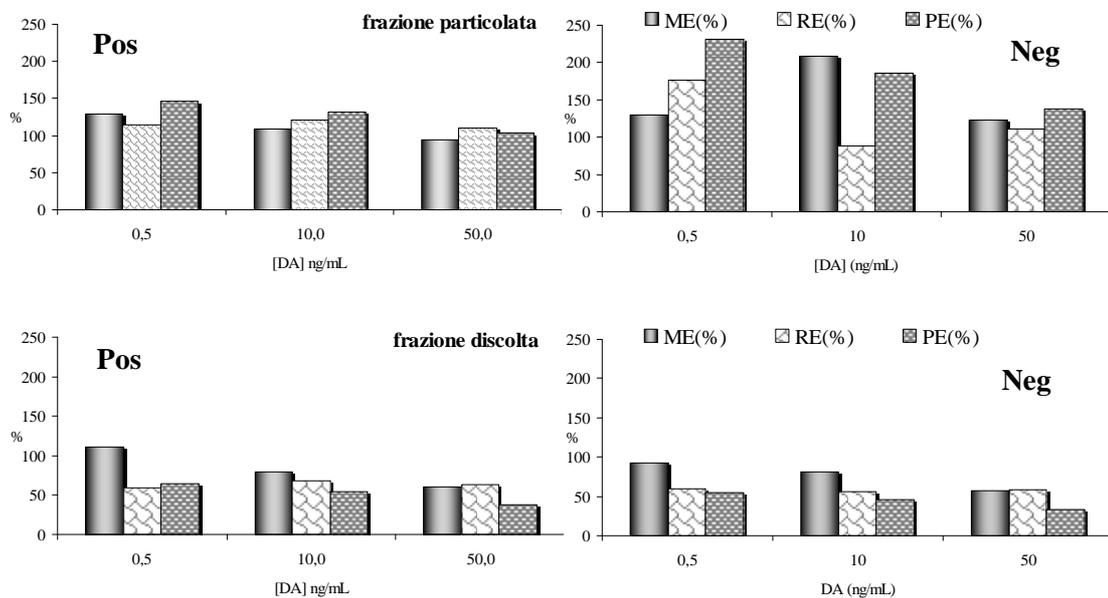
CV% inferiori al 2% vengono ottenuti se l'acido domoico viene diluito in metanolo (MeOH) dimostrano una buona riproducibilità del sistema HPLC-MS/MS.

L'incremento di CV% tra le iniezioni delle soluzioni in MeOH e quelle nelle matrici in cui lo standard della tossina è stata aggiunto dopo l'estrazione indica un effetto matrice dovuto al campione.

La variabilità invece nelle iniezioni delle soluzioni in cui lo standard è stato aggiunto prima dell'estrazione indica un effetto combinato tra effetto matrice e recupero dell'analita dal processo di estrazione. In questo caso si nota una leggera diminuzione dei CV% se gli standard vengono aggiunti prima della procedura pre-analitica la quale probabilmente porta all'eliminazione di alcuni interferenti che causano variabilità strumentale.

L'effetto matrice viene definito da Matuszewski et al. [14] come il rapporto tra l'area di un analita sciolto in una matrice reale e quella dello stesso sciolto in un solvente puro. L'efficienza dell'intero processo invece viene calcolata dal prodotto dell'effetto matrice e l'efficienza di estrazione, data dal rapporto tra l'area di un analita aggiunto ad una matrice prima l'estrazione e lo stesso aggiunto dopo.

I valori dei parametri che permettono di quantificare l'effetto matrice vengono schematizzati in figura 8.4, distinguendo tra le due matrici considerate e le ionizzazioni considerate.



**Figura 8.4.** Effetto matrice (ME), efficienza di estrazione (RE) ed efficienza del processo (PE) valutati per le due frazioni considerate e con le due polarità di ionizzazione.

Dalla figura 8.4 si può notare come vi sia un andamento crescente dell'effetto matrice (ME%) all'aumentare della concentrazione dell'analita, probabilmente a causa di un aumento delle competizioni durante il processo di ionizzazione. Valori di ME superiori

al 100% indicano un innalzamento del segnale mentre inferiori indicano una soppressione. I risultati quantitativi sono concordi con le osservazioni qualitative riportate in figura 8.3. La ionizzazione positiva dimostra quantitativamente minor effetto matrice rispetto la negativa in entrambe le frazioni.

La procedura per la determinazione dell'acido domoico nella frazione particellata porta ad un'efficienza di estrazione molto simile al 100% per i tre livelli di concentrazione considerati portando complessivamente a delle efficienze del processo prossime al 100%.

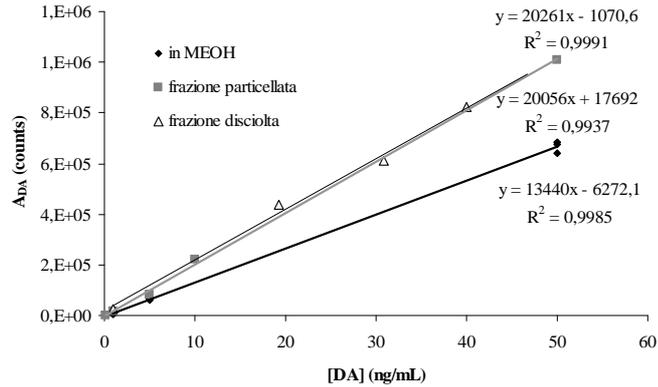
La procedura pre-analitica per la frazione disciolta invece comporta basse recuperi, se pur superiori al 50%, che vanno ad inficiare l'efficienza del processo che risulta più bassa rispetto a quella ottenuta per la frazione particellata.

Queste osservazione dimostrano sperimentalmente come la quantificazione sia influenzata dal livello di concentrazione presente nel campione, in quanto cambiano gli effetti matrice, nonché dal tipo di matrice considerato.

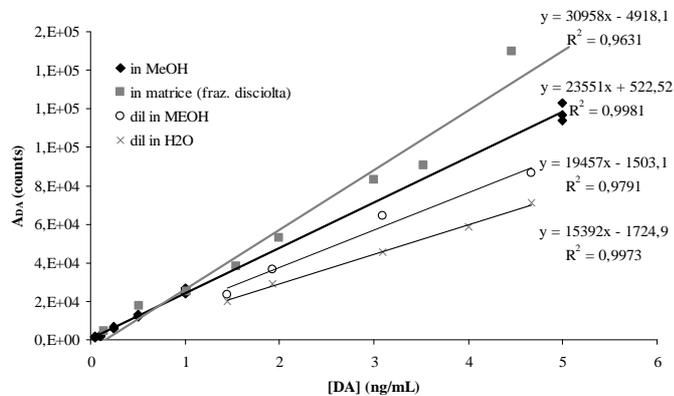
Una quantificazione condotta con una retta di calibrazione esterna preparata in una soluzione sintetica non potrebbe essere impiegata in quanto l'errore commesso comprometterebbe l'accuratezza del dato. L'impiego di una curva preparata in matrice risulta indispensabile per considerare l'effetto matrice nella quantificazione. Infatti in letteratura [3-6,9,22,26] questo tipo di retta viene ampiamente utilizzata per la quantificazione dell'acido domoico.

Dopo aver dimostrato che la ionizzazione con polarità positiva si è dimostrata la migliore in termini di sensibilità e di effetto matrice, sono state condotte ulteriori valutazioni per cercare di minimizzare l'effetto matrice.

È stato verificato se una diminuzione del volume di iniezione da 100  $\mu\text{L}$  a 10  $\mu\text{L}$  (figura 8.5) oppure la diluizione del campione ottenuto dalle procedure pre-analitiche (figura 8.6) potesse portare a dei miglioramenti. Le figure 8.5 e 8.6 dimostrano come tali modificazioni al metodo, che portano a un pesante incremento nel limite di rilevabilità, non sono giustificate.



**Figura 8.5.** Confronto tra le curva di calibrazione dell'acido domoico nelle varie matrici ionizzato in modalità positiva con un volume di iniezione di 10  $\mu\text{L}$ .



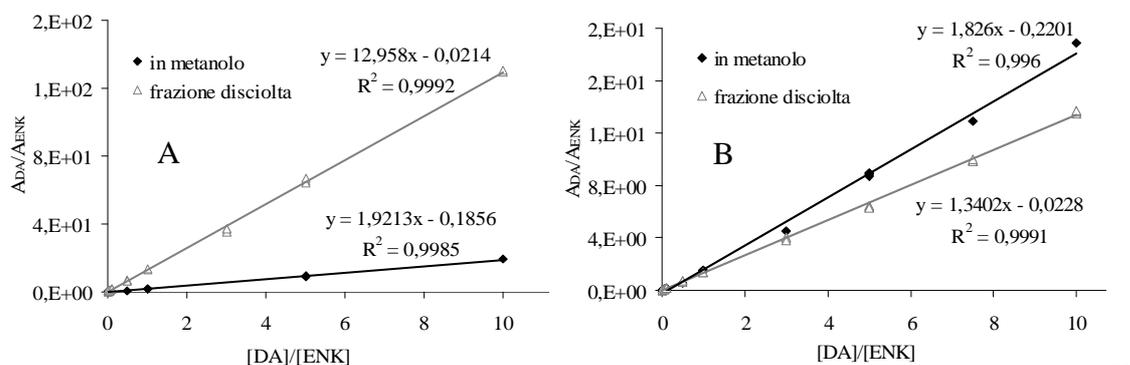
**Figura 8.6.** Confronto tra le curva di calibrazione dell'acido domoico preparata in metanolo, con la matrice ottenuta dalla procedura per la frazione disciolta e diluendo tale matrice in metanolo e in acqua. È stata applicata una modalità di ionizzazione positiva e un volume di iniezione di 10  $\mu\text{L}$ .

L'uso di uno standard marcato isotopicamente come standard interno è il metodo migliore per eliminare l'effetto matrice, ma nel caso dell'acido domoico nessuno standard marcato è disponibile in commercio.

Lo standard interno scelto per la determinazione dell'acido domoico nelle acque nonostante dimostri le stesse caratteristiche cromatografiche e nella preparazione del campione non subisce lo stesso effetto matrice.

È stato quindi valutato qualitativamente come influisce l'effetto matrice nella quantificazione condotta mediante standard interno. Sono state costruite delle curve di calibrazione variando la concentrazione dell'acido domoico tra  $0.05 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$  e  $100 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$  e mantenendo costante la concentrazione dello standard interno ENK ( $10 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ ) in metanolo e nella matrice ottenuta dalla procedura per la frazione disciolta.

Non è possibile confrontare anche la curva relativa alla frazione particellata in quanto la concentrazione di standard interno è di  $30 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ , paragonabile a quella impiegata per la validazione. Le equazioni ottenute per questa matrice sono  $y=13,45x + 0,0648$  ( $R^2 = 0,9992$ ) per la ionizzazione positiva e  $y=1,5246x + 0,0055$  ( $R^2 = 0,999$ ) per quella negativa.



**Figura 8.7.** Confronto delle curve di calibrazione costruite in metanolo e nella matrice della frazione disciolta con standard interno analizzate con una ionizzazione in polarità positiva (A) e negativa (B).

Dalla figura 8.7 si può notare come anche in presenza dello standard interno l'effetto matrice non viene eliminato in quanto l'ENK e l'acido domoico subiscono questo effetto in maniera differente. L'effetto matrice sembra essere più marcato nella ionizzazione positiva rispetto quella negativa, portando ad un aumento della sensibilità. L'uso dello standard interno, che permette di ovviare a errori casuali dovuti all'operatore e allo strumento, può essere fatto se viene utilizzata una soluzione per il calcolo del fattore di risposta in matrice.

Queste considerazioni permettono di affermare che l'uso dello standard interno può rappresentare una valida alternativa alla quantificazione mediante curva di calibrazione esterna costruita in matrice mentre la curva esterna preparata in metanolo non è applicabile per un'accurata quantificazione.

## 8.4 Applicazione del metodo

### 8.4.1 Determinazione dell'acido domoico nel mare di Ross (Antartide)

La procedura pre-analitica messa a punto in questo lavoro è stata applicata a campioni di acqua di mare provenienti dal mare di Ross (Antartide) al fine di valutare la presenza dell'acido domoico nella zona polare nonché le possibili correlazioni con il carico di nutrienti e i parametri chimico fisici. Un confronto poi con uno studio analogo su un ambiente soggetto a fenomeni di eutrofizzazione potrebbe aiutare a meglio comprendere quali siano i fattori incidenti nella produzione dell'acido domoico.

Hasle [27] ha condotto una valutazione sulla distribuzione geografica globale delle specie di diatomee del genere *Pseudo-nitzschia* produttrici di acido domoico, evidenziando come tali specie siano ormai ubiquitarie.

Negli anni '90 sono stati condotti diversi studi di tipo tassonomico nel tratto di mare adiacente il continente antartico, concentratisi soprattutto nella zona del mare di Weddell dove sono presenti la maggior parte delle basi di ricerca. Almandoz et al. [28] hanno definito la distribuzione e l'ecologia delle *Pseudo-nitzschia* presenti nelle acque superficiali del mare di Weddell, individuando come specie più abbondanti le *P. subcruvata*, le *P. turgiduloides*, le *P. prologatoides* e *P. lineola*. La distribuzione delle microalghe nel mare di Ross è stata invece studiata negli anni '90 da Andreoli et al. [29], dimostrando come numerosi specie del genere *Pseudo-nitzschia* siano presenti nel tratto di mare in prossimità della base italiana Mario Zucchelli. Gli autori si sono però limitati a studi tassonomici senza considerare eventuale produzione di acido domoico.

A nostra conoscenza un unico studio ha riportato la presenza di acido domoico in un range di concentrazione compreso tra 2.0 e 200 fg  $\mu\text{L}^{-1}$  nelle acque in prossimità del polo sud [30]. Nonostante tali livelli rientrino ampiamente nei limiti di rilevabilità del metodo messo a punto in questo lavoro, le concentrazioni di acido domoico ottenute dall'analisi dei 28 campioni provenienti dal mare di Ross della campagna 2011-12 sono risultate al di sotto il limite di rilevabilità.

La conta delle cellule fitoplanctoniche è stata effettuata quantitativamente e qualitativamente per i due campioni, il D3 e il CW3 (tabella 8.1), con la più alta concentrazione di clorofilla *a*, riconoscendo le specie dei phyla algali, con camera Uthermol e microscopio ottico. Nel campione D3, situato nella polinia, sono stati individuati solo piccoli nanoflagellati con un'abbondanza di  $2 \cdot 10^5$  cellule per  $\text{L}^{-1}$ . Il sito

presenta pertanto un basso contenuto di carbonio organico ( $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$ ), estrapolato in base alla biomassa presente.

Nel sito CW3 invece, oltre ai nanoflagellati ( $3 \cdot 10^5$  cellule per  $\text{L}^{-1}$ ), sono state individuate diatomee centriche con un consistente aumento nel contenuto di carbonio organico ( $84.2 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Le principali specie presenti e le relative abbondanze sono l'*Actinocyclus cfr actinocyclus* ( $5 \cdot 10^4$  cellule per  $\text{L}^{-1}$ ), la *Thalassiosira lentiginosus* ( $3 \cdot 10^4$  cellule per  $\text{L}^{-1}$ ), la *Thalassiosira cfr trifulta* ( $2 \cdot 10^4$  cellule per  $\text{L}^{-1}$ ) e la *Thalassiosira sp.* ( $2 \cdot 10^3$  cellule per  $\text{L}^{-1}$ ).

La conta fitoplanctonica evidenzia come nei siti campionati non siano presenti diatomee pennate appartenenti al genere *Pseudo-nitzschia*, organismi produttori della tossina investigata. È probabile che l'assenza di queste specie possa essere messa in relazione con i cambiamenti climatici a livello globale, poiché è stata osservata nelle aree polari uno shift nelle comunità fitoplanctoniche da organismi fitoplanctonici veri e propri (diatomee) verso forme fitoplanctoniche più piccole (fitoflagellati e nanoflagellati) ed in alcuni studi [31-34] è stata osservata una netta dominanza delle forme nanofitoplanctoniche e picofitoplanctoniche rispetto al fitoplancton.

#### 8.4.2 Determinazione dell'acido domoico nella laguna di Venezia

Il metodo messo a punto in questo lavoro per l'analisi dell'acido domoico è stato applicato a ventuno campioni raccolti nella Laguna di Venezia e nelle zone di mare antistanti al fine di verificare la presenza della tossina nell'area e di condurre uno studio preliminare teso a fornire un'indicazione sulla possibile distribuzione spaziale.

La Laguna di Venezia ha un'estensione di 550 km<sup>2</sup> ed è situata nella parte nord-ovest del mare Adriatico tra i fiumi Sile e Brenta a una latitudine compresa tra 45°10' 47" N e 45°34'35" N e una longitudine compresa tra 12° 46' 38" E e 12°38'03" E.

È connessa al mare attraverso tre bocche di porto mentre due isole dividono i due comparti marini. La profondità media è di circa 1.5 metri e più del 85% delle acque superficiali lagunari sono meno di 2 metri di profondità. Il volume di acqua contenuto è di circa 628 milioni di metri cubi; più della metà di questo volume è situato nei canali che hanno una profondità media di 3 metri e che occupano circa il 15% della superficie.

Il campionamento (§ 8.2.2) prevedeva la raccolta di campioni in cinque diversi siti: uno è situato nella laguna centrale nelle vicinanze della bocca di porto di Malamocco (campioni 1, 2 e 3); due transetti situati nel tratto di mare Adriatico in prossimità della laguna (tre punti ciascuno 5,6,7 e 8,9,10); le zone di interfase alle bocche studiate sia in marea entrante (campione 4) che in marea uscente (campione 11); un sito in vicinanza della foce del fiume Dese (campioni 12, 13 e 14) e infine un sito in laguna nord (transetto di tre punti, campioni 15, 16 e 17). Tutti i campioni sono stati raccolti il 19 luglio 2012 e trattati come descritto nel § 8.2.4 per l'analisi quantitativa dell'acido domoico e come descritto nel § 8.2.5 per l'analisi dei nutrienti.

Per valutare la presenza di specie fitoplanctoniche produttrici della tossina, quattro campioni sono stati raccolti l'8 agosto. I quattro campioni sono rappresentativi delle zone descritte nella figura 8.8: il campione 18 è stato raccolto in uscita del fiume Dese, il 19 nella laguna nord, il 20 nella laguna centrale mentre il 21 è rappresentativo delle stazioni marine. Su questi campioni è stata determinata la concentrazione percentuale di acido domoico e di nutrienti ed è stata effettuata la conta quantitativa e qualitativa del fitoplancton.

In tabella 8.7 vengono riportati alcuni parametri chimico fisici (temperatura, pH e salinità), le concentrazioni di acido domoico, la concentrazione di clorofilla *a*, il

rapporto tra quest'ultima e la feofitina *a* e le concentrazioni dei nutrienti ad eccezione del N-NO<sub>3</sub>, in quanto in tutti i campioni è risultato al di sotto del limite di rilevabilità.

**Tabella 8.7.** Parametri chimico fisici, concentrazione di acido domoico (DA), di clorofilla *a* (Chl *a*), rapporto tra clorofilla *a* e feofitina *a* (Chl *a*/ Feo *a*), concentrazioni di nutrienti espressi come P, Si e N per tutti i campioni raccolti

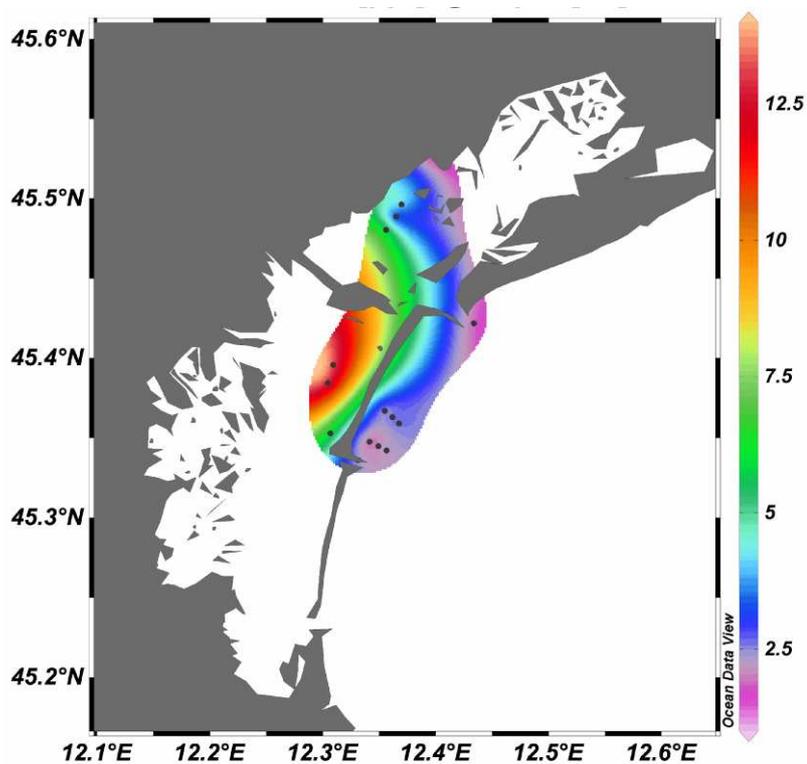
nome sito	T °C	pH	sal ‰	DA pg mL <sup>-1</sup>	Chl <i>a</i> µg mL <sup>-1</sup>	Chl <i>a</i> / Feo <i>a</i>	P-PO <sub>4</sub> µg mL <sup>-1</sup>	Si-SiO <sub>4</sub> µg mL <sup>-1</sup>	N-NH <sub>3</sub> µg mL <sup>-1</sup>	N-NO <sub>2</sub> ng mL <sup>-1</sup>	TIN µg mL <sup>-1</sup>
1	27	8.2	32	13.20	0.45	1.43	0.14	0.38	0.41	7.41	0.42
2	27	8.2	21	13.13	0.45	1.43	0.06	<LOD	0.41	3.65	0.41
3	29	8.2	18	5.99	0.89	1.43	0.19	0.66	0.41	3.25	0.41
4	28	8.2	29	2.40	1.34	0.79	0.08	0.05	0.41	6.50	0.42
5	28	8.3	31	2.36	1.78	0.51	<LOD	0.19	0.41	4.47	0.42
6	29	8.2	33	1.47	0.45	0.09	0.01	<LOD	0.41	2.13	0.41
7	28	8.3	30	2.23	1.34	0.28	0.06	<LOD	0.41	7.61	0.42
8	28	8.2	32	2.65	0.89	0.08	0.07	<LOD	0.41	0.81	0.41
9	28	8.2	33	3.15	1.34	0.28	<LOD	<LOD	0.41	3.76	0.41
10	27	8.3	28	1.79	1.34	0.28	0.06	<LOD	0.41	5.07	0.42
11	29	8.2	29	1.81	1.34	0.08	0.02	0.05	0.41	6.39	0.42
12	30	8.0	18	2.26	5.35	0.79	0.12	0.04	0.41	2.33	0.41
13	30	7.8	17	2.05	4.46	0.24	0.06	0.52	0.41	6.80	0.42
14	30	8.0	19	1.53	7.13	2.62	0.04	0.47	0.41	3.35	0.41
15	30	8.2	32	4.84	5.35	1.79	0.04	0.37	0.41	3.25	0.41
16	30	8.0	21	2.09	8.02	1.26	0.03	0.57	0.41	2.64	0.41
17	31	8.1	30	6.27	7.13	0.30	0.07	0.20	0.41	5.07	0.42
18	27	8.0	6	2.91	24.50	2.37	0.13	4.11	0.82	33.00	0.83
19	27	8.3	31	14.51	4.01	0.25	<LOD	0.07	0.41	16.33	0.42
20	29	8.2	28	16.15	0.89	0.03	0.13	4.11	<LOD	59.33	59.33
21	28	8.2	26	4.15	1.34	0.11	0.01	0.18	<LOD	7.33	7.33

La concentrazione di acido domoico nei campioni analizzati è sempre superiore al limite di quantificazione in un range compreso tra 1.47 e 16.15 pg mL<sup>-1</sup>. Come si può notare i valori registrati risultano piuttosto bassi se confrontati con quelli trovati lungo le coste della California [2,25] o del Canada [3] in presenza di blooms algali con concentrazioni dell'ordine dei ng mL<sup>-1</sup>.

A nostra conoscenza non ci sono studi in cui sia stata valutata la concentrazione di acido domoico nell'acqua del mare Adriatico o della laguna di Venezia, sebbene il genere *Pseudo-nitzschia* sia ubiquitario e sia stato individuato in queste zone [35-39]. Ciminiello et al. [40] hanno riportato concentrazioni di acido domoico superiori ai limiti di rilevabilità nei mitili del mare Adriatico evidenziando come la tossina sia presente in tale bacino idrico e possa essere assimilata dalle specie ittiche con possibile contaminazione delle stesse. Tuttavia l'analisi dell'acqua di mare richiede grande sensibilità per rivelare concentrazioni molto basse anche al di sotto dei ppt. Come

dimostrato nel § 8.3.1, i limiti di rilevabilità del metodo messo a punto in questo lavoro sono nettamente inferiori a quanto riportato in letteratura [22] e permettono quindi di analizzare l'acido domoico nell'acqua di mare anche in presenza di bloom meno intensi rispetto a quelli oceanici [2,3].

In figura 8.9 si riporta la distribuzione spaziale della concentrazione di acido domoico ( $\text{pg mL}^{-1}$ ) determinata per i campioni raccolti il 19 luglio 2012 (stazioni 1-17). La figura 8.8 è stata ottenuta utilizzando il software Ocean Data View [41] e un'interpolazione dei dati mediante *gridding DIVA* [42].

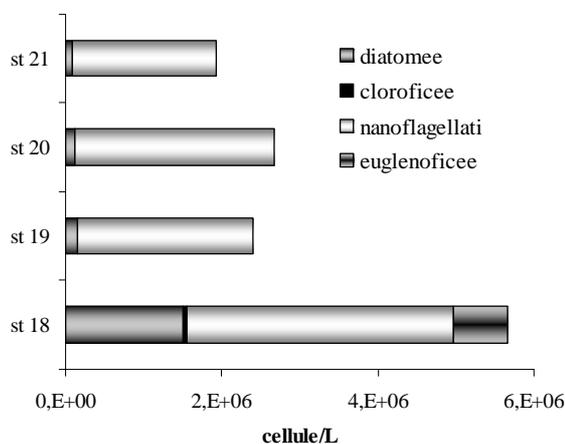


**Figura 8.8.** Distribuzione spaziale di acido domoico ( $\text{pg mL}^{-1}$ ) nella laguna di Venezia [41].

Si può notare dalla figura 8.8 come l'acido domoico si concentri maggiormente nella zona centrale della laguna, mentre concentrazioni più basse si osservano sia nelle vicinanze delle foci del fiume Dese (stazioni 12,13,14) sia nei transetti del mare Adriatico (stazioni 5-10).

Nei campioni raccolti l'8 agosto è stata anche effettuata la conta quantitativa e qualitative del fitoplancton per individuare i taxa presenti nei quattro siti campionati. Per ciascuna stazione è stata valutata l'abbondanza cellulare (cellule per litro) e il contenuto di carbonio del fitoplancton stesso, oltre che la concentrazione di acido domoico, dei nutrienti e i parametri chimico fisici (tabella 8.7).

In figura 8.9 viene riportata la distribuzione delle specie fitoplanctoniche per le quattro stazioni campionate l'8 agosto. Una simile distribuzione fitoplanctonica è stata osservata nella Laguna di Venezia anche da Acri et al. [43], ipotizzando un'alta concentrazione di biomassa a seguito di consecutivi bloom algali.



**Figura 8.9.** Distribuzione delle specie fitoplanctoniche in relazione alla propria abbondanza ( $\text{cell L}^{-1}$ ).

La maggiore abbondanza fitoplanctonica si registra nella stazione 18 (uscita fiume Dese) mentre le altre stazioni mostrano una concentrazione più bassa ma simile tra loro. I nanoflagellati risultano essere più abbondanti in tutti i siti campionati, ma il loro contributo per il contenuto di carbonio è notevolmente ridotto a causa delle loro piccole dimensioni. Il contenuto di carbonio dato dai nanoflagellati in queste stazioni varia tra  $16 \mu\text{g L}^{-1}$  (stazione 19) e  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  (stazione 18). Nonostante siano presenti in minor percentuale le diatomee contribuivano in maniera incisiva sul contenuto totale di carbonio con valori che variano tra  $11 \mu\text{g L}^{-1}$  (stazione 20) e  $174 \mu\text{g L}^{-1}$  (stazione 18). Nella stazione 18 sono anche presenti cloroficee e euglenoficee, il cui contributo di carbonio risulta rispettivamente di  $400$  e  $17 \mu\text{g L}^{-1}$ .

In figura 8.10 vengono riportati i diagrammi a torta delle quattro stazioni relativi alle abbondanze relative percentuali di ogni singola specie di diatomea. In tutti i siti di campionamento è presente il genere *Pseudo-nitzschia*, organismi possibili produttori di acido domoico.

Nella stazione 18 le diatomee centriche (*Thalassiosira sp. cfr weissflogii* e centriche non identificate) sono le specie più abbondanti, mentre nelle altre stazioni la specie più abbondante è la pennata *Pseudo-nitzschia cfr pungens*.

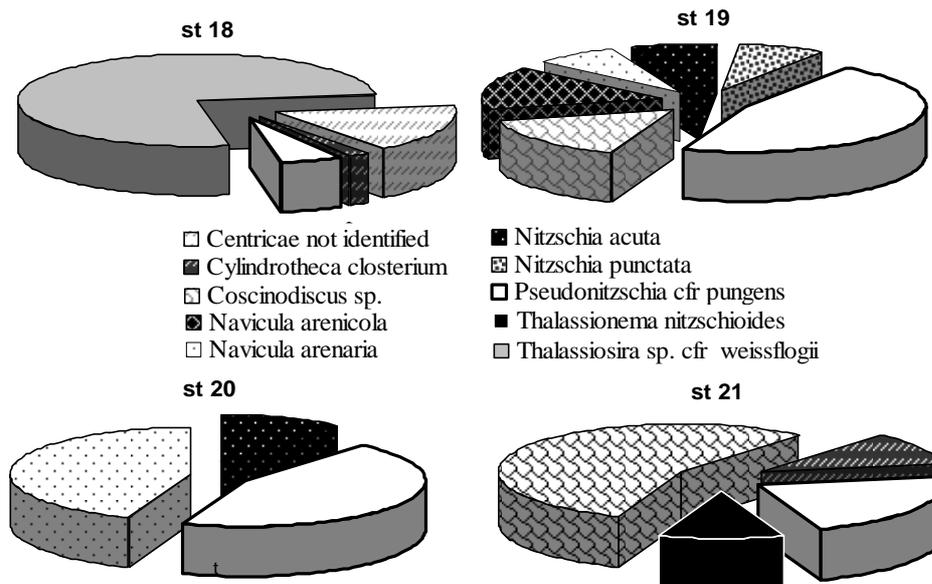


Figura 8.10. Abbondanze relative percentuali delle varie specie di diatomee presente nei quattro siti.

In figura 8.10 viene riportato il confronto tra l'abbondanza totale delle specie del genere *Pseudo-nitzschia* e la concentrazione di acido domoico espressa come concentrazione assoluta (pg) per cellule presenti. Come è risaputo in letteratura [39,44,45] non tutte le specie di *Pseudo-nitzschia* producono acido domoico, come denota la mancanza di correlazione riportata in figura 8.11 tra l'organismo e la tossina prodotta.

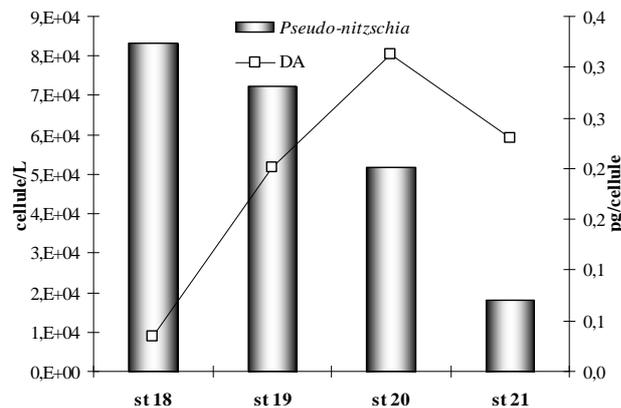


Figura 8.11. Confronto tra le abbondanze delle specie *Pseudo-nitzschia* e la concentrazione di acido domoico

Alcuni studi [46,47] hanno evidenziato che le diatomee pennate del genere *Pseudo-nitzschia* iniziano a produrre acido domoico, come metabolita secondario, durante la fase stazionaria della loro vita quando l'azoto è in eccesso e il silicio e il fosforo sono limitanti. Pan et al. [24] hanno dimostrato che l'acido domoico potrebbe essere prodotto

anche nella fase esponenziale di crescita mentre Maldonado et al. [48] riportano che la produzione potrebbe essere stimolata da una limitazione del ferro.

In particolare la concentrazione di silicio è un parametro fondamentale per la crescita delle diatomee poiché questi organismi usano il silicio per costruire la parete cellulare e per la sintesi del DNA [49,50]. Mos [49] ipotizza che la produzione di acido domoico serva ad eliminare l'energia fotosintetica che risulta in eccesso nel momento in cui si raggiunga uno stato di quiescenza.

La moltitudine di relazioni causa-effetto tra la disponibilità di nutrienti (macronutrienti e metalli in tracce) e produzione di acido domoico implica che vi possono essere molteplici scenari in natura che potrebbero stimolare la produzione della tossina da parte di organismi delle specie *Pseudo-nitzschia* [25]. Lo studio quindi degli ecosistemi naturali attraverso la misura delle proprietà chimiche e fisiche giocano un ruolo importante nella determinazione di queste relazioni causa ed effetto.

Per tale ragione sono stati monitorati i parametri chimico fisici quali il pH, la salinità e la temperatura, nonché è stata determinata la concentrazione di clorofilla *a* come proxy della quantità di biomassa presente. È stato quindi definito il rapporto clorofilla *a* vs feofitina *a* per ottenere un'indicazione della quantità di biomassa in decomposizione ad indicare la fine del bloom. Infine i campioni sono stati analizzati per determinare la concentrazione di nutrienti riportati in tabella 8.7.

Dai dati ottenuti nell'area considerata si osserva un'alta concentrazione di azoto (valore medio 31  $\mu\text{M}$ ), la cui forma prevalente è l'ammonio; è perciò ipotizzabile che il nitrato venga utilizzato come principale accettore di elettroni con conseguente rilascio di ammonio che risulta poi essere la forma più biodisponibile per la crescita algale. È stato inoltre dimostrato che l'ammonio è un promotore dei *bloom* algali tossici [51]. Le *Pseudo-nitzschia*, in particolare la *P. australis*, sono in grado di assorbire sia l'azoto ammoniacale che l'azoto nitrico ma si verifica un'inibizione dell'assorbimento di quest'ultimo in presenza di un eccesso di ammonio [52].

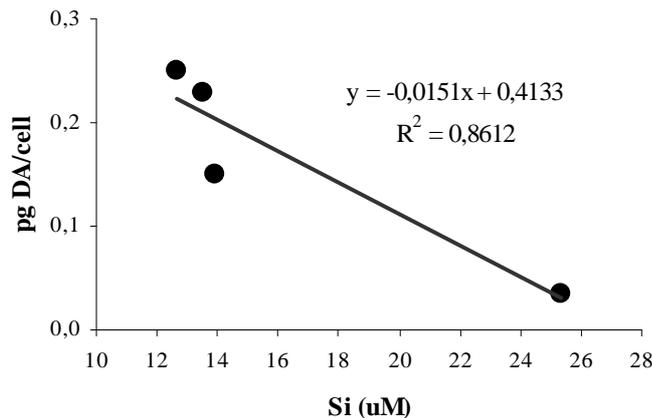
La produzione dell'acido domoico nella laguna di Venezia potrebbe quindi essere stata incentivata dalla rilevante presenza della forma ammoniacale.

Le concentrazioni medie di silicio e fosforo sono rispettivamente 12  $\mu\text{M}$  e 2  $\mu\text{M}$ . Confrontando questi valori con uno studio decennale condotto da Bernardi Aubry et al. [36] sulla distribuzione dei nutrienti nella zona costiera prossima alla laguna di Venezia si osserva che mentre le concentrazioni di silicio e di azoto totale sono simili, la

concentrazione di fosforo trovata in questo studio è di un ordine di grandezza superiore rispetto ai dati pubblicati da Bernardi Aubry et al. [36].

L'elevata concentrazione di fosfati è tipica delle zone lagunari e di estuario nel periodo estivo a causa della remineralizzazione della sostanza organica trasportata nella laguna da una fioritura precedentemente avvenuta in mare aperto, al rimescolamento dei sedimenti ricchi in nutrienti in condizioni di anossia oppure a seguito della stratificazione e dell'altra velocità di respirazione[53].

Pan et al. [47] hanno studiato gli effetti della limitazione dei silicati sulla produzione di acido domoico, ipotizzando che la produzione della tossina non sia necessariamente associata a uno stato di quiescenza ma sia legata invece a uno stress da silicati. A tal proposito viene riportata in figura 8.11 la correlazione tra la concentrazione di acido domoico e il carico di silicati determinati nei campioni dell'8 agosto. Si nota come è presente la stessa correlazione negativa trovata da Pan et al. [47] dove era stato verificato che la produzione di acido domoico era dovuta a una limitazione da silicati.

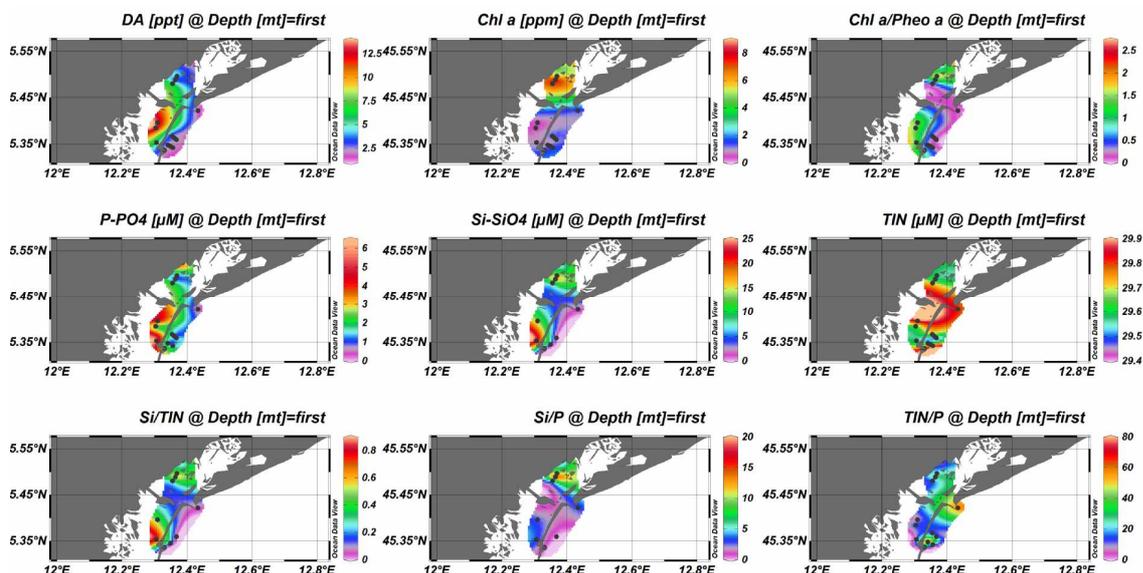


**Figura 8.11.** Relazione tra la concentrazione cellulare di acido domoico e il carico di silicati.

Al fine di valutare quali siano i nutrienti limitanti sono stati seguiti i criteri stabiliti da Justic et al. [54]: si è in presenza di una limitazione di fosforo quando  $P < 0.1 \mu\text{M}$ ,  $\text{TIN}/P > 22$  e  $\text{Si}/P > 22$ ; la limitazione dell'azoto si ha invece quando  $\text{TIN} < 1 \mu\text{M}$ ,  $\text{TIN}/P < 10$  e  $\text{Si}/\text{TIN} > 1$ ; infine il silicio è limitante quando  $\text{Si}/P < 10$  e  $\text{Si}/\text{TIN} < 1$ .

Applicando questi criteri ai campioni analizzati in questo lavoro si può osservare come non sia presente una limitazione nell'azoto in quanto l'azoto totale presenta una concentrazione media  $31 \mu\text{M}$ , un rapporto  $\text{TIN}/P$  di 19 e uno di  $\text{Si}/\text{TIN}$  di 0.39 e non è limitante nemmeno il fosforo che è presente una concentrazione  $2 \mu\text{M}$ . Come già osservato nella figura 8.11, il silicio nei campioni raccolti nella laguna di Venezia risulta limitante anche considerando il rapporto  $\text{Si}/P$  (5.7) e quello  $\text{Si}/N$  (0.39).

Si riporta in figura 8.12 la distribuzione spaziale dei nutrienti e della clorofilla *a* nonché quella dei rapporti tra nutrienti confrontata con quella relativa alla concentrazione di domoico per i campioni raccolti il 19 luglio 2012.



**Figura 8.12.** Distribuzione spaziale [41] della concentrazione di acido domoico, dei nutrienti, della clorofilla *a* e dei rapporti tra clorofilla *a* e feofitina *a*, tra silicio e azoto totale inorganico (Si/TIN), tra silicio e fosforo e tra azoto totale e fosforo (TIN/P).

Confrontando le distribuzioni spaziali non sono evidenti correlazioni tra la concentrazione di acido domoico e la clorofilla *a* che sembra concentrarsi maggiormente nella laguna nord in prossimità della foce del fiume Dese.

È stata considerata la distribuzione spaziale dei nitriti invece che l'azoto totale in quanto il valore di ammonio risulta costante a  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  e quello dei nitrato è al di sotto del limite di rilevabilità, pertanto i nitriti sono la componente più variabile dell'azoto totale. Si può osservare la mancanza di correlazioni con la distribuzione della tossina.

Le distribuzioni che maggiormente si avvicinano a quella dell'acido domoico sono il fosforo, il silicio e il rapporto Si/TIN.

Queste possibili correlazioni con il silicio e con il fosforo potrebbe essere legate all'importanza di questi nutrienti nella crescita delle diatomee produttori della tossina.

I risultati ottenuti mettono in evidenza interessanti relazioni e pongono le basi per successive indagini che prevedono campagne più estese.

## 8.5 Conclusioni

In questo lavoro sono stati validati due metodi per la determinazione dell'acido domoico nella frazione disciolta e nella frazione particellata utilizzando in entrambi una stessa corsa cromatografia e una modalità di acquisizione in massa MRM ma una polarità di ionizzazione diversa.

Questo è il primo lavoro in cui viene impiegato il metodo dello standard interno come metodo di quantificazione. Le fluttuazioni strumentali e gli effetti matrice sono stati minimizzati utilizzando nella quantificazione un fattore di risposta ottenuto da soluzioni preparate nelle matrici derivanti dalle procedure descritte nel § 8.2.4.

Una prima fase del lavoro si è concentrata nell'individuazione del miglior standard interno che è risultato essere la leucina encefalina.

Le procedure preparative sono quindi state validate valutando per ciascuna l'errore medio percentuale, la resa procedurale e la ripetibilità delle analisi per tre livelli di concentrazione.

Per la procedura per la determinazione dell'acido domoico nella frazione disciolta è stata ottimizzata una tecnica di estrazione, purificazione e pre-concentrazione *solid phase extraction*. Le rese di estrazione medie di tale procedura sui tre livelli di concentrazione di acido domoico sono del 66% con un errore percentuale medio del 4% ottenute con la quantificazione mediante standard interno. Tali risultati sono stati poi confrontati con la quantificazione realizzata mediante retta di calibrazione in matrice, dimostrando quindi l'applicabilità del metodo con lo standard interno.

La frazione particellata è stata invece estratta in bagno ad ultrasuoni con una composizione di solvente estraente opportunamente ottimizzata che ha portato a delle rese di estrazione medie del 82% con un errore percentuale sempre inferiore al  $\pm 10\%$ .

Anche in questo caso è stato confrontato il metodo di quantificazione con lo standard interno con quello con la retta di calibrazione esterna ottenendo dei risultati paragonabili.

L'effetto matrice è stato valutato mediante il metodo proposto da Matuszewski dimostrando come questo incida pesantemente nella frazione disciolta mentre risulta minimo nella frazione particellata. Tuttavia l'uso di uno standard interno e di una soluzione utilizzata per il calcolo del fattore di risposta preparata in matrice permettono

di minimizzare tali effetti in quanto vengono presi in considerazione nel corso della quantificazione, aumentandone l'accuratezza.

La valutazione del miglior metodo di analisi tra la polarità positiva e quella negativa è stata realizzata confrontando i risultati ottenuti durante la validazione e per la stima dell'effetto matrice. La polarità negativa risente meno degli effetti matrice utilizzando lo standard interno mentre le validazioni sono risultate confrontabili con i due metodi di analisi.

Il metodo sviluppato ha permesso di ottenere dei limiti di rilevabilità di quasi due ordini di grandezza inferiori a quelli riportati in letteratura, ottenendo per la ionizzazione in polarità positiva un MDL di  $0.3 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$  per la frazione disciolta e  $0.4 \text{ pg}$  assoluti per la frazione particellata, mentre per la ionizzazione in polarità negativa rispettivamente  $0.6 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$  e  $6 \text{ pg}$  assoluti per la frazione disciolta e per la particellata.

Il metodo è stato poi applicato a campioni provenienti da due zone a diverso grado di eutrofizzazione. Una prima applicazione del metodo è stata fatta su ventotto campioni raccolti nel mare di Ross (Antartide) per valutare la presenza della tossina in un ambiente dove non sono presenti fenomeni di eutrofizzazione allo scopo di investigare i processi produttivi con un basso carico di nutrienti. Una seconda applicazione invece è stata al contrario fatta su ventuno campioni raccolti nella laguna di Venezia, zona fortemente antropizzata.

Nonostante la presenza di diatomee del genere *Pseudo-nitzschia* fosse stata documentata nel oceano antartico, nei campioni prelevati tali organismi non sono stati individuati e le concentrazioni di acido domoico sono risultate sempre inferiori ai limiti di rilevabilità.

L'assenza della tossina nel ambiente antartico ha precluso il confronto nella produzione dell'acido domoico tra i due ambienti.

Il metodo sviluppato è stato applicato ai campioni raccolti nella laguna di Venezia individuando per la prima volta la tossina in questo ambiente. Questo è stato possibile grazie allo sviluppo del metodo qui proposto che permette di rivelare concentrazioni di acido domoico dell'ordine dei  $\text{fg } \mu\text{L}^{-1}$ .

## 8.6 Riferimenti bibliografici

- [1] L.B. Busse, E.L. Venrick, R. Antrobus, P.E. Miller, V. Vigilant, M.W. Silver, C. Mengelt, L. Mydlarz, B.B. Prezelin, *Harmful Algae* 5 (2006) 91.
- [2] V.L. Trainer, N.G. Adams, B.D. Bill, C.M. Stehr, J.C. Wekell, P. Moeller, M. Busman, D. Woodruff, *Limnology and Oceanography* 45 (2000) 1818.
- [3] L.L. Mafra, Jr., C. Leger, S.S. Bates, M.A. Quilliam, *Journal of chromatography. A* 1216 (2009) 6003.
- [4] Z.H. Wang, K.L. King, J.S. Ramsdell, G.J. Doucette, *Journal of Chromatography A* 1163 (2007) 169.
- [5] P. de la Iglesia, G. Gimenez, J. Diogene, *Journal of Chromatography A* 1215 (2008) 116.
- [6] L. Elena Vera-Avila, D.Y. Marin-Perez, R. Covarrubias-Herrera, *Journal of the Mexican Chemical Society* 55 (2011) 65.
- [7] S.A. Gustavsson, J. Samskog, K.E. Markides, B. Langstrom, *Journal of Chromatography A* 937 (2001) 41.
- [8] P. Kebarle, L. Tang, *Analytical Chemistry* 65 (1993) 972A.
- [9] I.O.M. Chan, V.W.H. Tsang, K.K. Chu, S.K. Leung, M.H.W. Lam, T.C. Lau, P.K.S. Lam, R.S.S. Wu, *Analytica Chimica Acta* 583 (2007) 111.
- [10] D.T. Rossi, *Mass Spectrometry in Drug Discovery*, New York and Basel, 2002.
- [11] M.A. Quilliam, M. Xie, W.R. Hardstaff, *Journal of Aoac International* 78 (1995).
- [12] P.T. Holland, P. McNabb, A.I. Selwood, T. Neil, *Journal of AOAC Int.* 86 (2003) 1095.
- [13] J.A. Walter, D.M. Leek, M. Falk, *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* 70 (1992) 1156.
- [14] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, *Analytical Chemistry* 75 (2003) 3019.
- [15] C. Totti, M. Cangini, C. Ferrari, R. Kraus, M. Pompei, A. Pugnelli, T. Romagnoli, S. Vanucci, G. Socal, *Science of the Total Environment* 353 (2005) 204.
- [16] E. Magaletti, A. Ghetti, M. Cabrini, M. Pompei, in S.D.M. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio (Editor), *ICRAM*, 2001.
- [17] E. Magaletti, M. Pompei, F. Giovanardi, in *UNEP/MAP/MED POL: Sampling and Analysis Techniques for the Eutrophication Monitoring Strategy of MED POL*, UNEP/MAP, Athens, 2005.
- [18] A. APHA, WEP, in, Washington, 1998.
- [19] Utermöhl, *Intern. Ver. Theor. Angew. Limnol.* 9 (1958) 1.
- [20] E.R. Tor, B. Puschner, W.E. Whitehead, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003) 1791.
- [21] L.M. Cong, B.F. Huang, Q. Chen, B.Y. Lu, J. Zhang, Y.P. Ren, *Analytica Chimica Acta* 569 (2006) 157.
- [22] Z. Wang, J. Maucher-Fuquay, S.E. Fire, C.M. Mikulski, B. Haynes, G.J. Doucette, J.S. Ramsdell, *Analytica Chimica Acta* 715 (2012) 351.
- [23] R. Pocklington, J.E. Milley, S.S. Bates, C.J. Bird, A.S.W. Defreitas, M.A. Quilliam, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 38 (1990) 351.
- [24] Y.L. Pan, M.L. Parsons, M. Busman, P.D.R. Moeller, Q. Dortch, C.L. Powell, G.J. Doucette, *Marine Ecology-Progress Series* 220 (2001) 83.
- [25] A. Schnetzer, P.E. Miller, R.A. Schaffner, B.A. Stauffer, B.H. Jones, S.B. Weisberg, P.M. DiGiacomo, W.M. Berelson, D.A. Caron, *Harmful Algae* 6 (2007) 372.
- [26] E.V. Piletska, F.N. Villoslada, I. Chianella, A. Bossi, K. Karim, M.J. Whitcombe, S.A. Piletsky, G.J. Doucette, J.S. Ramsdell, *Analytica Chimica Acta* 610 (2008) 35.
- [27] G.R. Hasle, *Harmful Algae* 1 (2002) 137.
- [28] G.O. Almandoz, G.A. Ferreyra, I.R. Schloss, A.I. Dogliotti, V. Rupolo, F.E. Paparazzo, J.L. Esteves, M.E. Ferrario, *Polar Biology* 31 (2008) 429.

- [29] C. Andreoli, I. Moro, N. La Rocca, L. Dalla Valle, L. Masiero, N. Rascio, F. Dalla Vecchia, *Italian Journal of Zoology* 67:S1 (2000) 147.
- [30] M.W. Silver, S. Bargu, S.L. Coale, C.R. Benitez-Nelson, A.C. Garcia, K.J. Roberts, E. Sekula-Wood, K.W. Bruland, K.H. Coale, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (2010) 20762.
- [31] E. Mattson, A. Karlsson, W.O. Smith, Jr., K. Abrahamsson, *Marine Chemistry* 140 (2012) 1.
- [32] S.-Y. Ha, Y.-N. Kim, M.-O. Park, S.-H. Kang, H.-c. Kim, K.-H. Shin, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 114 (2012) 1.
- [33] S. Balzano, P. Gourvil, R. Siano, M. Chanoine, D. Marie, S. Lessard, D. Sarno, D. Vaultot, *Biogeosciences Discussions* 9 (2012) 6219.
- [34] K.G. Schulz, R.G.J. Bellerby, C.P.D. Brussaard, J. Budenbender, J. Czerny, A. Engel, M. Fischer, S. Koch-Klavsen, S.A. Krug, S. Lischka, A. Ludwig, M. Meyerhofer, G. Nondal, A. Silyakova, A. Stuhr, U. Riebesell, *Biogeosciences Discussions* 9 (2012) 12543.
- [35] F. Bernardi Aubry, F. Acri, *Journal of Marine Systems* 51 (2004) 321.
- [36] F. Bernardi Aubry, A. Berton, M. Bastianini, G. Socal, F. Acri, *Continental Shelf Research* 24 (2004) 97.
- [37] T. Cibic, O. Blasutto, C. Falconi, S.F. Umami, *Estuarine Coastal and Shelf Science* 75 (2007) 50.
- [38] A. Penna, C. Ingarao, M. Ercolessi, M. Rocchi, N. Penna, *Estuarine Coastal and Shelf Science* 70 (2006) 307.
- [39] D. Maric, Z. Ljubescic, J. Godrijan, D. Vilicic, I. Ujevic, R. Precali, *Estuarine Coastal and Shelf Science* 92 (2011) 323.
- [40] P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, G.S. Magno, L. Tartaglione, M.A. Quilliam, A. Tubaro, R. Poletti, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19 (2005) 2030.
- [41] R. Schlitzer, in, 2011.
- [42] U.o. Liege, in, Belgium.
- [43] F. Acri, F.B. Aubry, A. Berton, F. Bianchi, A. Boldrin, E. Camatti, A. Comaschi, S. Rabitti, G. Socal, *Journal of Marine Systems* 51 (2004) 321.
- [44] E. Takahashi, Q. Yu, G. Eaglesham, D.W. Connell, J. McBroom, S. Costanzo, G.R. Shaw, *Marine Environmental Research* 64 (2007) 429.
- [45] A. Marchetti, V.L. Trainer, P.J. Harrison, *Marine Ecology-Progress Series* 281 (2004) 1.
- [46] S.S. Bates, J. Worms, J.C. Smith, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50 (1993) 1248.
- [47] Y.L. Pan, D.V.S. Rao, K.H. Mann, R.G. Brown, R. Pocklington, *Marine Ecology-Progress Series* 131 (1996) 225.
- [48] M.T. Maldonado, M.P. Hughes, E.L. Rue, M.L. Wells, *Limnology and Oceanography* 47 (2002) 515.
- [49] L. Mos, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 9 (2001) 79.
- [50] R.M. Kudela, S. Seeyave, W.P. Cochlan, *Progress in Oceanography* 85 (2010) 108.
- [51] K. Tada, M. Suksomjit, K. Ichimi, Y. Funaki, S. Montani, M. Yamada, P.J. Harrison, *Journal of Oceanography* 65 (2009) 835.
- [52] R.W. Howarth, R. Marino, *Limnology and Oceanography* 51 (2006) 364.
- [53] H. Postma, *Mar. Geol.* 40 (1981) 199.
- [54] D. Justic, N.N. Rabalais, R.E. Turner, Q. Dortch, *Estuarine Coastal and Shelf Science* 40 (1995) 339.

## CAPITOLO 9

### L'acido domoico nei mitili

#### 9.1 Introduzione

L'acido domoico è un amminoacido prodotto da alcune specie di diatomee che causa una forma di intossicazione chiamata avvelenamento amnesico di molluschi (*amnesic shellfish poisoning*, ASP).

La rivelazione di questa tossina nei mitili può essere condotta utilizzando saggi biochimici o metodi strumentali [1].

L'*Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) ha proposto l'impiego di un saggio sui topi sviluppato per le tossine PSP per l'identificazione anche dell'acido domoico, in cui il tessuto del mollusco viene estratto con una soluzione acida (0.1N HCl) e quindi iniettata nei topi. I primi sintomi tuttavia iniziano a manifestarsi con una concentrazione di 40  $\mu\text{g g}^{-1}$  mentre i limiti di legge sono 20  $\mu\text{g g}^{-1}$ , rendendo il metodo inutilizzabile.

I metodi strumentali risultano le tecniche più sensibili per la determinazione della tossina e il sistema LC-UV è quello suggerito per la quantificazione dell'acido domoico nei molluschi [2]. I tessuti possono essere estratti secondo la procedura descritta dall'AOAC [3] oppure con una soluzione acquosa di metanolo (1:1) [2] che porta a recuperi migliori e rende l'estratto più stabile. Il limite di rilevabilità di questi metodi è compreso tra 0.1 e 1  $\mu\text{g}$  di acido domoico per g di tessuto, a seconda della sensibilità del rivelatore UV. Tuttavia questa procedura risente di numerose interferenze che possono portare a dei falsi positivi con l'estratto tal quale e rendono quindi necessario l'introduzione di una fase di purificazione che generalmente prevede un'estrazione in fase solida (SPE).

L'elettroforesi capillare con la rivelazione UV è un'altra tecnica applicata alla determinazione dell'acido domoico nei molluschi ma l'estratto deve essere purificato con due fasi SPE, una anionica e l'altra cationica [4].

L'analisi mediante un rivelatore a fluorescenza è una delle tecniche più sensibili ma le interferenze possono reagire competitivamente con l'agente derivatizzante. L'applicazione della tecnica ai molluschi è possibile solo utilizzando come agente derivatizzante il 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzossadiazolo con un limite di rilevabilità di 6 ng di acido domoico per g di mollusco [5].

La cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa permette di ottenere grande sensibilità ma soprattutto un'elevata selettività nella determinazione dell'acido domoico nei molluschi. Sono stati sviluppati diversi metodi mediante spettrometria di massa tandem allo scopo di quantificare le tossine nei mitili [6,7]. Un interessante confronto tra le tecniche LC-UV e LC-MS è stata condotta da Hess et al. [8,9], mettendo in evidenza come i due sistemi non abbiano delle differenze significative se viene utilizzata una procedura di purificazione. Tuttavia la tecnica LC-UV può risentire di falsi positivi nel caso di campioni con un carico maggiore di interferenti.

Lo scopo di questo lavoro è quello di sviluppare una procedura pre-analitica per determinare quantitativamente l'acido domoico nei molluschi eliminando la fase di purificazione del campione. L'analisi è stata condotta mediante il metodo descritto nel §7 mediante HPLC-ESI(+)/MS/MS. Sebbene in letteratura la quantificazione viene condotta mediante curva di calibrazione esterna, in questo lavoro è stato sviluppato un metodo per la determinazione della tossina mediante standard interno, metodo di quantificazione che mostra numerosi vantaggi tra i quali il più importante è una riduzione degli errori casuali strumentali o derivanti dalla procedura di preparazione del campione.

## **9.2 Parte sperimentale**

### **9.2.1 Materiali**

Lo standard di acido domoico e dell'ENK e i solventi sono gli stessi descritti nel § 7.2.1. Il materiale di riferimento certificato CRM-ASP-MUS-D, contenente un omogenato di *Mytilus edulis* contaminato da acido domoico in concentrazione certificata  $49 \pm 3 \mu\text{g g}^{-1}$  è stato fornito dal National Research Council del Canada.

Sono stati utilizzati delle provette in polietilene da centrifuga da 15 mL (Iwaki), dei filtri siringa in PTFE ( $\varnothing$  25 mm, 0.45  $\mu\text{m}$ ) (Phenomenex, Torrance, California, USA) montati su delle siringhe da 10 mL in vetro, dei filtri siringa in PTFE ( $\varnothing$  4 mm, 0.2  $\mu\text{m}$ ) (Phenomenex, Torrance, California, USA) montati su delle siringhe da 6 mL in polietilene e delle beute in vetro da 50 mL.

I campioni di molluschi sono stati trattati utilizzando un omogeneizzatore T10 basic Ultra-Turrax (IKA, Germany). Il bagno ad ultrasuoni è stato acquistato da Ultrasonic, FALC (Treviglio, Italia). La centrifuga Rotina 38 è stata fornita da Hettich Zentrifugen (Germany).

### 9.2.3 I campioni analizzati

I campioni analizzati in questo lavoro di tesi sono stati forniti dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZS) allo scopo di verificare la presenza della tossine in alcune zone dell'Alto Adriatico, già dimostrata da Ciminello et al. [10]. Le informazioni relative ai campioni analizzati sono riportate in tabella 9.1 dove viene specificato il nome attribuito dall'istituto di provenienza, la specie di mollusco analizzata, la zona di raccolta e la data nel caso in cui questa sia disponibile.

**Tabella 9.1.** Informazioni relative ai campioni analizzati nel presente lavoro.

Nome campione	Nome specie	Provenienza	Data di raccolta
A/1049	Mollusco mitilo ( <i>Galloprovincialis</i> )	-	-
A/1055	Mollusco vongola ( <i>V. Gallina</i> )	-	-
A/1092	Mollusco vongola verace ( <i>R. Semidecussatus</i> )	Prov. di Marano	-
A/1093	Mollusco mitilo ( <i>Galloprovincialis</i> )	Prov. di Ferrara	02/07/2012
A/1094	Mollusco vongola ( <i>V. Gallina</i> )	Prov. di Venezia	02/07/2012
A/1303	Mollusco vongola	Prov. di Trieste	28/07/2012
A/1304	Mollusco mitilo	Prov. di Trieste	28/07/2012
A/1305	Mollusco mitilo ( <i>Galloprovincialis</i> )	Laguna di Marano	28/07/2012
A/1429	Mollusco vongola verace ( <i>R. Semidecussatus</i> )	Laguna di Marano	-
A/1430	Mollusco mitilo ( <i>Galloprovincialis</i> )	Zona Trieste	18/08/2012
A/1431	Mollusco vongola ( <i>V. Gallina</i> )	Prov. di Venezia	20/08/2012
A/1440	Mollusco vongola verace ( <i>R. Semidecussatus</i> )	Laguna di Marano	21/08/2012
A/1441	Mollusco vongola verace ( <i>R. Semidecussatus</i> )	Laguna di Marano	21/08/2012
A/1442	Mollusco mitilo ( <i>Galloprovincialis</i> )	Zona Trieste	21/08/2012

La raccolta delle cozze e delle vongole è stata eseguita mediante l'uso di un rastrello a mano e appena campionati i molluschi sono stati sgusciati e privati di valva e bisso. I tessuti sono stati conservati in doppio foglio di alluminio a -20°C fino al momento dell'analisi.

### 9.2.4 Preparazione del campione

La procedura di preparazione del campione messa a punto in questo lavoro è stata studiata cercando di ottenere una procedura semplice e rapida che non utilizzi dei lunghi e costosi processi di purificazione ma in cui l'effetto matrice non vada ad inficiare la quantificazione o ad aumentare i limiti di rilevabilità.

Riportati a temperatura ambiente, 20 g di molluschi sono stati omogeneizzati mediante un mortaio e pestello in agata e una piccola quantità (circa 5 g) è stata trattata mediante omogeneizzatore Ultra-Turrax, precedentemente decontaminato con acqua e metanolo. 20 mg del campione sono stati posti in una provetta da centrifuga da 15 mL in polietilene, decontaminata con metanolo, e 200 ng assoluti di standard interno ENK sono stati aggiunti al campione fresco. I tessuti sono stati estratti in bagno ad ultrasuoni con 10 mL di metanolo per 15 minuti, centrifugati per 5 minuti a 3000 rpm e infine il surnatante è stato filtrato su una beuta in vetro da 50 mL mediante siringa in vetro munita di filtro in PTFE ( $\varnothing$  25 mm, 0.45  $\mu$ m). L'intera procedura è stata ripetuta una seconda volta e i due filtrati sono stati riuniti nella stessa beuta. 1 mL della soluzione così ottenuta è stato filtrato con un filtro in PTFE a porosità 0.2  $\mu$ m direttamente in una vial da autocampionatore da 2 mL. Il campione così ottenuto è stato analizzato mediante HPLC-ESI(+)-MS/MS come descritto nel § 7.2.

### ***9.3 Risultati e discussione***

Lo scopo principale di questo lavoro è l'eliminazione della fase di purificazione mediante SPE pur minimizzando l'effetto matrice prodotto nella sorgente electrospray. Sono state inizialmente considerate le procedure di estrazioni presenti in letteratura che fanno riferimento per la maggior parte alle procedure proposte da AOAC [3] oppure da Quilliam et al. [2] nelle quali viene usato come solvente estraente acido cloridrico 0.1N oppure acqua/metanolo 1:1.

Mentre in questi metodi la quantità di tessuto estratta supera sempre il grammo, in questo lavoro sono stati utilizzati solo 20 mg di mollusco omogenato al fine di minimizzare la matrice presente.

Il principale svantaggio dell'uso di un'estrazione con un acido impiegata da altri autori [2,3] è la stabilità della tossina. È stato infatti dimostrato che l'acido domoico a bassi pH decompone rapidamente dimezzando la sua concentrazione in una settimana [2].

La soluzione acqua/metanolo 50:50 usata da Quilliam et al. [2] invece presenta un recupero totale della tossina dalla matrice e nessun processo di decomposizione è stato osservato a distanza di una settimana dall'estrazione, conservando il campione congelato. Tuttavia tale composizione porta in soluzione numerose specie interferenti che dovrebbero essere evitate.

Aumentando la percentuale di solvente organico si verifica una maggiore precipitazione delle proteine e una minor estrazione delle sostanze lipidiche, anche se la solubilità dell'acido domoico diminuisce passando dall'acqua ( $7.6 \text{ g L}^{-1}$ ) al metanolo ( $0.66 \text{ g L}^{-1}$ ) [11].

L'aumento della quantità di solvente organico porta anche ad un vantaggio dal punto di vista dell'analisi cromatografica in quanto la cromatografia HILIC, usata in questo lavoro, richiede l'iniezione di una soluzione ad alto contenuto in solvente organico affinché l'analita venga ritenuto dalla colonna.

A tal proposito sono stati valutate due soluzioni di estrazione, metanolo puro e una soluzione metanolo/acqua 80:20. L'estrazione del campione è stata condotta due volte al fine di aumentare l'efficienza di estrazione. Nessun processo di purificazione è stato usato a meno di due filtrazioni con filtro in PTFE da  $0.45$  e da  $0.2 \mu\text{m}$  al fine di eliminare il particolato che potrebbe danneggiare la colonna.

### 9.3.1 Validazione del metodo

La validazione del metodo è stata effettuata mediante la stima dell'accuratezza, del recupero, dei valori di bianco procedurale, della ripetibilità e dei limiti di rilevabilità e quantificazione procedurali. La procedura pre-analitica è stata valutata al fine di quantificare l'acido domoico mediante l'uso dello standard interno. L'ENK è stata scelta come standard interno al fine di uniformare le procedure pre-analitiche nelle varie matrici (§8).

La validazione del metodo è stata condotta utilizzando sia il materiale di riferimento certificato CRM-ASP-MUS-D che dei *Mytilus edulis* freschi pescati nella laguna di Venezia a cui sono state aggiunte delle quantità note di acido domoico.

Inizialmente le performance dei due solventi di estrazione sono state valutate sui mitili freschi e in seguito si è proceduto a validare il metodo anche con il materiale di riferimento certificato, per evitare sprechi del costoso materiale.

Utilizzando delle soluzioni addizionate di acido domoico ( $0.01$ ,  $0.05$ ,  $0.1$ ,  $0.5$ ,  $1$ ,  $5$ ,  $10$ ,  $50$ ,  $100 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ ) e di standard interno ENK ( $10 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ ) preparate nella matrice ottenuta secondo la procedura descritta nel § 9.2.4 è stata valutata la linearità della risposta strumentale. È stata inoltre valutata la precisione strumentale a quattro livelli di concentrazione ( $0.01$ ,  $0.1$ ,  $1$  e  $10 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ ) e i coefficienti di variazione per entrambe le matrici sono risultati sempre inferiori al 10%. In figura 9.1 si riportano le curve di

calibrazione delle rette preparate nelle matrici ottenute con i due solventi di estrazione testati.

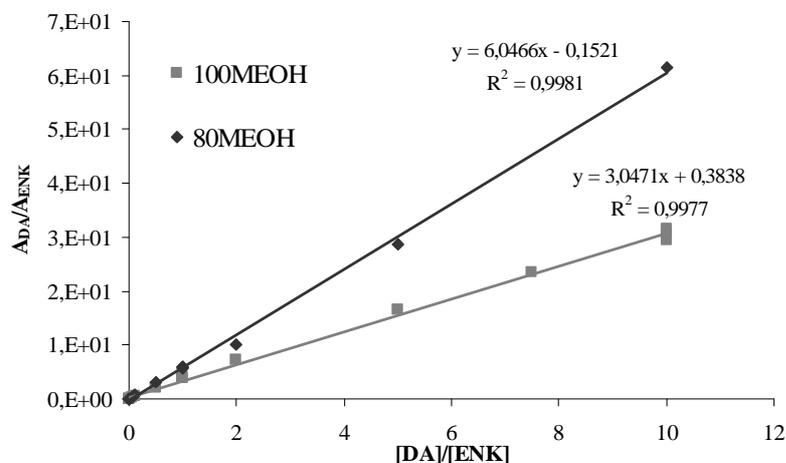
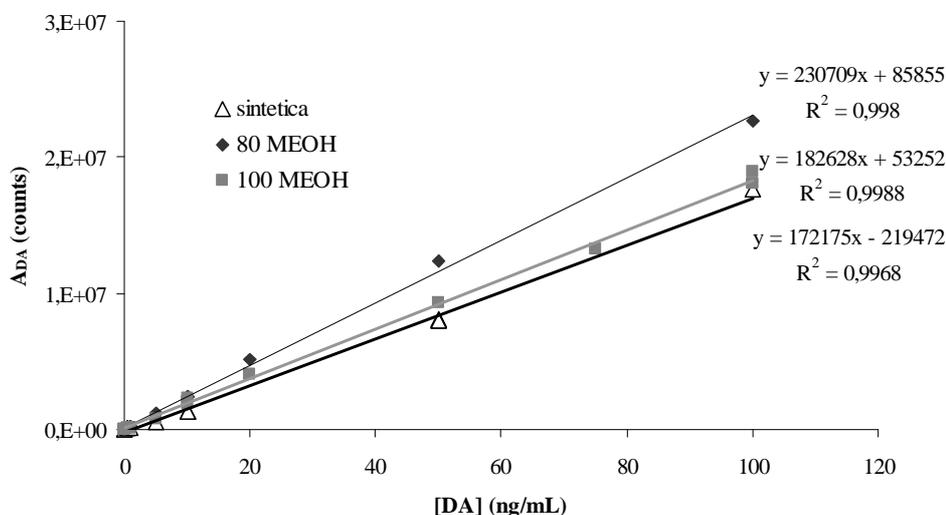


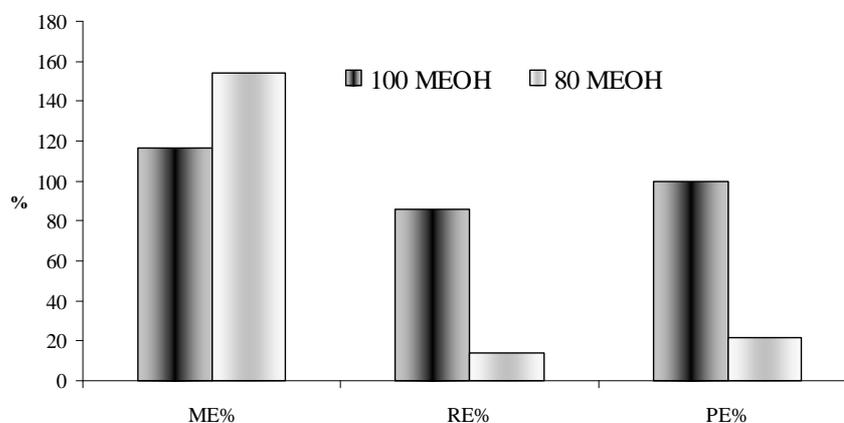
Figura 9.1. Curve di calibrazione preparate nelle due matrici studiate.

In figura 9.2 si riporta invece il confronto delle curve di calibrazione costruite nelle due matrici ottenute con i due solventi estraenti e quella in metanolo puro (sintetica) ponendo in ascissa la sola concentrazione dell'acido domoico e in ordinata la sua area in un range di concentrazione tra 0.01 e 100  $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$  al fine di valutare qualitativamente l'effetto matrice. Come ipotizzato precedentemente un contenuto elevato di solvente organico comporta una riduzione delle specie interferenti che possono portare all'effetto matrice. Questo è chiaramente visibile dalla figura 9.2 dove la retta costruita con le soluzioni preparate con una matrice composta da metanolo al 100% presenta un coefficiente di correlazione molto prossimo a quello della retta sintetica, mentre con una matrice al 80% di metanolo vi è un maggiore innalzamento del segnale.



**Figura 9.2.** Confronto delle curve di calibrazione ottenute con i due solventi estraenti testati e la retta sintetica.

Una valutazione quantitativa dell'effetto matrice come proposto da Matuszewski et al. [12] è stata condotta al fine di confrontare i due solventi estraenti. Sono stati definiti i valori di effetto matrice (ME), inteso come rapporto tra l'area della tossina sciolta in una matrice reale e quello della stessa diluita in metanolo puro, i valori di efficienza di estrazione (RE), come rapporto tra l'area dell'acido domoico aggiunto alla matrice prima dell'estrazione e lo stesso aggiunto dopo, e infine i valori di efficienza di processo (PE), parametro nel quale vengono considerati assieme i due contributi di ME e RE.



**Figura 9.3.** Confronto dell'effetto matrice (ME), dell'efficienza di estrazione (RE) e dell'efficienza del processo (PE) nell'analisi dell'acido domoico nei mitili estratti con metanolo o con una soluzione acquosa all'80% di metanolo.

Dalla figura 9.3 si può notare come l'effetto matrice sia minimo con entrambi i solventi estraenti anche se con metanolo puro l'estrazione porta a un ridotto effetto rispetto alla soluzione con l'80% di metanolo. Grazie ai bassi limiti di rilevabilità strumentale è infatti possibile rivelare l'acido domoico in una soluzione, contenente il campione, molto diluita senza utilizzare grandi quantità di tessuto da cui derivano le interferenze che causano l'effetto matrice.

Il parametro che più incide sull'efficienza del processo è l'efficienza di estrazione che come si può notare nel caso della miscela acquosa risulta inferiore al 20% mentre per il solvente puro risulta pari all'86%.

Secondo il metodo quantitativo proposto da Matuszewski et al. [12] la procedura preparativa che prevede l'estrazione con un metanolo puro porta a un'efficienza del processo pari al 100%.

La valutazione del miglior solvente estraente è stata inoltre condotta mediante la stima dell'accuratezza e dei recuperi valutati mediante il metodo dello standard interno. Le prove sono sempre state ripetute tre volte al fine di verificare la ripetibilità della procedura preparativa.

La quantificazione è stata fatta mediante l'uso di un fattore di risposta, ovvero di un punto della retta di calibrazione costruita in matrice. L'iniezione di tale soluzione prima e dopo l'analisi dei campioni permette di eliminare fluttuazioni strumentali e contemporaneamente di minimizzare gli effetti matrice.

Ai 20 mg di mitile fresco sono stati aggiunti 1000 ng assoluti di acido domoico mentre lo standard interno (200 ng assoluti) è stato aggiunto all'inizio della procedura per la valutazione dell'accuratezza mentre alla fine della filtrazione per valutare i recuperi. La concentrazione di acido domoico aggiunta è paragonabile a quella contenuta nel materiale certificato (RCM) per il quale è stata condotta la medesima procedura di valutazione dell'accuratezza e del recupero ovviamente senza aggiungere l'acido domoico che è già contenuto all'interno dei tessuti.

**Tabella 9.2.** Parametri relativi alla validazione del metodo preanalitico

solvente estraente	materiale di validazione	errore %	resa%	CV%
80% MEOH	mitile fresco	172	18±4	20
100% MEOH	mitile fresco	9	104±8	8
100%MEOH	RCM	-2	83±9	11

Come si può notare dalla tabella 9.2 dove si riportano i valori relativi alla validazione della procedura preanalitica, il solvente estraente contenente l'80% di metanolo porta a bassissimi recuperi dell'acido domoico con conseguente errata quantificazione, come evidenziato da un altissimo errore percentuale. L'estrazione con un 100% di metanolo invece porta a un recupero totale dell'acido domoico aggiunto al tessuto con basso errore percentuale e buona ripetibilità delle misure con un coefficiente di variazione percentuale inferiore al 10%.

La validazione con il 100% metanolo è stata ripetuta con il materiale di riferimento certificato (RCM) dove si può notare come l'accuratezza nella quantificazione viene mantenuta con un errore percentuale del -2% mentre il recupero è leggermente più basso. Questo è legato al fatto che l'acido domoico presente nel materiale certificato è assorbito nei tessuti, mentre nei mitili freschi lo standard è stato aggiunto alla matrice.

Il buon accordo fra i dati di recupero ma soprattutto la buona accuratezza del metodo indicano che l'estrazione mediante ultrasuoni risulta efficiente nel rompere i tessuti e liberare la tossina presente.

I limiti di rilevabilità (MDL) e di quantificazione (MQL) della procedura preanalitica sono stati valutati analizzando ripetutamente ( $n=3$ ) la matrice al quale è stato aggiunto solo lo standard interno. I MDL e MQL sono stati calcolati come rispettivamente 3 e 10 volte la deviazione standard del bianco procedurale.

La procedura preanalitica validata in questo lavoro permette di ottenere un valore di MDL di  $8.9 \text{ ng g}^{-1}$  e un MQL di  $63.1 \text{ ng g}^{-1}$ . Questi valori risultano paragonabili a quelli ottenuti mediante il più sensibile ma poco selettivo metodo fluorimetrico (MDL  $6 \text{ ng g}^{-1}$ ) [5]. Tali limiti risultano nettamente inferiori a quelli permessi da un sistema LC-UV dove si raggiungono MDL compresi tra  $0.1$  e  $1 \mu\text{g g}^{-1}$ . Ciminiello et al. [10] hanno sviluppato un metodo di analisi dei molluschi mediante cromatografia HILIC accoppiata a uno spettrometro di massa con analizzatore a triplo quadrupolo con MDL di  $63 \text{ ng g}^{-1}$  in cui non viene operata alcuna purificazione SPE e dove la quantificazione viene condotta mediante retta di calibrazione in matrice. Nonostante sia il metodo analitico che la preparativa sviluppati in questo lavoro siano molto simili al lavoro di Ciminiello et al. [10], il metodo qui proposto presenta un più basso limite di rilevabilità grazie all'impiego di una più piccola quantità di matrice che ha permesso di ridurre gli effetti matrice che influenzano il rapporto segnale rumore.

#### **9.4 Conclusioni**

È stata sviluppata una procedura pre-analitica per la determinazione dell'acido domoico nei molluschi mediante HPLC-ESI(+)-MS/MS. Questo è il primo studio in cui è stato usato lo standard interno come metodo di quantificazione, permettendo di prendere in considerazione errori casuali dovuti allo strumento o all'operatore. Un fattore di risposta preparato in matrice e iniettato prima e dopo il batch di analisi ha permesso di correggere le fluttuazioni di segnale strumentale e di evitare l'iniezione dell'intera retta di calibrazione ad ogni set di analisi.

La semplice procedura sviluppata prevede una doppia estrazione con un metanolo puro e due fasi di filtrazione, evitando la lunga e costosa fase di purificazione SPE. L'uso del metanolo ha permesso la precipitazione delle proteine e una scarsa estrazione del materiale lipidico, diminuendo sostanzialmente l'effetto matrice.

L'effetto matrice è stato valutato quantitativamente ed è stato dimostrato come la procedura di estrazione con il 100% di metanolo porti a un minimo effetto matrice che si riflette in un'eccellente efficienza del processo. Queste caratteristiche del metodo sono state ottenute grazie all'impiego di una piccola quantità di tessuto estratto (20 mg) e di una grande quantità di solvente estraente (20 mL), che hanno portato a un campione molto diluito ma che grazie ai bassi limiti di rilevabilità strumentale è stato possibile analizzare.

I limiti di rilevabilità procedurali ottenuti risultano inoltre confrontabili con quelli ottenibili con il sistema LC-FDL, il quale però risulta poco selettivo e sensibile alle interferenze. Il metodo MRM invece permette un riconoscimento inequivocabile della tossina a livelli piuttosto bassi, al di sotto dei limiti di legge ( $20 \mu\text{g g}^{-1}$ ).

Il metodo è stato applicato a 14 campioni reali descritti nel § 9.2.3 ma le concentrazioni di acido domoico sono risultate tutte al di sotto del limite di rilevabilità.

### ***9.5 Riferimenti bibliografici***

- [1] M.A. Quilliam, Manual on Harmful Marine Microalgae, IOC/UNESCO, Paris, 2003.
- [2] M.A. Quilliam, M. Xie, W.R. Hardstaff, Journal of Aoac International 78 (1995) 543.
- [3] A. International, in P. Cunniff (Editor), AOAC International, Gaithersburg, MA, USA, 1997, p. 2.
- [4] J.Y. Zhao, P. Thibault, M.A. Quilliam, Electrophoresis 18 (1997) 268.
- [5] K.J. James, M. Gillman, M. Lehane, A. Gago-Martinez, Journal of Chromatography A 871 (2000) 1.
- [6] M.A. Quilliam, Journal of Chromatography A 1000 (2003).
- [7] S. Pleasance, M.A. Quilliam, A.S.W. Defreitas, J.C. Marr, A.D. Cembella, Rapid Communications in Mass Spectrometry 4 (1990) 206.
- [8] P. Hess, S. Gallacher, L.A. Bates, N. Brown, M.A. Quilliam, Journal of Aoac International 84 (2001) 1657.
- [9] P. Hess, S. Morris, L.A. Stobo, N.A. Brown, J.D.G. McEvoy, G. Kennedy, P.B. Young, D. Slattery, E. McGovern, T. McMahon, S. Gallacher, Trac-Trends in Analytical Chemistry 24 (2005) 358.
- [10] P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, G.S. Magno, L. Tartaglione, M.A. Quilliam, A. Tubaro, R. Poletti, Rapid Communications in Mass Spectrometry 19 (2005) 2030.
- [11] M. Falk, P.F. Seto, J.A. Walter, Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie 69 (1991) 1740.
- [12] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Analytical Chemistry 75 (2003).



## **CAPITOLO 10**

### **Determinazione di acido domoico nell'aerosol atmosferico**

#### ***10.1 Introduzione***

Lo scopo di questo consiste nella messa a punto di un metodo per la determinazione dell'acido domoico in campioni di aerosol atmosferico, al fine di verificarne la presenza non ancora documentata di questa tossina nel comparto atmosferico.

Paddle [1] ha dimostrato come l'analisi delle tossine nell'aerosol atmosferico sia fondamentale in relazione alla grande tossicità di queste sostanze. Le biotossine possono infatti essere aerosolizzate mediante l'azione del vento e delle onde ed, entrate in atmosfera, possono venire a contatto direttamente con l'uomo portando a disturbi all'apparato respiratorio e irritazione alla pelle, oppure possono depositarsi nei cibi o nel terreno rappresentando così un'ulteriore sorgente di contatto umano.

Sebbene per l'acido domoico non vi siano ancora studi che dimostrano come questa tossina possa entrare nell'atmosfera, la ricerca deve comunque rivolgersi all'individuazione di nuove potenziali sorgenti che potrebbero portare danno alla salute umana e in generale degli essere viventi.

#### ***10.2 Parte sperimentale***

##### ***10.2.1 Campionamento***

I campioni analizzati nel presente lavoro sono stati raccolti presso l'Isola di Sacca San Biagio (Lat. 45° 25' 40.14" N, Long. 12° 18' 36.72" E) posta nei pressi del porto turistico della città di Venezia in un periodo compreso tra luglio e agosto del 2012.

Il campionamento è stato realizzato mediante un campionatore ad alto volume TE 5000 (Tisch Environmental Inc., OH, USA) designato per il campionamento di microinquinanti organici volatili, mediante una cartuccia in schiuma poliuretanicca, e presenti nel particolato, mediante un filtro in fibra di quarzo (QFF) (SLKC Inc., Eighty Four, To-13 model) della porosità di 1 µm.

I campioni analizzati in questo studio, riportati in tabella 10.1, sono i QFF i quali dopo esser stati campionati sono stati conservati in doppio strato di alluminio a -20°C.

Sono stati raccolti anche dei bianchi di campo per valutare eventuali interferenze all'analisi dovute al sistema di campionamento.

**Tabella 10.1.** Descrizione campioni di aerosol atmosferico analizzati nel presente lavoro

Data inizio campionamento	Data fine campionamento	Volume campionato(m <sup>3</sup> )
02/07/12	04/07/12	795.15
04/07/12	06/07/12	867.55
06/07/12	09/07/12	669.90
16/07/12	18/07/12	851.15
18/07/12	20/07/12	911.99
20/07/12	23/07/12	1188.55
24/07/12	26/07/12	861.99
27/07/12	30/07/12	1290.13
30/07/12	01/08/12	734.97
01/08/12	03/08/12	833.99
03/08/12	06/08/12	1070.49
07/08/12	08/08/12	499.68
08/08/12	09/08/12	449.25
28/08/12	29/08/12	415.78
29/08/12	30/08/12	514.34
30/08/12	31/08/12	439.87
31/08/12	03/09/12	1267.07
03/09/12	04/09/12	454.56
04/09/12	06/09/12	741.54
06/09/12	07/09/12	402.20

### 10.2.2 Materiali

Lo standard di acido domoico e dell'ENK e i solventi sono gli stessi descritto nel § 7.2.1.

Sono stati utilizzati dei tubi da ultracentrifuga Safe-Lock da 2 mL (Eppendorf AG, Amburgo, Germania) e dei filtri siringa in PTFE ( $\varnothing$  4 mm, 0.2  $\mu$ m) (Phenomenex, Torrence, California, USA) montati su delle siringhe da 6 mL in polietilene. I campioni sono stati estratti mediante bagno ultrasuoni fornito da Ultrasonic, FALC (Treviglio, Italia).

### 10.2.3 Preparazione del campione

Un ottavo del filtro è stata finemente suddiviso mediante pinze in acciaio e raccolto in una provetta da ultracentrifuga da 2 mL, precedentemente decontaminato mediante acqua e metanolo.

100 pg assoluti di standard interno sono stati aggiunti al filtro asciutto e successivamente 1 mL di una miscela 50:50 acqua metanolo sono stati impiegati per estrarre (30 minuti, 99% potenza, temperatura ambiente) l'acido domoico dalla matrice.

L'estratto è stato filtrato mediante filtri in PTFE con porosità 0.2  $\mu\text{m}$  al fine di rimuovere tutto il particolato che potrebbe danneggiare la colonna cromatografica. Il campione così ottenuto è stato analizzato mediante il metodo HPLC-ESI(+)-MS/MS descritto nel capitolo 7.

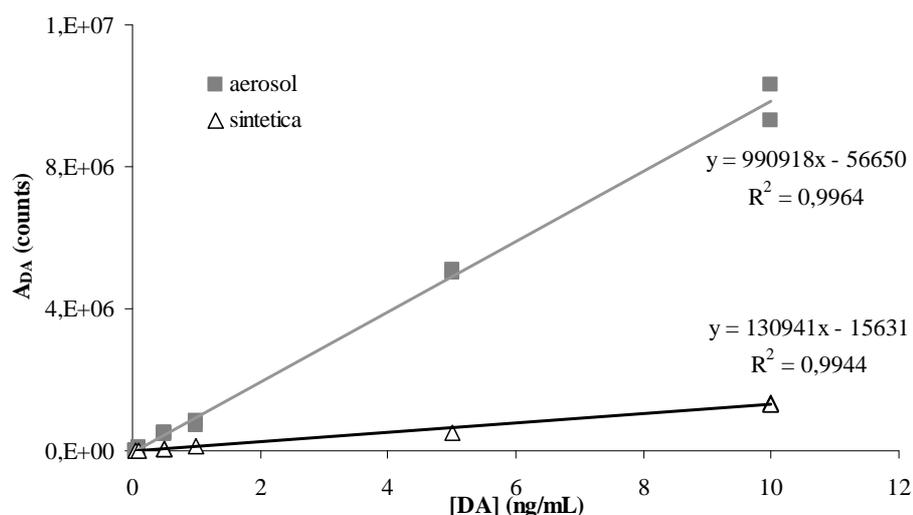
### ***10.3 Risultati e discussione***

#### *10.3.1 Validazione del metodo*

La validazione della procedura pre-analitica per la determinazione dell'acido domoico in campioni di aerosol atmosferico è stata condotta mediante la stima dell'accuratezza, del recupero, della ripetibilità delle prove e dei limiti di rilevabilità e di quantificazione procedurali. La quantificazione è stata condotta mediante l'uso dello standard interno ENK al fine di garantire maggior accuratezza nei risultati rispetto a una quantificazione condotta mediante retta di calibrazione esterna. I risultati ottenuti sono poi stati corretti per il fattore di risposta, calcolato da una soluzione a concentrazione nota di acido domoico e standard interno diluiti nella matrice esente da standard preparata secondo la procedura descritta in § 10.2.3. Il fattore di risposta permette di considerare le fluttuazioni strumentali nonché l'effetto matrice.

L'effetto matrice è stato valutato qualitativamente confrontando le curve di calibrazioni ottenute iniettando delle soluzioni a diversa concentrazione di acido domoico (0.05-10  $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$ ) preparate nella matrice ottenuta secondo la procedura descritta in § 10.2.3 e in una soluzione di metanolo.

Dalla figura 10.1 si può notare come la retta costruita in matrice presenti un coefficiente angolare più elevato rispetto quella sintetica.



**Figura 10.1.** Confronto delle curve di calibrazione ottenute con delle soluzioni di acido domoico preparate nella matrice ottenuta secondo la procedura riportata in § 10.2.3 e in metanolo puro.

L'accrescimento ionico indotto dall'effetto matrice viene dimostrato mediante il metodo quantitativo dell'effetto matrice proposto da Matuszewski et al. [2], ottenendo un valore del 220% e confermando quanto riscontrato dalla figura 10.1.

Sebbene non sia disponibile in commercio un materiale certificato, la valutazione dell'errore e del recupero percentuali sono stati possibile mediante l'aggiunta sul filtro in fibra di quarzo di una certa quantità di acido domoico (100 pg assoluti) mentre lo standard interno ENK (1 ng assoluto) è stato aggiunto assieme all'acido domoico per la valutazione dell'accuratezza e alla fine della filtrazione per il calcolo del recupero. La validazione è stata condotta seguendo la procedura pre-analitica riportata in § 9.2.3.

La procedura investigata in questo lavoro permette un recupero dell'acido domoico del  $77\pm 1\%$  con una ripetibilità procedurale del 1%, data dal coefficiente di variazione percentuale calcolato nei recuperi. La quantificazione mediante standard interno permette un errore medio percentuale del -4%, dimostrando quindi come la procedura possa essere accurata per la determinazione della tossina.

I limiti di rilevabilità e di quantificazione procedurali sono stati calcolati come tre e dieci volte la deviazione standard dei bianchi procedurali, ottenuti processando come descritto in § 10.2.3 dei bianchi di campo. Il metodo proposto in questo lavoro presenta un limite di rilevabilità di 50 fg assoluti e uno di quantificazione di 180 fg assoluti. Non essendo i filtri campioni, questi valori sono stati espressi come quantità assolute sul filtro.

Il fattore di risposta usato per correggere i dati ottenuti corrisponde alla pendenza di una curva di calibrazione costruita mediante l'analisi di sei soluzioni a concentrazione nota di acido domoico (0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 pg  $\mu\text{L}^{-1}$ ) e a concentrazione costante di standard interno ENK (1 pg  $\mu\text{L}^{-1}$ ) diluiti nella matrice ottenuta secondo la procedura descritta in § 10.2.3. L'equazione della curva ottenuta presenta un valore di coefficiente angolare di 2.3694 e una pendenza di 0.0935 con un coefficiente di regressione lineare di 0.9957. Ciascuna soluzione è stata iniettata ripetutamente (n=3) ottenendo dei coefficienti di variazione percentuali sempre inferiori al 10%.

#### ***10.4 Conclusioni***

È stato validato una procedura pre-analitica per la determinazione dell'acido domoico in campioni di aerosol atmosferico che permette di ottenere alto recupero dell'analita e basso errore percentuale.

La metodologia studiata prevede l'uso dello standard interno e la correzione dei dati mediante il fattore di risposta per ovviare ai problemi derivanti da errori casuali o da effetti matrici non eliminabili con la procedura pre-analitica.

Il metodo è stato applicato a venti campioni reali di aerosol atmosferico provenienti dalla laguna di Venezia in un periodo estivo dove è stata dimostrata (capitolo 8) la presenza a bassissime concentrazioni di acido domoico (1-16 fg  $\mu\text{L}^{-1}$ ). Tuttavia le concentrazioni trovate nei venti campioni di aerosol sono risultate al di sotto del limite di rilevabilità.

#### ***10.5 Riferimenti bibliografici***

- [1] B.M. Paddle, *Journal of Applied Toxicology* 23 (2003) 139.
- [2] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, *Analytical Chemistry* 75 (2003).



*III parte*

***LE TOSSINE ALIMENTARI:***

*l'ocratossina A*



## CAPITOLO 11

### Messa a punto di un metodo per la determinazione dell'ocratossina A mediante HPLC-ICP-MS

#### 11.1 Introduzione

##### 11.1.1. L'ocratossina A

Le ocratossine sono delle micotossine prodotte da numerose specie appartenenti ai generi *Aspergillus* e *Penicillium*. Sono dei metaboliti secondari e quindi non hanno un ruolo evidente nella crescita dell'organismo produttore [1].

Le ocratossine sono dei pentacetidi, derivanti dall'isocumarina legati a L-fenilalanina, in cui la variante più diffusa e più tossica è l'ocratossina A, sebbene esista anche l'analogo dechlorurato, l'ocratossina B, e i rispettivi esteri metilenici ed etilenici (figura 11.1).

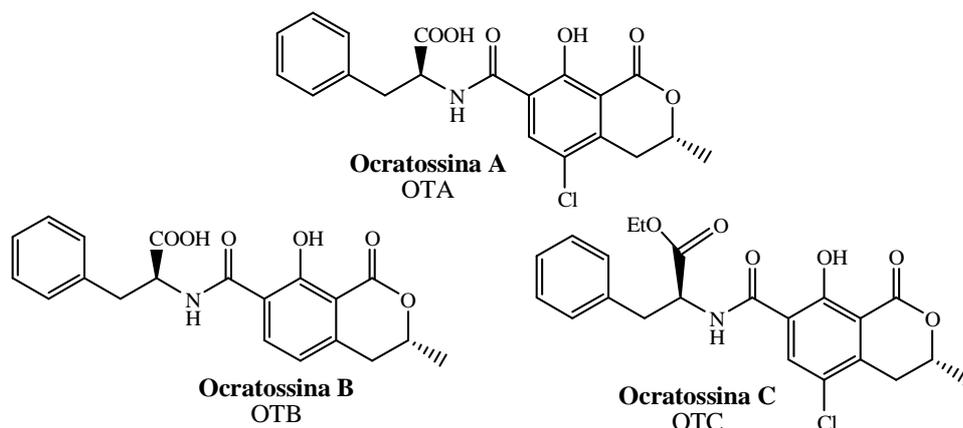


Figura 11.1. Strutture chimiche delle più comuni ocratossine.

L'ocratossina A risulta molto più tossica dell'ocratossina B e viene formata rapidamente *in vivo* dall'ocratossina C per idrolisi del gruppo etilenico.

È un composto cristallino incolore, solubile nei solventi organici polari, debolmente solubile in acqua e solubile in una soluzione acquosa di bicarbonato [2]. L'ocratossina A è un acido debole contenente un gruppo carbossilico con  $pK_a$  di 4.4 e un gruppo idrossilico con  $pK_a$  7.3 [3].

L'ocratossina A è un composto piuttosto stabile, resistente al calore e in soluzione alcolica può essere conservato a  $-18^\circ\text{C}$  senza perdite anche per anni, purchè venga

mantenuta al buio. La tossina è stabile in condizioni acide purchè il pH non sia inferiore a 1, condizione in cui avviene l'idrolisi acida del legame ammidico [4].

Una grande varietà di prodotti alimentari tra i quali cereali, frutta, caffè, birra e vino possono venir contaminati dall'OTA. Nel caso in cui tali alimenti vengano utilizzati come mangimi, l'ocratossina A può andare a contaminare il sangue, i reni e il fegato di maiali e pollame anche se risulta scarso l'accumulo nei tessuti muscolari e adiposi e nelle uova. Tali alimenti possono rappresentare anche un potenziale pericolo per la salute umana [1].

Questa sostanza viene considerata una potente nefrotossina ed epatotossina con proprietà teratogene, mutageniche, cancerogeniche e immunosoppressive anche a livello di tracce. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) ha imposto un livello di tollerabilità giornaliero per l'OTA di 14 ng per kg di peso corporeo [5].

La regolamentazione europea fissa un livello massimo di ocratossina A compreso tra 3 e 10 ppb a seconda dei diversi prodotti alimentari e ne abbassa il limite (0.5 ppb) per gli alimenti destinati a neonati.

Nel 1993, l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) ha classificato l'ocratossina A come possibile cancerogena per l'uomo (gruppo 2B) [6].

L'esposizione umana per consumo di prodotti alimentari contaminati porta a livelli rivelabili nei fluidi umani, nel sangue e nei tessuti [7]. Nell'uomo il metabolismo è piuttosto lento con un'emivita di più di 30 giorni, a causa di un riassorbimento da parte del circolo entero-epatico, dal riassorbimento dalle urine dopo la secrezione tubulare e anche dal forte legame alle proteine plasmatiche [8].

### *11.1.2 I metodi di analisi: stato dell'arte*

La cromatografia liquida ad elevate prestazioni accoppiata ad un rivelatore fluorimetrico è la tecnica analitica più utilizzata per l'analisi delle ocratossine e dei loro metaboliti grazie alle caratteristiche fluorimetriche insite nelle molecole. La tecnica offre la miglior selettività e sensibilità rispetto ad altri detector.

Valenta [9] riporta un'interessante *review* dove vengono schematizzati i più rilevanti metodi sviluppati per la determinazione dell'ocratossina A mediante tecniche di cromatografia liquida. Il metodo cromatografico più utilizzato è la separazione su colonna C18 mentre le fasi mobili devono essere acidificate per evitare pesanti fenomeni di *tailing* o adsorbimenti non specifici nella colonna a causa delle

caratteristiche acide della tossina. Le fasi mobili più comuni sono metanolo e acetonitrile con acido acetico o fosforico diluiti. La miscela acqua-acetonitrile presenta una minor viscosità rispetto a quella acqua-metanolo offrendo una miglior separazione. La rivelazione mediante detector a fluorescenza viene condotta impostando un  $\lambda_{\text{exc}} = 330$  nm e una  $\lambda_{\text{em}} = 460$  nm. I limiti di rilevabilità di questo metodo variano a seconda del metodo cromatografico utilizzato tra 0.005 e 4 ng mL<sup>-1</sup> [9].

La cromatografia a coppia ionica viene usata nei metodi di Breitholtz-Emanuelsson et al. [10-12] per la determinazione della tossina nel sangue umano e nel latte bovino. La tecnica era stata precedentemente utilizzata per la determinazione dell'ocratossina A nel caffè [13] aggiungendo il contro-ione alla fase mobile.

L'uso del sistema LC-MS per la determinazione dell'ocratossina A è stata proposta per la prima volta da Abramson [14] e da Rajakyla et al. [15], utilizzando rispettivamente l'introduzione diretta del liquido e la thermospray come sistema di interfacciamento. Tuttavia tali metodi presentavano notevoli svantaggi in termini di robustezza, sensibilità ed erano piuttosto complessi da applicare.

Il primo lavoro che utilizza una strumentazione moderna può essere attribuito a Becker et al. [16], in cui è stato usato un sistema HPLC-ESI-MS/MS per la quantificazione dell'ocratossina A nel caffè, nella birra e nel grano. La molecola di ocratossina A viene analizzata in modalità positiva, in cui lo ione molecolare protonato ad  $m/z$  404 viene frammentato portando ai frammenti ad  $m/z$  386, 358 e 239 rispettivamente relativi alla perdita di acqua, di acqua e monossido di carbonio e della fenilalanina. L'analisi mediante acquisizione *selected reaction monitoring* viene condotta in modalità positiva in quanto la ionizzazione negativa porta allo ione deprotonato ad  $m/z$  402 che frammenta portando al solo ione non specifico ad  $m/z$  358 corrispondente alla perdita di acqua. È stato ottenuto un limite di rilevabilità di 20 pg, valore comparabile a quanto ottenuto con una rivelazione fluorimetrica.

Lau et al. [17] riportano un confronto tra l'interfacciamento mediante sorgente ESI e l'APCI sottolineando come l'ESI dimostri una maggiore sensibilità ionizzando positivamente l'analita.

Mentre con la rivelazione fluorimetrica la retta di calibrazione esterna risulta il metodo di quantificazione più usato, con la spettrometria di massa vi sono numerosi metodi nei quali viene usata la diluizione isotopica ottenendo quantificazioni più accurate [18].

## ***11.2 Scopo del metodo***

Lo scopo di questo lavoro consiste nella messa a punto di un metodo per la determinazione dell'ocratossina A mediante HPLC-ICP-MS al fine di diminuire i limiti di rilevabilità.

È necessario sviluppare una procedura di derivatizzazione per introdurre un eteroatomo nella molecola rendendola rivelabile allo spettrometro di massa con sorgente al plasma.

I parametri relativi al sistema ICP-MS devono essere ottimizzati per rendere possibile un interfacciamento con la cromatografia in fase inversa.

Per poter determinare l'ocratossina A mediante l'eteroatomo ad essa legata mediante la procedura di derivatizzazione è necessario studiare una cromatografia che permetta di separare lo ione libero da quello complessato.

Infine dovranno essere valutate le performance del metodo sviluppato.

## ***11.3 Approccio sperimentale***

Lo sviluppo del metodo per la determinazione dell'ocratossina A mediante tecnica ifenata HPLC-ICP-MS ha dimostrato numerosi problemi nei vari passaggi della messa a punto.

La derivatizzazione ovvero l'introduzione di un eteroatomo nella struttura chimica della molecola non è stata condotta con le normali tecniche di metal tag (§ 11.4.1) a causa della mancanza dell'opportuno sito di reazione. Sono state sfruttate le caratteristiche del gruppo carbossilico di formare legami covalenti polari con l'argento per sintetizzare il complesso con l'ocratossina A. La necessità di avere una procedura di derivatizzazione veloce, con alta ripetibilità e riproducibilità e che eviti complessi con più atomi di argento ha reso indispensabile l'uso di una cartuccia a scambio cationico commercialmente disponibile. È stata ottenuta una procedura di derivatizzazione semplice, veloce e ripetibile (§ 11.4.1)

Una volta ottenuto il complesso, lo sviluppo del metodo si è articolato in due parti: prima lo spettrometro di massa e successivamente il metodo cromatografico.

Inizialmente è stato messo a punto un metodo ICP-MS che permettesse l'accoppiamento con un sistema cromatografico nel quale venisse usato solvente organico. Sono stati studiati degli opportuni accorgimenti per minimizzare perdite di segnale e nello stesso

tempo prevenire l'usura delle parti strumentali a causa dell'uso di solvente organico (§11.4.3).

Una volta sviluppato il metodo per poter rivelare quanto eluito dalla colonna cromatografica, è stata affrontata la scelta dell'opportuna cromatografia per poter separare il complesso dall'argento libero. Sono stati valutati diversi tipi di cromatografia in cui sono stati sfruttati meccanismi diversi.

Poiché l'identificazione degli analiti utilizzando il sistema HPLC-ICP-MS viene fatta per confronto dei tempi di ritenzione, è stata inizialmente iniettata una soluzione di ioni argento. Questo test iniziale ha messo in evidenza il problema del recupero degli ioni argento dalla colonna cromatografica. Per studiare quali fasi stazionarie e quali fasi mobili permettessero di evitare precipitazioni nella fase stazionaria o sequestramenti degli ioni argento è stato intrapreso uno studio in provetta simulando quanto avviene in colonna (§ 11.4.2).

Questo studio ha suggerito quali potevano essere le fasi stazionarie e le fasi mobili più opportune per poter evitare problemi di recupero post-colonna (§ 11.4.4).

Nonostante questo tipo di valutazioni preliminari e il test di numerose colonne e fasi mobili usate non è stato ottenuta nessuna separazione cromatografica del complesso dall'argento libero. Inoltre l'uso del sistema ICP-MS non ha permesso di comprendere quali siano i meccanismi in gioco all'interno della colonna in quanto poteva rivelare solo lo ione argento.

È stato necessario utilizzare un sistema HPLC-ESI-MS che permette la identificazione di tutte le specie in gioco compresa l'ocratossina A per poter comprendere i problemi di stabilità del complesso all'interno del sistema cromatografico.

## ***11.4 Risultati e discussione***

### ***11.4.1 Metal tag dell'ocratossina A***

La derivatizzazione delle molecole è una tecnica ormai diffusa nella chimica analitica e porta a molteplici vantaggi tra i quali una più alta sensibilità strumentale e una maggiore selettività [19].

Questa procedura tuttavia rappresenta uno *step* aggiuntivo alla preparazione del campione, ma è fondamentale nel caso in cui la molecola non possa essere rivelata dal detector a meno di una derivatizzazione, come nel caso dell'ICP-MS in cui altrimenti si potrebbero rivelare solo le molecole contenenti un eteroatomo.

Recentemente i campi di applicazione della tecnica ICP-MS si sono infatti estesi alla *targeting bio-molecular chemistry* e al campo della proteomica, ampiamente dominata dalle tecniche ESI- e MALDI-MS. L'ICP-MS, oltre a biomolecole contenenti eteroatomi, permette quindi di analizzare anche molecole in cui viene introdotto un metallo usando un agente bifunzionalizzato chelante legato covalentemente alla molecola di interesse oppure mediante nanoparticelle contenenti un metallo. Queste strategie prevedono vantaggi come l'alta sensibilità, linearità e ridotti effetti matrice [20].

L'analisi mediante ICP-MS di piccole molecole organiche si sta sviluppando in questi anni [21-25]. Cartwright et al. [23] e Leavens et al. [25] hanno studiato degli appropriati agenti derivatizzanti contenenti fosforo per gli acidi carbossilici e le ammine. A seconda dei siti reattivi presenti nelle proteine vi sono numerose tecniche di derivatizzazione con un metallo a seconda del tipo di reagente impiegato e del metallo utilizzato. L'ammina primaria come sito di reazione nella molecola target viene utilizzata anche nella tecnica di derivatizzazione *metal element chelated tag* in cui viene introdotta una terra rara in un composto tridentato che è stato legato covalentemente alla molecola in esame [20]. In letteratura si trovano pochi metodi che utilizzano il gruppo carbossilico come sito reattivo per la reazione di derivatizzazione che prevede l'introduzione di un metallo nella molecola per poterla analizzare all'ICP-MS. Tale gruppo funzionale è stato invece intensamente utilizzato in gas-cromatografia nella reazione di esterificazione per rendere le molecole volatili e termostabili [19].

L'ocratossina A presenta nella propria struttura chimica un atomo di cloro che potrebbe essere impiegato per l'analisi mediante ICP-MS senza ulteriori *step* di derivatizzazione. Il cloro tuttavia presenta una scarsa precisione di analisi nella determinazione ICP-MS a causa del alto potenziale di ionizzazione e un alto limite di rilevabilità legato all'alto valore di background causato dalla contaminazione con sostanze clorurate della strumentazione e dell'ambiente di lavoro. Queste considerazioni precludono quindi l'uso del cloro nell'analisi ICP-MS dell'ocratossina A che richiede quindi una procedura di derivatizzazione per poter essere realizzata.

A nostra conoscenza non sono presenti in letteratura metodi di derivatizzazione già validati in quanto i metodi analitici che utilizzano la fluorimetria o la spettrometria di massa accoppiata con sorgenti a pressione atmosferica sono i più utilizzati. Tuttavia lo scopo di questo lavoro prevede lo sviluppo di un metodo alternativo che possa sfruttare

la grande sensibilità dell'ICP-MS per migliorare i limiti di rilevabilità nell'ocratossina A ed eliminare problemi legati all'effetto matrice derivante dal campione.

Giesen et al. [26] hanno sviluppato un metodo d'analisi dell'ocratossina A nei vini mediante un saggio immunologico con sistema di rivelazione ICP-MS, basato su un anticorpo contenente nanoparticelle di oro. Il limite di rilevabilità è  $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$  e il metodo risente di scarsa precisione legata al saggio biochimico, che comporta anche una lunga procedura di preparazione del campione.

L'ocratossina presenta come possibili siti per la reazione di derivatizzazione un gruppo carbossilico e un gruppo ossidrilico mentre il gruppo funzionale amminico è secondario e non primario come prevedono le reazioni di derivatizzazione descritte da Prange et al. [20].

I carbossilati sono un'importante classe di leganti in chimica bioinorganica. Nel complesso metallo carbossilato il centro metallico cationico ( $M^{n+}$ ) si combina con il gruppo carbossilato anionico ( $\text{RCOO}^-$ ), mediante legame ionico o covalente polare a seconda delle proprietà chimico-fisiche del gruppo R [27].

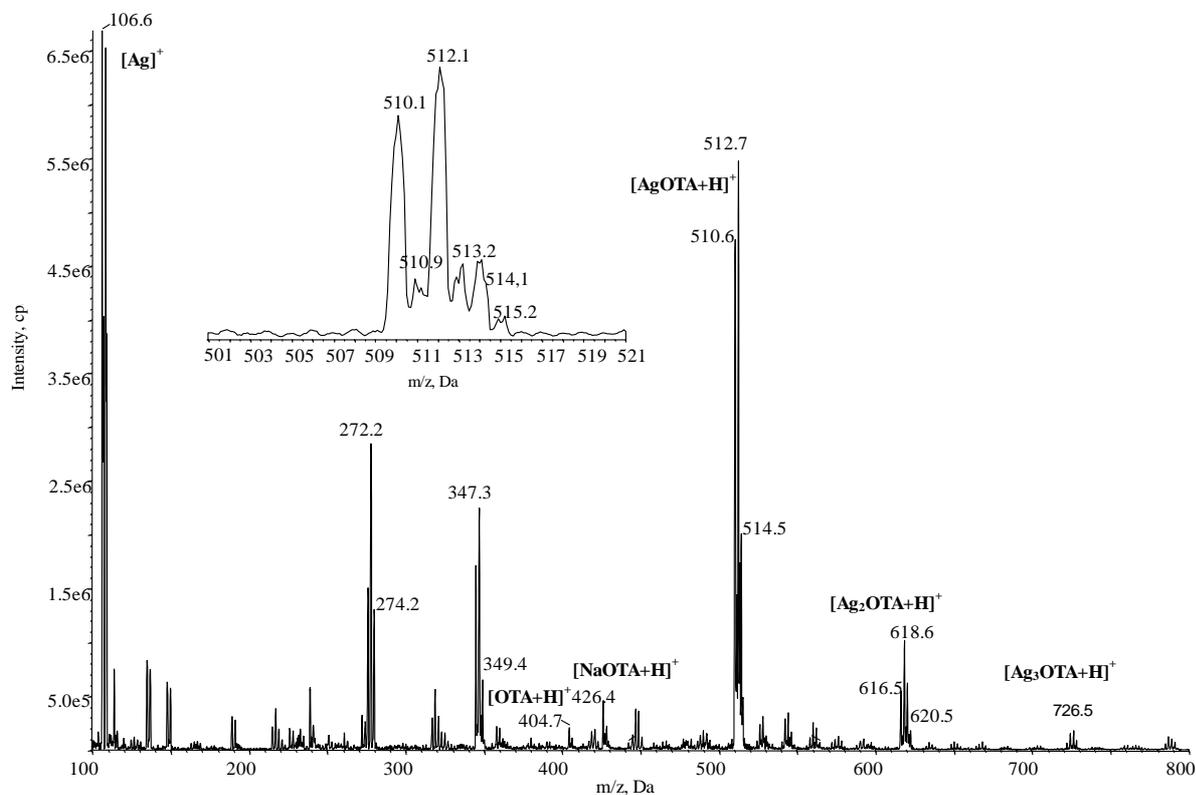
Il gruppo funzionale carbossilico presenta quattro coppie di elettroni spaiati posti sugli atomi di ossigeno messi a disposizione per la formazione del legame con il metallo. Ci sono cinque diversi tipi di coordinazione per i gruppi carbossilici: i sali carbossilati di  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  e  $\text{Cs}^+$  presentano delle interazioni di tipo coulombiano tra il metallo e l'anione organico, mentre legami polari covalenti possono formarsi se il metallo è legato ad un unico ossigeno della funzionalità carbossilica (monodentato), oppure a due ossigeni formando un anello (bidentato chelato) o un ponte (bidentato a ponte) [28].

Lo ione argento possiede una bassa densità di carica che lo porta ad agire come debole acido di Lewis tendendo ad avere affinità per i leganti ricchi di elettroni come i gruppi carbossilici. Ci sono molti complessi argento carbossilato caratterizzati da diverso tipo di coordinazione e il legame argento ossigeno ha una forte influenza sulla morfologia del complesso [28].

Le caratteristiche strutturali della molecola hanno fatto ipotizzare che il gruppo carbossilico dell'ocratossina A potesse essere un opportuno sito di reazione.

La derivatizzazione studiata in questo lavoro prevede infatti la reazione di argento nitrato ( $10 \mu\text{mol}$ ) con il gruppo carbossilico dell'ocratossina A ( $0.25 \mu\text{mol}$ ) in una soluzione acquosa. La reazione avviene a temperatura ambiente portando istantaneamente ai prodotti. La soluzione ottenuta viene diluita a una ipotetica concentrazione di  $1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  di ocratossina complessata supponendo che la conversione

sia stata del 100%. Tale soluzione viene analizzata mediante infusione diretta in ESI-MS utilizzando uno spettrometro di massa con analizzatore a triplo quadrupolo API 4000 (Applied Biosystem, MSD SCIEX, Toronto, Ontario, Canada) dotato di sorgente Turbo V utilizzata in Turbo Ion Spray (TIS).



**Figura 11.2.** Spettro di massa in *full scan* della soluzione ottenuta dalla reazione di derivatizzazione.

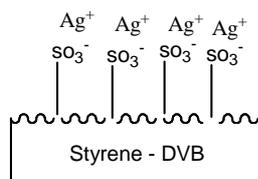
In figura 11.2 si riporta lo spettro di massa relativo al *full scan* nel primo quadrupolo della soluzione ottenuta dalla reazione di derivatizzazione.

La specie metallica ionica in eccesso nel sistema di reazione è chiaramente visibile dal cluster isotopico caratteristico a  $m/z$  107 e 109 dove sono presenti due segnali con intensità paragonabile.

A  $m/z$  404 e a  $m/z$  426 sono presenti i segnali relativi rispettivamente all'ocratossina A non reagita e al suo addotto con il sodio mentre il complesso con l'argento è chiaramente visibile ad  $m/z$  510 e 512. Un'acquisizione in *full scan* in piccolo range di massa è stata condotta al fine di definire il pattern isotopico caratteristico del complesso. Tale cluster evidenzia sia la presenza dell'argento i cui isotopi stabili  $^{107}\text{Ag}$  e  $^{109}\text{Ag}$  hanno rispettivamente un'abbondanza di circa il 52% e il 48% ma anche il cloro i cui isotopi hanno un'abbondanza rispettivamente del 75% ( $^{35}\text{Cl}$ ) e del 25% ( $^{37}\text{Cl}$ ). Sono presenti anche complessi dell'ocratossina A con due e con tre atomi di argento,

composti che portano a una diminuzione dell'efficienza di derivatizzazione che non decorre così a un unico prodotto. I segnali a  $m/z$  347 e 272 presentano il cluster isotopico dell'argento e sono relativi a delle frammentazioni in sorgente dello ione  $[AgOTA+H]^+$  (tabella 11.5).

La necessità di rendere la procedura di derivatizzazione automatizzabile e facilmente applicabile ai campioni reali ha reso indispensabile sviluppare un metodo alternativo della procedura di derivatizzazione che non prevedesse l'introduzione di controioni che potrebbe competere con la reazione e portare interferenze nel sistema strumentale. A tal proposito sono state utilizzate delle cartucce Maxi-Clean IC-Ag (0.5 mL) commercializzate dalla Alltech (Italia) usate normalmente per eliminare i cloruri dalle acque e composte da una fase stazionaria polimerica funzionalizzata con gruppi solfonici a cui sono legati degli ioni argento (figura 11.3). Tali cartucce presentano una capacità di scambio di  $2.1 \text{ meq L}^{-1}$  e un limite di esclusione molecolare di 1000 Da. Queste caratteristiche lo rendono quindi un metodo preparativo dei campioni efficiente per eliminare molecole ad alto peso molecolare che potrebbero interferire nell'analisi.



**Figura 11.3.** Fase stazionaria delle colonnine IC-Ag utilizzate per la derivatizzazione.

Una soluzione acquosa contenente ocratossina A ad una concentrazione di  $1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  è stata filtrata mediante cartuccia IC-Ag precedentemente lavata con 5 mL di acqua ultrapura. La soluzione ottenuta è stata analizzata mediante ESI-MS.

Lo spettro ottenuto dall'analisi ESI-MS è risultato molto simile a quello riportato in figura 11.2 ma sono presenti solo i segnali relativi all'argento libero e all'ocratossina complessata a un unico atomo di argento mentre non sono più presenti i segnali relativi agli addotti con due e tre atomi di argento. Tale procedura permette quindi di ottenere un solo complesso con l'argento e non è più presente lo ione relativo all'ocratossina A, come reagente di partenza.

Si può quindi concludere che la procedura di derivatizzazione messa a punto con la cartuccia IC-Ag è selettiva, non introduce nel campione controioni perché rimangono legati alla colonna. La resa di derivatizzazione non può essere determinata mediante infusione diretta ESI-MS ma la tecnica di spettrometria di massa deve essere interfacciata alla cromatografia (§ 11.4.3).

### *11.4.2 Prove preliminari per individuare il metodo cromatografico*

Il metodo cromatografico ha come principale obiettivo la separazione dello ione libero non reagito dal complesso ocratossina A-argento. L'ICP-MS, riuscendo a rivelare solo gli eteroatomi, non permette di valutare quando l'ocratossina A non reagita sia eluita dalla colonna.

Le tecniche cromatografiche ad esclusione dimensionale e a scambio anionico sono le migliori quando si vuole interfacciarle a un sistema ICP-MS in quanto in queste tecniche vengono usate delle fasi mobili con ridotto contenuto in solvente organico.

Tuttavia la cromatografia ad esclusione dimensionale non può essere applicata alle piccole molecole, come l'ocratossina A e quindi è stata esclusa dalle possibili cromatografie investigate.

In letteratura sono pochissimi gli studi cromatografici sui complessi organici con l'argento.

Wan et al. [29] hanno sviluppato una separazione cromatografica per l'analisi di complessi di argento legati a un tetra-(pentafluorophenyl)-porfolattone. È stata utilizzata una cromatografia a fase normale con dietil etere e esano come fasi mobili. Tale procedura non può essere però applicata per l'accoppiamento al sistema ICP-MS a causa delle fasi mobili usate.

Al fine di investigare il miglior metodo cromatografico sono stati studiati diversi tipi di fasi stazionarie in cui il meccanismo di ritenzione ipotizzato risulta estremamente differente:

- fase stazionaria C18 a base silice: l'argento ionico dovrebbe non essere ritenuto dalla colonna ed uscire in corrispondenza del tempo morto mentre il complesso si ripartirà a seconda delle caratteristiche chimiche della molecola;
- fase stazionaria a scambio cationico: l'argento libero dovrebbe essere trattenuto dalla colonna, mentre il complesso si ripartirà secondo le proprie caratteristiche chimico fisiche;
- fase stazionaria a scambio anionico: il metallo come ione libero positivo non dovrebbe essere trattenuto dalla colonna, mentre modulando il pH della molecola che presenta delle funzionalità deprotonabili è possibile far ritenere il complesso nella colonna;
- fase stazionaria di grafite: presenta delle caratteristiche tali da permettere una separazione tra specie cariche libere e specie neutre in quanto tale fase

stazionaria risponde in maniera diversa cambiando la stessa morfologia a seconda delle specie che vi entrano in contatto.

Al fine di studiare se durante l'eluizione cromatografica si verificassero delle precipitazioni dell'argento o se la fase stazionaria sequestrasse l'argento, è stato realizzato uno studio in condizione di equilibrio simulando i meccanismi di interazione che potrebbero avvenire nel corso di una separazione cromatografica dove sono invece presenti condizioni di pseudo-equilibrio.

In una provetta da ultracentrifuga sono stati posti 40 mg di fase stazionaria e 200  $\mu\text{L}$  di fase mobile, sui quali sono stati aggiunti 100  $\mu\text{L}$  di una soluzione di argento nitrato 6 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  preparata nello stesso solvente usato come fase mobile.

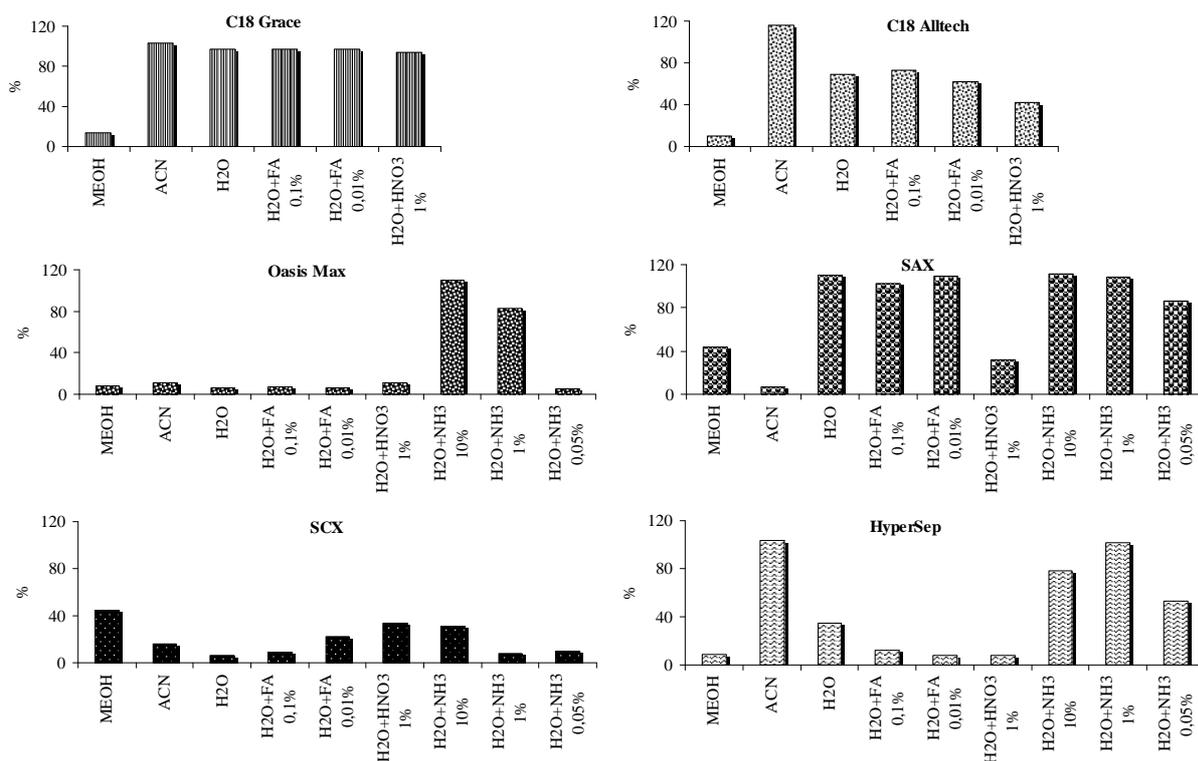
Il sistema fase stazionaria-fase mobile è stato condizionato per 15 minuti prima dell'aggiunta dell'argento mentre dopo l'aggiunta il sistema è stato posto in agitazione per 15 minuti e quindi centrifugato.

Il surnatante è stato diluito e l'argento totale è stato quantificato mediante analisi ICP-MS usando una calibrazione esterna.

Le caratteristiche delle fasi stazionarie usate in questo esperimento sono riportate in tabella 11.1, mentre la percentuale di argento presente nella fase mobile dopo l'interazione con la fase stazionaria viene riportata in figura 11.4.

**Tabella 11.1.** Caratteristiche fasi stazionarie usate per la valutazione delle interazioni con l'argento.

Tipo	Ditta	Nome	Base	Caratteristiche
inversa	Grace	C18 Max	silice	carico di carbonio 17%; endcapped
inversa	Alltech	C18 Prevail	silice	carico di carbonio 11%; endcapped; adatta anche per un 100% $\text{H}_2\text{O}$
anionico	Waters	Oasis Max	polimerica	capacità di scambio 0.2 mg/g
anionica	Alltech	SAX	polimerica	capacità di scambio 1.0 meq/L; gruppo funzionale legato tetrametil ammonio
cationica	Alltech	SCX	polimerica	capacità di scambio 2.0 meq/L; gruppo funzionale: benzene acido solfonico
grafite	Thermo	Hypersep	100% carbone	stabile sull'intero range di pH



**Figura 11.4.** *Recovery* di argento presente nella fase mobile dopo l'interazione con la fase stazionaria utilizzando diverse fasi mobili e le fasi stazionarie descritte in tabella 11.3.

Le fasi mobili investigate sono acqua, metanolo e acetonitrile, acqua acidificata allo 0.1% e 0.01% con acido formico, acqua acidificata con acido cloridrico 1% e acqua basificata con ammoniaca 0.05%, 1% e 10%. Le fasi stazionarie a fase inversa in base silice non sono state trattate con le soluzioni acquose basiche in quanto non sono stabili in questo range di pH.

Dalla figura 11.4 si può notare come alte percentuali di argento nella fase mobile sono state trovate usando fasi stazionarie in fase inversa (C18 Grace e Alltech) sebbene in presenza di metanolo la percentuale diminuisca drasticamente.

Si nota inoltre una notevole differenza tra le fasi stazionarie anioniche: la fase stazionaria Oasis Max sequestra la maggior parte dell'argento con tutte le fasi mobili ad eccezione di soluzioni acquose ad alto contenuto di ammoniaca. Usando la fase SAX invece l'argento è presente in soluzione ad eccezione del caso in cui vengano usati solventi organici o soluzioni acquose ad elevato pH. La colonna a scambio cationico SCX, come prevedibile, sequestra efficacemente l'argento usando tutte le fasi mobili studiate.

Infine recuperi efficienti dell'argento si ottengono usando acetonitrile e acqua basificata con la fase stazionaria in grafite (HyperSep).

#### 11.4.2 Ottimizzazione ICP-MS per l'accoppiamento con HPLC

L'accoppiamento ICP-MS con una cromatografia liquida non presenta grosse difficoltà se viene utilizzata un tipo di cromatografia in cui vengano usate solo soluzioni acquose a diverso pH e con diverso contenuto salino. La cromatografia in fase inversa (RP) accoppiata con uno spettrometro di massa mediante sorgente al plasma (ICP-MS) invece richiede opportuni accorgimenti a causa delle proprietà riduttive del sistema ICP. Il solvente organico introdotto nella sorgente ICP viene ridotto a carbonio elementare, il quale può andare a depositarsi nelle parti strumentali quali il *sampler cone*, lo *skimmer* o le lenti ioniche.

Utilizzando una cromatografia in fase inversa è indispensabile l'impiego di solventi organici quali metanolo o acetonitrile per favorire l'eluizione degli analiti. Il metanolo è comunque il solvente migliore in quanto contiene un solo atomo di carbonio disponibile alla riduzione.

Al fine di ridurre il carico di solvente nella sorgente una colonna con diametro interno 2.1 mm è preferibile per garantire un minor flusso in sorgente che può arrivare quindi ad un massimo di 0.3 mL min<sup>-1</sup>. La soluzione ideale per risolvere questo problema sarebbe l'uso di colonne capillari o colonne nano in cui vengono impiegati flussi dell'ordine dei µL min<sup>-1</sup> o addirittura inferiori ma tale soluzione richiede l'accoppiamento con una specifica strumentazione.

Un'altra soluzione potrebbe essere quella di prevedere uno split del flusso post-colonna con evidenti perdite nella sensibilità.

Alcuni autori riportano l'uso di una membrana di desolvatazione [30] o di una *spray chamber* fredda [31] per ridurre il carico di solvente organico che arriva al plasma.

Altro accorgimento importante per diminuire il deposito del carbonio nel sistema è l'introduzione di un flusso di ossigeno come *optional gas* usando un connettore modificato situato tra la *spray chamber* e la torcia. La quantità di ossigeno dovrebbe essere proporzionale al carico di solvente organico per poter convertire tutto il metanolo o l'acetonitrile nelle forme gassose CO/CO<sub>2</sub>. In presenza di ossigeno il plasma passa da riducente ad ossidante, portando, nel caso in cui sia in eccesso, a una reattività estesa verso le parti metalliche dello strumento oltre che verso il solvente. Nella configurazione convenzionale le parti strumentali sono in nichel, mentre per minimizzare deterioramenti queste sono state sostituite con un supporto delle lenti in ottone e *skimmer* e *sampler cone* in platino.

I parametri relativi al metodo strumentale ICP-MS ottimizzato per l'analisi dell'ocratossina A derivatizzata con argento sono riportati in tabella 11.2.

**Tabella 11.2.** Parametri relativi alla sorgente e all'analizzatore di massa.

<b>Parametri</b>	<b>valori</b>
Power RF	1500 W
<i>Sample Depth</i>	8.3 mm
Temperatura <i>spray chambre</i>	-5°C
Masse monitorate	107 e 109
Diametro interno della torcia	1 mm
<i>Sampler cone e Skimmer</i>	platino

L'uso dell'ossigeno può comportare una perdita di sensibilità strumentale e quindi per quanto possibile deve essere minimizzato. Nel caso in cui venga impiegata un'eluizione a gradiente è importante mettere a punto un metodo in cui la percentuale di *optional gas* vari in funzione della percentuale di solvente organico. A tal proposito si riporta la valutazione della quantità necessaria di ossigeno in funzione della percentuale di acetonitrile contenente 10 ppb di argento ottimizzando il carrier gas e la posizione della torcia (tabella 11.3).

**Tabella 11.3.** Parametri usati in funzione del diverso carico di acetonitrile.

<b>% CH<sub>3</sub>CN</b>	<b>Parametri strumentali</b>	
20%	Carrier gas	0.9 L min <sup>-1</sup>
	Optional gas	15 %
40%	Carrier gas	0.8 L min <sup>-1</sup>
	Optional gas	25 %
60%	Carrier gas	0.6 L min <sup>-1</sup>
	Optional gas	36 %
80%	Carrier gas	0.6 L min <sup>-1</sup>
	Optional gas	36 %

Un contenuto in acetonitrile superiore al 60% potrebbe portare a una rapida degradazione delle componenti strumentali.

Utilizzando i parametri riportati in tabella 11.3, non sono state riscontrate variazioni di segnale relative alla presenza di acetonitrile.

#### 11.4.4 Sviluppo del metodo cromatografico

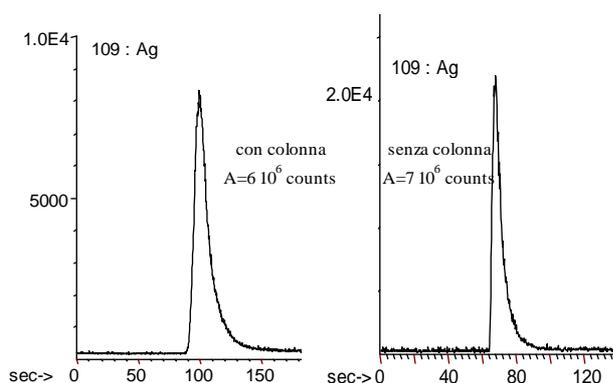
Lo studio preliminare riportato in § 11.4.2 ha permesso di individuare delle possibili fasi stazionarie e fasi mobili che non portassero a precipitazioni o a sequestri dell'argento da parte della fase stazionaria, escludendo così una possibile problematica. In base a queste considerazioni sono state condotte una serie di prove mediante sistema HPLC-ICP-MS allo scopo di trovare una separazione efficiente tra argento libero e argento complessato.

Inizialmente la colonna Hypersep è stata scelta per una prova preliminare di separazione cromatografica usando il sistema accoppiato HPLC-ICP-MS.

L'analisi cromatografia è stata effettuata utilizzando un cromatografo liquido Agilent 1100 series HPLC system (Agilent, Waldbronn, Germany) dotato di una pompa binaria. È stata preparata una colonna analitica in casa (colonna *home-made*) con un diametro interno di 2 mm e 50 mm di lunghezza utilizzando della fase stazionaria Hypersep (Thermo) impaccata mediante aggiunte successive di fase stazionaria la quale è stata impaccata in flusso mediante il sistema HPLC ad un flusso di  $1 \text{ mL min}^{-1}$ .

In base ai risultati ottenuti dalla figura 11.4, acetonitrile e ammoniaca all'1% sono stati scelti come fase mobili. L'eluizione è stata condotta ad un flusso di  $0.25 \text{ mL min}^{-1}$  e un volume di iniezione di  $10 \mu\text{L}$ .

È stato dapprima valutato il recupero dell'argento dalla colonna in condizioni isocratiche 60% acetonitrile iniettando una soluzione acquosa di argento nitrato (10 ppb).

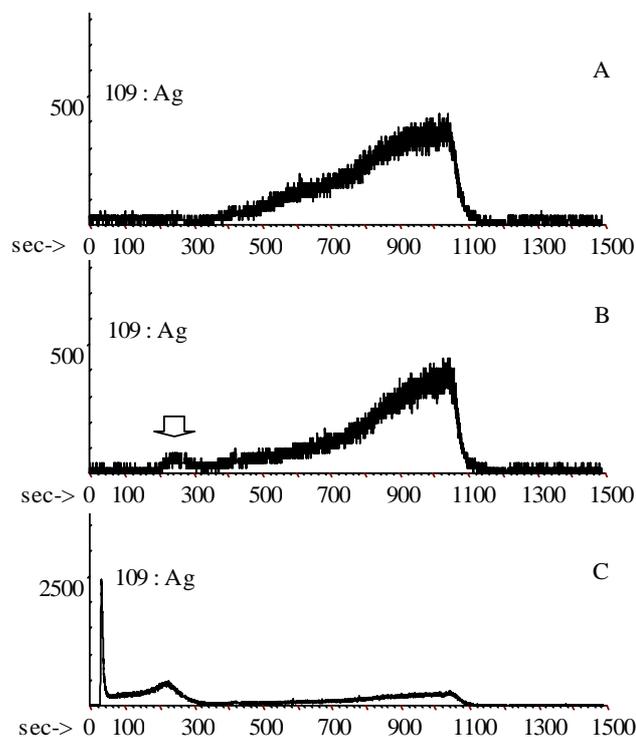


**Figura 11.5.** Confronto dei picchi ottenuti iniettando una soluzione acquosa di argento nitrato (10 ppb) con e senza colonna cromatografica Hypersep.

In figura 11.5 si riporta il confronto tra i picchi relativi al segnale dell'isotopo 109 dell'argento ottenuto all'ICP-MS, in quanto l'isotopo 107 presentava un più alto livello

di background. Si può notare un recupero dell'85% dell'argento dalla colonna cromatografia.

Un'eluizione a gradiente (0-2 min 5%ACN; 2-12 min dal 5% al 60%ACN; 15-25 min 5%ACN) è stata testata usando il metodo ICP-MS descritto nel § 11.4.2 dove percentuali diverse di ossigeno vengono aggiunte nel corso dell'eluizione (figura 11.6).



**Figura 11.6.** Cromatogrammi relativi alla colonna *home-made* Hypersep alle eluizioni a gradiente della linea di base, di una soluzione di argento (50 ppb) e della soluzione contenente il complesso preparato come descritto in § 11.4.1 e diluito fino a un'ipotetica concentrazione finale di 50 ppb.

Nella figura 11.6 A viene riportato il segnale relativo a una linea di base della corsa cromatografica dove non viene iniettata alcuna soluzione. Si nota come aumentando la percentuale di acetonitrile aumenti il rumore di fondo strumentale.

Nella figura 11.6 B invece sono stati iniettati 10  $\mu$ L di una soluzione di argento preparata in 5% acetonitrile. Si nota come il segnale sia estremamente basso se confrontato con quello ottenuto iniettando 10 ppb di argento in acqua in eluizione isocratica 60% acetonitrile (figura 11.5).

L'iniezione della soluzione contenente il complesso ottenuta come descritto nel § 11.4.1 e diluita in acqua fino all'ipotetica (se considerassimo una conversione del 100%) concentrazione di 50 ppb viene riportata in figura 11.6 C. È visibile un primo picco e una seconda banda allo stesso tempo di ritenzione in cui in figura 11.6 B si ritrova il picco relativo all'argento libero. Ipotizzando che questa possa essere una possibile

separazione tra lo ione libero e quello complessato sono stati testati numerosi gradienti per cercare di migliorare la separazione cromatografica ma tuttavia nessun risultato accettabile è stato ottenuto.

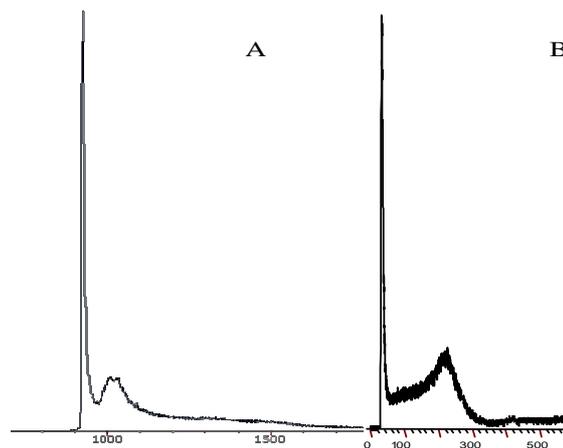
Altri tipi di cromatografia e fasi mobili sono stati testati al fine di cercare una buona separazione cromatografica tra l'argento libero e l'argento complessato (tabella 11.4).

**Tabella 11.4.** Colonne e fasi mobili testate per l'ottimizzazione cromatografica.

Tipo	colonna	Fasi mobili
fase inversa	Zorbax Sb-Aq (2.1x100mm)	H <sub>2</sub> O/ACN;
	SmartGrace C18 150x2.1mm	H <sub>2</sub> O/MeOH;
	Zorbax Eclipse XDB C18 2.1x50mm	H <sub>2</sub> O/MeOH 95/5 + TFA 0.1% (pH 2.4); H <sub>2</sub> O/MeOH 95/5 + HCOOH 0.06% (pH 3).
cationica	Zorbax 300 SCX 4.6X150 mm 5 µm	NH <sub>4</sub> AcO 5mM pH7 +5%MeOH; EDTA in H <sub>2</sub> O 1mM; NH <sub>4</sub> AcO 50mM pH7.
		NH <sub>4</sub> AcO 5mM pH10, pH8, pH6, pH4; NH <sub>4</sub> AcO 2,5mM pH6+ 5 ppm di 18-crown-6; NH <sub>4</sub> AcO 1,5M pH7 + b-mercaptoetanololo; H <sub>2</sub> O+ 10ppm di 18-crown-6; H <sub>2</sub> O+ 10ppm di 18-crown-6 +1%MeOH; NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 30mM pH3, pH9, pH9 +1%; +2%; +5%MEOH, +1%ACN, +2,5% PHBA; (NH <sub>4</sub> )CO <sub>3</sub> 10mM pH9; NH <sub>4</sub> OH 5% in H <sub>2</sub> O; Tiourea 5mM in H <sub>2</sub> O.
anionica	Hamilton PRP- X100 2.1x100 mm colonna home-made con fase SAX (Alltech) 2x50 mm	NH <sub>4</sub> AcO 5mM pH7/ACN; H <sub>2</sub> O+ NH <sub>3</sub> pH7 /ACN.
HILIC	ZIC-HILIC 2.1x150 mm	H <sub>2</sub> O/MeOH 95/5 + HCOOH 0.06% (pH 3) H <sub>2</sub> O/ACN
grafite	colonna home-made con fase Hypersep (Thermo) 2x50 mm	

I risultati sono stati deludenti con ogni colonna valutata riscontrando soprattutto problemi a livello di recupero postcolonna anche del singolo standard di argento che sembra essere trattenuto dalle varie colonne nonostante le conclusioni ottenute dalle prove fatte in provetta (figura 11.4). Vi sono tuttavia alcune eccezione.

Utilizzando la colonna home-made a scambio anionico SAX con fase mobile NH<sub>4</sub>AcO 5mM pH6 e iniettando 10 µL del complesso ocratossina A argento (50 ppb) si ottiene un risultato simile a quanto ottenuto con la colonna in grafite come si può osservare dalla figura 11.7. Ma anche in questo caso non si è riusciti a ottenere una separazione migliore.



**Figura 11.7.** Confronto tra i cromatogrammi del complesso ocratossina A-argento ottenuti con la colonna *home-made* SAX (A) e con la colonna *home-made* in grafite (B).

L'uso invece della colonna ZIC-HILIC con  $\text{NH}_4\text{AcO}$  5mM pH7/ACN come fasi mobili con percentuali di ACN variabili tra il 20% e il 60% ha portato a recuperi del 90% ma l'ipotetico complesso coeluisce con l'argento libero.

Il sistema di rivelazione ICP-MS non permette l'identificazione della specie eluita dalla colonna perché rivela solo le specie elementari. Ulteriori indagini devono essere condotte per identificare i picchi eluiti dalla colonna. Nei casi più semplici l'identificazione può essere condotta per confronto dei tempi di ritenzione, anche se in taluni casi è necessario ricorrere a tecniche di spettrometria di massa quali ESI-MS o MALDI-MS per molecole a più alto peso molecolare.

Allo scopo di cercare di comprendere i reali meccanismi in gioco durante l'eluizione del complesso ocratossina A-argento è stato messo a punto un metodo MRM per l'ocrotossina A, per l'argento e per il complesso ocratossina A-argento utilizzando lo spettrometro di massa API 4000.

La creazione del metodo MRM è stata eseguita come descritto nei capitoli 2 e 7 e le transizioni ottenute con relativi parametri strumentali sono stati riportati in tabella 11.5.

**Tabella 11.5.** Transizione monitorata per l'OTA, l'Ag<sup>+</sup> e il complesso e relativi parametri strumentali dello spettrometro di massa.

	Q1	Q3	DP	EP1	CE	CXP
[OTA] <sup>+</sup>	404.2	386.2	48	10	17	12
	404.2	358.2	48	10	22	10
	404.2	341.1	48	10	27	10
	404.2	257.0	48	10	31	7
	404.2	239.1	48	10	40	7
[Ag] <sup>+</sup>	107	107	65	10	6	9
	109	109	71	10	6	9
[AgOTA+H] <sup>+</sup>	510.2	363.2	75	10	31	12
	510.2	345.0	75	10	37	10
	510.2	272.1	75	10	35	8
	510.2	226.0	75	10	30	6
	512.2	365.1	70	10	30	11
	512.2	346.9	70	10	37	11
	512.2	274.1	70	10	36	8
	512.2	228.3	70	10	30	6

Lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo con sorgente ESI permette di poter monitorare oltre all'argento e al complesso anche l'ocratossina A evidenziando così eventuali dissociazioni del complesso a carico della colonna cromatografica.

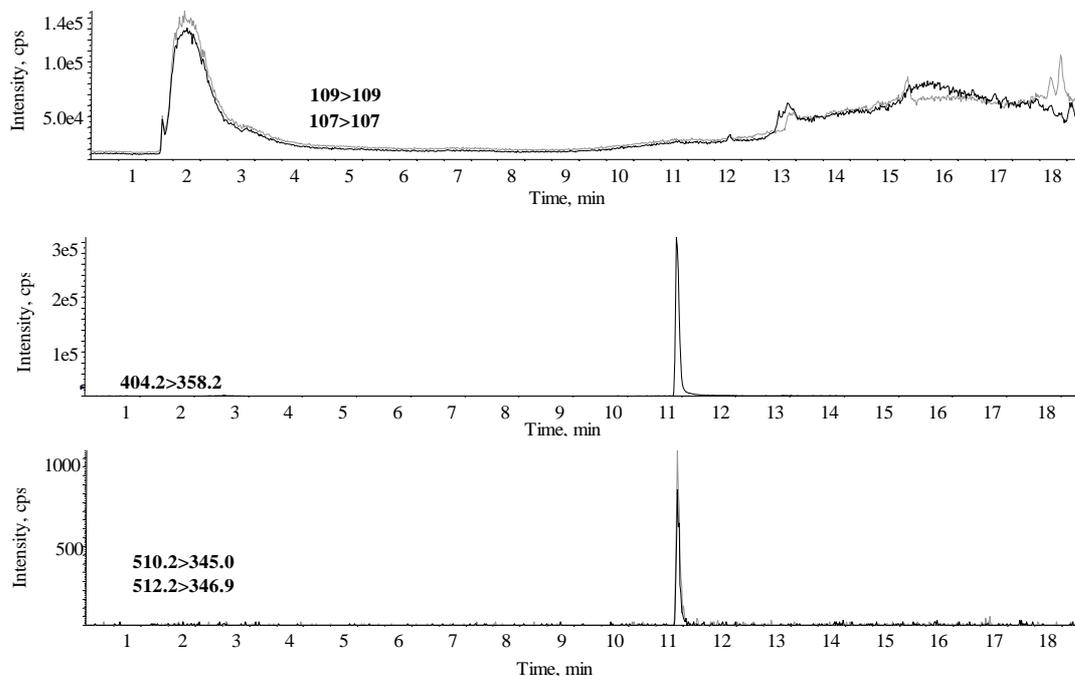
Lo spettrometro di massa è stato quindi accoppiato a un sistema cromatografico Agilent 1100 series HPLC system (Agilent, Waldbronn, Germany) dotato di una pompa binaria, degasser, autocampionatore e vano colonna termostato.

La stessa soluzione contenente il complesso ocratossina A-argento usato per le analisi in ICP-MS (50 ppb) è stata utilizzata per le prove fatte con il sistema HPLC-ESI-MS/MS. Tale sistema permette di rivelare solo l'argento libero, l'ocratossina A e il complesso mentre eventuali altri complessi con l'argento sono esclusi dalla determinazione. Questo sistema permette di ottenere una sensibilità maggiore rispetto ad un'analisi in *full scan*.

Le colonne a fase inversa, la colonna ZIC-HILIC e quella in grafite sono state testate utilizzando le stesse condizioni cromatografiche utilizzate in HPLC-ICP-MS.

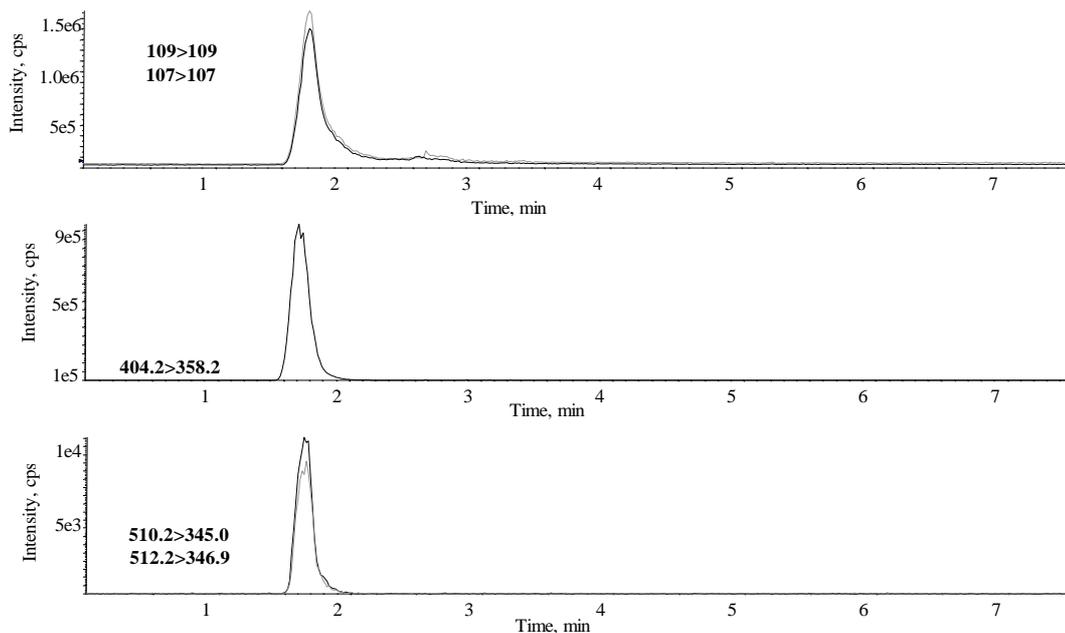
La colonna cromatografica SmartGrace C18 150x2.1mm è stata impiegata usando acqua ed acetonitrile come fasi mobili ad un flusso di 0.2 mL min<sup>-1</sup> secondo un gradiente lineare che passa da 5% al 100% di acetonitrile in 12 minuti. Si può notare dal cromatogramma che l'argento libero esce al tempo morto mentre l'ocratossina A e il complesso vengono ritenute dalla colonna uscendo ad un tempo di 11 minuti. Il problema maggiore è rappresentato dall'intensità del segnale del complesso che è presente rispetto all'ocratossina A come lo 0.25% con un segnale estremamente basso (figura 11.8). Questa colonna era stata testata anche con il sistema HPLC-ICP-MS come

riportato in tabella 11.4 ma un unico picco veniva eluito dalla colonna, identificato come argento libero. Il complesso non veniva eluito dalla colonna in quanto con il sistema HPLC-ICP-MS non è possibile applicare un gradiente che si concluda con un 100% di acetonitrile a causa dei problemi riportati nel § 11.4.3.



**Figura 11.8.** Cromatogrammi relativi allo ione argento, all'ocratossina A e al complesso ocratossina A-argento utilizzando la colonna Grace Smart C18 mediante tecnica HPLC-ESI-MS/MS.

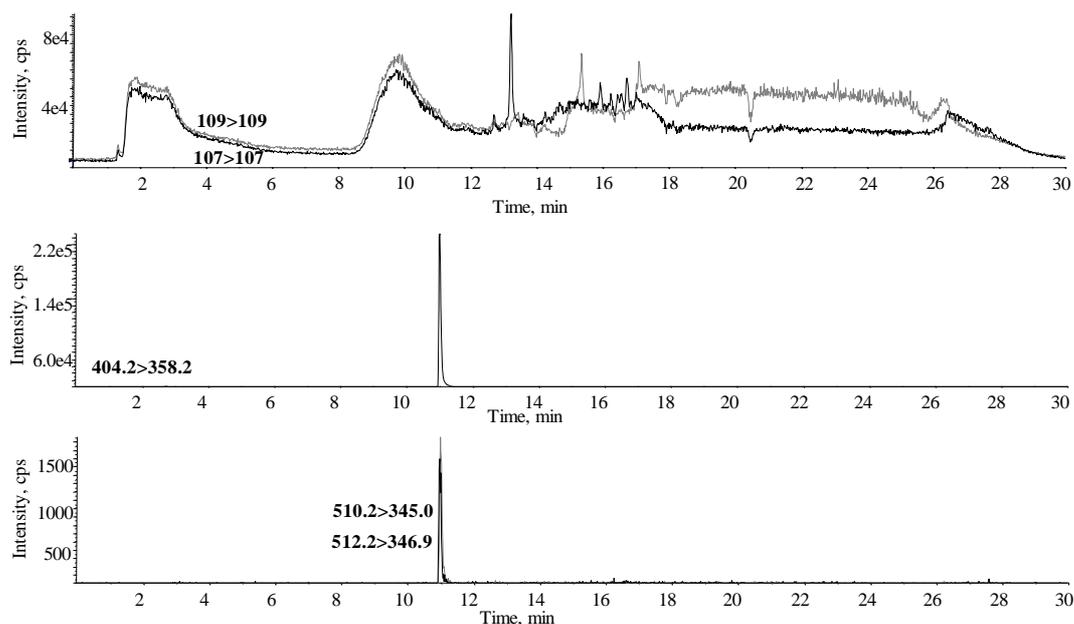
L'uso ad esempio della colonna ZIC-HILIC 2.1x150 mm porta alla minor dissociazione del complesso, presente in un percentuale più alta ( $\approx 8\%$ ) rispetto alle altre separazioni cromatografiche valutate; tuttavia il complesso non viene ritenuto dalla colonna e coeluisce con l'argento libero (figura 11.9). Con il sistema HPLC-ICP-MS era stato raggiunto un risultato analogo ottenendo un unico picco all'inizio della corsa cromatografica.



**Figura 11.9.** Cromatogrammi relativi allo ione argento, all'ocratossina A e al complesso ocratoossina A-argento utilizzando la colonna ZIC-HILIC mediante tecnica HPLC-ESI-MS/MS.

Nell'analisi condotta utilizzando la colonna di grafite invece non viene eluita né l'ocratossina A e nemmeno il complesso che sembrano essere trattenuti dalla colonna. L'argento invece viene ritenuto dalla colonna e viene eluito con in un tempo di ritenzione di 12 minuti. I risultati trovati con il sistema HPLC-ESI-MS/MS quindi permettono di affermare che la cromatografia trovata in HPLC-ICP-MS (figura 11.6) non si riferiva alla separazione tra lo ione argento libero e il complesso. L'analisi in modalità MRM non permette di risalire a quali specie erano presenti ai tempi di ritenzione trovati nel sistema HPLC-ICP-MS, tuttavia è presumibile pensare, considerando le specie in gioco, che possano essere complessi con la fase mobile.

Un risultato interessante è stato ottenuto utilizzando la colonna Zorbax Sb-Aq 150x2.1 mm ad un flusso di 0.2 mL min<sup>-1</sup> utilizzando come fasi mobili acqua e acetonitrile (ACN). L'eluizione viene condotta secondo questo gradiente: 0-2 min' 0% ACN; 2-12 min dall'0 al 100% ACN ; 22-30 min 0%ACN. I cromatogrammi ottenuti mediante analisi HPLC-ESI-MS/MS relativi all'argento, all'ocratossina A e al complesso sono riportati in figura 11.10.



**Figura 11.10.** Cromatogrammi relativi allo ione argento, all'ocratossina A e al complesso ocratossina A-argento utilizzando la colonna Zorbax Sb-Aq.

Si può notare come anche in questo caso la specie non complessata sia la specie più abbondante e allo stesso tempo di ritenzione è presente il complesso caratterizzato dalle transizioni relative ai due isotopi dell'argento. Lo ione argento invece presenta un cromatogramma con due bande dove la prima esce al tempo morto e corrisponde allo ione argento libero non complessato. Tale affermazione è stata verificata iniettando una soluzione standard di ione argento. La seconda banda dello ione argento invece viene ritenuta e presenta un tempo di ritenzione leggermente anticipato rispetto all'ocratossina A facendo ipotizzare una dissociazione del complesso in colonna.

Nonostante sia state investigate delle condizioni tali da evitare questa dissociazione, nessun ulteriore risultato è stato ottenuto.

### **11.5 Conclusioni**

Lo scopo principale di questo lavoro prevedeva la messa a punto di un metodo per la determinazione dell'ocratossina A mediante analisi HPLC-ICP-MS, per sfruttare la grande sensibilità di tale strumento diminuendo così i limiti di rilevabilità ottenuti in letteratura.

Poiché tale strumentazione permette di rivelare solo specie metalliche, è stato necessario studiare una procedura di derivatizzazione per introdurre un metallo nella struttura chimica dell'ocratossina A.

Una procedura semplice, automatizzabile ed efficiente è stata ottenuta utilizzando delle cartucce IC-Ag (Alltech) che hanno permesso la derivatizzazione della tossina con uno ione argento. Tale complesso è stato caratterizzato mediante infusione diretta ESI-MS.

Sono stati ottimizzati i parametri relativi allo strumento ICP-MS per poter lavorare con una cromatografia in fase inversa, ipotizzando che questa fosse la miglior tecnica per poter separare lo ione libero dallo ione complessato. Sono state individuate le percentuali di ossigeno necessarie per lavorare ad alto contenuto in solvente organico.

È stata condotta infine un'approfondita ricerca mirata all'individuazione di un tipo di cromatografia che permettesse una separazione efficiente tra il complesso e lo ione argento, affrontando tutti i tipi di cromatografia disponibili, usando diverse fasi mobili e anche conducendo un lavoro in provetta per cercare di comprendere i meccanismi che potessero inibire la separazione cromatografica.

Si può concludere che non è stata trovata una separazione cromatografia utile al nostro obiettivo a causa dell'instabilità del complesso in colonna cromatografica. Questa instabilità non è stata riscontrata in infusione diretta dove il complesso si era dimostrato la specie prevalente rispetto all'ocratossina A. Inoltre la stabilità del complesso in infusione diretta ha permesso la creazione del metodo MRM che non potrebbe essere fatta se la concentrazione del complesso in soluzione fosse troppo bassa.

Bisogna sottolineare come l'uso del solo sistema HPLC-ICP-MS non avrebbe permesso di determinare l'instabilità del complesso in cromatografia in quanto tale strumentazione consente solo di rivelare le specie metalliche e quindi l'identificazione può essere ottenuta solo per confronto tra i tempi di ritenzione, come avviene ad esempio per un sistema HPLC-UV. Al fine di meglio comprendere i problemi derivanti dalla separazione cromatografica, è stata utilizzata la cromatografia accoppiata ad un triplo quadrupolo la quale ha dimostrato l'instabilità del complesso in colonna.

La rivelazione dell'ocratossina A mediante l'argento ad essa complessato non si è quindi dimostrato un metodo applicabile.

### 11.6 Riferimenti bibliografici

- [1] P. Krogh, *Mycotoxins in Food*, London, UK, 1987.
- [2] A.E. Pohland, P.I. Schuller, P.S. Steyn, H.P. Van Egmond, *Pure Appl. Chem.* 54 (1982) 2219.
- [3] S. Uchiyama, Y. Saito, M. Uchiyama, *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 26 (1985) 651.
- [4] G.M. Wood, S. Patel, A.C. Entwisle, A. Boenke, *Food Additives and Contaminants* 13 (1996) 519.
- [5] WHO, in 37th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO, Geneva, Switzerland, 1995.
- [6] IARC, in, IARC, Geneva, Switzerland, 1993.
- [7] D. Ringot, A. Chango, Y.J. Schneider, Y. Larondelle, *Chemico-Biological Interactions* 159 (2006) 18.
- [8] C. Schlatter, J. Studer-Rohr, T.H. Rosonyi, *Food Additive Contamination* 13 (1996) 43.
- [9] H. Valenta, *Journal of Chromatography A* 815 (1998) 75.
- [10] A. Breitholtz-Emanuelsson, I. Palminger-Hallen, P.O. Wohlin, A. Oskarsson, K. Hult, M. Olsen, *Natural toxins* 1 (1993) 347.
- [11] A. Breitholtzemanuelsson, M. Olsen, A. Oskarsson, I. Palminger, K. Hult, *Journal of Aoac International* 76 (1993) 842.
- [12] A. Breitholtz, M. Olsen, A. Dahlback, K. Hult, *Food Additives and Contaminants* 8 (1991) 183.
- [13] H. Terada, H. Tsubouchi, K. Yamamoto, K. Hisada, Y. Sakabe, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 69 (1986) 960.
- [14] D. Abramson, *Journal of Chromatography* 391 (1987) 315.
- [15] E. Rajakyla, K. Laasaseno, P.J.D. Sackers, *Journal of Chromatography* 384 (1987) 391.
- [16] M. Becker, P. Degelmann, M. Herderich, P. Schreier, H.U. Humpf, *Journal of Chromatography A* 818 (1998) 260.
- [17] B.P.Y. Lau, P.M. Scott, D.A. Lewis, S.R. Kanhere, *Journal of Mass Spectrometry* 35 (2000) 23.
- [18] S. Sforza, C. Dall'Asta, R. Marchelli, *Mass Spectrometry Reviews* 25 (2006) 54.
- [19] J.M. Rosenfeld, *Journal of Chromatography A* 843 (1999) 19.
- [20] A. Prange, D. Proefrock, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 23 (2008) 432.
- [21] P.S. Marshall, B. Leavens, O. Heudi, C. Ramirez-Molina, *Journal of Chromatography A* 1056 (2004) 3.
- [22] P. Marshall, O. Heudi, S. McKeown, A. Amour, F. Abou-Shakra, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16 (2002) 220.
- [23] A.J. Cartwright, P. Jones, J.C. Wolff, E.H. Evans, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 20 (2005) 75.
- [24] A.J. Cartwright, P. Jones, J.C. Wolff, E.H. Evans, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19 (2005) 1058.
- [25] W.J. Leavens, S.J. Lane, R.M. Carr, A.M. Lockie, I. Waterhouse, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16 (2002) 433.
- [26] C. Giesen, N. Jakubowski, U. Panne, M.G. Weller, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 25 (2010) 1567.
- [27] R.C. Mehrotra, *Metal Carboxylates*, London, 1983.
- [28] F.A. Cotton, G. Wilkinson, 1988, New York, *Advanced Inorganic Chemistry*.
- [29] J.R. Wan, M. Gouterman, E. Green, G.E. Khalil, *Journal of Liquid Chromatography* 17 (1994) 2045.
- [30] K. Bluemlein, E.M. Krupp, J. Feldmann, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24 (2009) 108.
- [31] C. Rivas, L. Ebdon, S.J. Hill, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 11 (1996) 1147.

## Conclusioni

Lo scopo delle tesi prevedeva la messa a punto di metodi per la determinazione di tossine mediante tecniche di cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa.

Il lavoro è stato suddiviso a seconda della natura delle tossine usate come analiti. Le tossine algali sono state studiate utilizzando la cromatografia liquida accoppiata ad un triplo quadrupolo mentre per le tossine alimentari si è cercato di mettere a punto un metodo strumentale alternativo mediante HPLC-ICP-MS.

Nella messa a punto delle diverse metodiche, il problema analitico è stato affrontato mettendo inizialmente a punto il metodo strumentale, e successivamente utilizzandolo per la convalida della procedura di preparazione del campione, mediante stime di accuratezza, precisione, resa della procedura, range lineare della risposta, limite di rilevabilità ed effetto matrice. Infine il metodo è stato applicato per la determinazione degli analiti nei campioni reali.

Le tossine algali trattate in questa tesi sono state suddivise a seconda dell'ambiente in cui vengono prodotte in tossine d'acqua dolce, per le quali sono state studiate le microcistine e la nodularina, e in tossine marine, di cui invece è stato studiato l'acido domoico.

È stato messo a punto un metodo quantitativo molto sensibile per la determinazione di sette microcistine (MC LA, LF, LW, LY, LR, YR, RR) e della nodularina mediante cromatografia liquida accoppiata ad uno spettrometro di massa con analizzatore triplo quadrupolo in modalità di acquisizione MRM. Il metodo sviluppato presenta due aspetti innovativi: la separazione cromatografica è condotta in condizioni alcaline mentre lo spettrometro di massa acquisisce in modalità di ionizzazione negativa.

La combinazione di questi aspetti ha condotto ad un metodo con limiti di rilevabilità strumentali eccellenti, ottenendo valori compresi tra l'1 fg  $\mu\text{L}^{-1}$  (MC LW, MC LF) e i 9 fg  $\mu\text{L}^{-1}$  (MC YR).

Al fine di integrare il dato quantitativo con una valutazione qualitativa è stato sviluppato un metodo strumentale per la determinazione delle microcistine e della nodularina che utilizza la stessa separazione cromatografica precedente ma una modalità di acquisizione *Precursor Ion mode* in spettrometria di massa. In letteratura questo è il

primo studio nel quale è usata questa modalità di acquisizione con una ionizzazione negativa per la determinazione qualitativa delle microcistine e della nodularina.

I metodi strumentali sono poi stati utilizzati per lo sviluppo delle procedure pre-analitiche per la determinazione delle microcistine e della nodularina nell'aerosol atmosferico, nelle acque dolci e nei mitili.

Il metodo pre-analitico sviluppato per la determinazione di sei microcistine (MC LA, LF, LW, LY, LR, YR) e della nodularina in campioni di aerosol atmosferico è stato validato dimostrando buona ripetibilità, buone rese e bassi errori percentuali per tutte le cianotossine considerate. È stato quindi applicato a dieci campioni reali di aerosol atmosferico raccolti nella laguna di Venezia, individuando per la prima volta questi composti a livello di tracce di microcistine nella laguna veneta. Questo è il primo lavoro in cui sono state quantificate le cianotossine in campioni di aerosol atmosferico utilizzando la spettrometria di massa. La tecnica, a differenza dei saggi biochimici, permette alta sensibilità ma soprattutto è in grado di diversificare il contributo dei singoli congeneri delle microcistine caratterizzati da differenti tossicità.

Un metodo pre-analitico per la frazione disciolta e uno per la frazione particellata dell'acqua dolce sono stati sviluppati per la quantificazione di otto cianotossine (microcistina LA, LY, YR, LR, RR, LW, LF e NOD) utilizzando il metodo dello standard interno. La validazione ha dimostrato come il metodo porti a buone rese e bassi errori percentuali per tutte le cianotossine determinate.

Il metodo sviluppato per l'analisi della frazione disciolta delle acque dolci ha dimostrato dei valori di MDL che oscillano tra i 0.1 (MC LF) e i 0.6 (MC LR) ng L<sup>-1</sup> mentre per l'analisi della frazione particolata i valori oscillano tra i 0.1 (MC RR) e i 2.0 (MC YR) pg assoluti. Tali valori sono risultati inferiori o simili a quanto riportato in letteratura grazie alla grande sensibilità del metodo strumentale e alle caratteristiche delle procedure pre-analitiche sviluppate.

La procedura di preparazione del campione validata è stata applicata a otto campioni provenienti dal continente antartico per rivelare l'eventuale presenza delle tossine nei siti campionati. I campioni sono stati analizzati con il metodo strumentale più sensibile in modalità di acquisizione MRM per rivelare le otto cianotossine studiate e con il metodo in *precursor ion mode* per rivelare eventuali altri congeneri non commercialmente disponibili. Tuttavia nei campioni le concentrazioni delle cianotossine sono risultate sempre al di sotto del limite di rilevabilità.

Infine un metodo pre-analitico è stato sviluppato anche per la matrice tessutale dei mitili per i quali è stata ottenuta una procedura semplice senza sistemi di purificazione del campione. La combinazione dell'uso nella fase preparativa di una piccola quantità di matrice e dell'alta sensibilità strumentale ha permesso di ottenere un metodo con gli stessi limiti di rilevabilità dei metodi riportati in letteratura ma con una procedura poco costosa e veloce. Questo inoltre è il primo metodo nel quale viene usato lo standard interno per la quantificazione delle cianotossine nei mitili.

Tra le tossine prodotte da organismi marini, questo lavoro di dottorato si è focalizzato anche sullo sviluppo di un metodo per la determinazione dell'acido domoico, tossina che causa il cosiddetto *amnesic shellfish poisoning*. Ad oggi non sono stati ancora chiarite quali siano i fattori che portano alla produzione di questa tossina anche se è nota una correlazione con i fenomeni di eutrofizzazione.

È stato messo a punto un metodo strumentale utilizzando la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa con analizzatore a triplo quadrupolo. È stato confrontato lo stesso metodo in modalità di acquisizione MRM utilizzando una polarità di ionizzazione positiva e una negativa, ottenendo due metodi con elevata sensibilità con limiti di rilevabilità di un ordine di grandezza inferiori a quanto riportato in letteratura.

Sono state sviluppate due procedure pre-analitiche per la determinazione dell'acido domoico nella frazione disciolta e nella frazione particellata dell'acqua di mare che prevedono una quantificazione con il metodo dello standard interno. La leucina encefalina si è dimostrata il miglior standard interno.

La procedura per la determinazione dell'acido domoico nella frazione disciolta dell'acqua di mare prevede una fase di estrazione, purificazione e pre-concentrazione *solid phase extraction* con rese di estrazione per l'acido domoico del 66%. Tuttavia l'uso dello standard interno come metodo di quantificazione permette di ottenere una buona accuratezza con bassi errori percentuali ed elevata ripetibilità delle misure.

La frazione particellata è stata invece estratta in bagno ad ultrasuoni con una soluzione acquosa di metanolo (50:50) ottenendo rese di estrazioni medie del 82% e bassi errori percentuali.

È stato valutato quantitativamente l'effetto matrice dimostrando come l'uso di soluzioni standard preparate nella matrice per la quantificazione è necessaria per cercare di ridurre tale effetto e ottenere una quantificazione accurata.

I metodi sviluppati hanno dimostrato limiti di rilevabilità procedurali di circa due ordini di grandezza inferiori a quelli riportati in letteratura, ottenendo per la ionizzazione in polarità positiva un MDL di  $0.3 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$  per la frazione disciolta e  $0.4 \text{ pg}$  assoluti per la frazione particellata, mentre per la ionizzazione in polarità negativa rispettivamente  $0.6 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$  e  $6 \text{ pg}$  assoluti per la frazione disciolta e per la particellata.

I metodi sono stati applicati a campioni provenienti da due zone caratterizzate da un diverso grado di eutrofizzazione allo scopo di cercare di comprendere i meccanismi che portano alla produzione dell'acido domoico. L'analisi dei campioni provenienti dal continente antartico dove l'eutrofizzazione è praticamente assente ha dimostrato come le concentrazioni di acido domoico siano al di sotto dei limiti di rilevabilità. Questo non ha permesso il confronto ipotizzato.

L'analisi invece di campioni raccolti nella Laguna di Venezia ha individuato per la prima volta concentrazioni rilevabili di acido domoico in un range tra  $1$  e  $16 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$ .

La sensibilità del metodo sviluppato e l'attestata presenza degli organismi produttori ha permesso valutare una distribuzione spaziale della tossina nella laguna.

Al fine di estendere lo studio dell'acido domoico anche altri matrici, è stata sviluppata una semplice e poco costosa procedura di preparazione di campioni di mitili, matrice causa principale dei casi di avvelenamento attestati in letteratura. Questo è il primo studio in cui viene usato lo standard interno come metodo di quantificazione.

Alcune tossine possono essere aerosolizzate per azione del vento o delle onde ed entrando in atmosfera questa può diventare un'importante fonte di contatto con l'uomo. In letteratura non è mai stato valutato se l'acido domoico potesse subire questo processo. È stato pertanto validato un metodo per la determinazione della tossina nell'aerosol atmosferico e una ventina di campioni raccolti in un luogo in cui è stato verificato la presenza della tossina nell'acqua sono stati analizzati. Tuttavia le concentrazioni di acido domoico sono risultate al di sotto del limite di rilevabilità.

Oltre le tossine algali, un'altra classe di tossine molto pericolose per la salute umana sono le tossine alimentari, tra cui le più importanti sono le micotossine.

È stata studiata la messa a punto di un metodo alternativo per la determinazione dell'ocratossina A mediante HPLC-ICP-MS. È stata sviluppata una procedura di derivatizzazione dell'ocratossina A con l'argento per poter rivelare la tossina con la spettrometria di massa con sorgente al plasma. È stato messo a punto il metodo ICP-MS per poter usare un sistema cromatografico a fase inversa e infine un complesso studio di cromatografia è stato intrapreso per separare l'argento libero dall'argento complessato.

Nonostante siano state valutate diversi tipi separazione cromatografica, nessuna si è dimostrata efficiente.

Infine lo studio del problema cromatografico è stato affrontato con il sistema HPLC-ESI-MS che ha dimostrato l'instabilità del complesso ocratossina A-argento nel sistema cromatografico e quindi l'impossibilità di ottenere un metodo sensibile ed efficiente.



## Abbreviazioni

Adda	acido (2S,3S,8S, 9S)-3-amino-9-metossi-2,6,8-trimetil-10 fenildeca -4,6-dienico
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>
ASP	<i>Amnesic Shellfish Poisoning</i>
CAD	<i>collision activated dissociation</i>
CE	<i>collision energy</i>
CFP	<i>ciguatera fish poisoning</i>
CTP	<i>cyanobacteria toxin poisoning</i>
CUR	<i>curtain gas</i>
CV	coefficiente di variazione
CXP	<i>cell exit potential</i>
DA	acido domoico
DAD	<i>photodiode array</i>
D-MeAsp	acido D-eritro- $\beta$ -metilaspatico
DP	<i>declustering potential</i>
DPS	<i>diarrhetic shellfish poisoning</i>
DTX	<i>dinophysis toxin</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENK	leucina encefalina
EP	<i>entrance potential</i>
ESI	<i>electrospray Ionization</i>
FIA	<i>flow injection analysis</i>
GC-MS	gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa
GF/F	<i>glass filter</i> con porosità 0.7 $\mu\text{m}$ (F)
GS1	gas di nebulizzazione
GS2	gas di desolvatazione
HCD	<i>higher energy collisional dissociation</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
ICP	<i>inductively coupled plasma</i>
IS	<i>ionspary voltage</i>
LC-FLD	cromatografia liquida accoppiata a un rivelatore a fluorescenza
Lct50	<i>lethal concentration &amp; time</i> esprime la tossicità letale di una sostanza inalata
LC-UV	cromatografia liquida accoppiata a un rivelatore spettrofotometrico UV

LD50	<i>lethal dose, 50% population</i>
LOD	limite di rilevabilità strumentale
LOQ	limite di quantificazione strumentale
LT-FT-ICR	<i>hybrid linear ion trap - Fourier transform ion cyclotron resonance</i>
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight</i>
MC	microcistina
Mdha	<i>N-metildeidroalanina</i>
MDL	limite di rilevabilità procedurale
ME	effetto matrice
MeOH	metanolo
MQL	limite di quantificazione procedurale
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS/MS	spettrometria di massa tandem
NSP	<i>Neurologic Shellfish Poisoning</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	efficienza del processo
PSP	<i>Paralytic Shellfish Poisoning</i>
PTFE	politetrafluoroetilene
QFF	quartz fiber filter
RE	resa di estrazione
SFR	soluzione usata per il calcolo del fattore di risposta
SIM	<i>selected ion monitoring</i>
SPE	<i>solid phase extraction</i>
TFA	acido trifluoroacetico
TSI	<i>turbo ion spray</i>
WHO	<i>world hearth organization</i>

*Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2012, 26, 1497–1506  
(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/rcm.6246

# Simultaneous quantification of microcystins and nodularin in aerosol samples using high-performance liquid chromatography/negative electrospray ionization tandem mass spectrometry

Andrea Gambaro<sup>1,2</sup>, Elena Barbaro<sup>1\*</sup>, Roberta Zangrando<sup>2</sup> and Carlo Barbante<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Environmental Sciences, Informatics and Statistics (DAIS), University of Venice, Ca' Foscari, Calle Larga Santa Marta 2137, 30123 Venice, Italy

<sup>2</sup>Institute for the Dynamics of Environmental Processes CNR, Dorsoduro 2137, 30123 Venice, Italy

**RATIONALE:** Cyanobacteria are a small group of photosynthetic planktonic bacteria, producing a large group of strong hepatotoxins called microcystins (MCs). Many studies have been conducted to evaluate the presence of MCs and nodularin (NOD) in water or in marine organisms, but little research has been done on the atmospheric environment. Waterborne toxins can be found in the aerosol phase due to bubble-bursting processes.

**METHODS:** The aim of this study was to obtain a sensitive method for the simultaneous determination of trace concentrations of individual cyanotoxins in aerosol samples, using liquid chromatography coupled with a triple quadrupole (HPLC/MS/MS). During method development improved electrospray ionization was found in negative ion mode. In contrast with other authors, we have developed a chromatographic separation using alkaline conditions, thus achieving good resolution, improved electrospray ionization and therefore better sensitivity.

**RESULTS:** A sensitive analytical method was set up to simultaneously measure trace concentrations of cyanotoxins in aerosol samples in a single chromatographic analysis using the internal standard method. The limit of detection for all the toxins was determined to be between 1 fg/μL (MC LA and LF) and 9 fg/μL (NOD).

**CONCLUSIONS:** The method was applied to ten aerosol samples from the Venice Lagoon. In these samples, trace concentrations of MC-LA ranging between 90 fg m<sup>-3</sup> and 706 fg m<sup>-3</sup>, MC-LF between n.d. and 369 fg m<sup>-3</sup> and MC-LW between n.d. and 262 fg m<sup>-3</sup>. This is the first study to quantify the cyanotoxins in Venetian aerosol samples using the HPLC/(-)ESI-MS/MS. Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Cyanobacteria are commonly present all over the world and important seasonal blooms are commonly present in Mediterranean zones. Freshwater cyanobacteria include 150 genera and approximately 2000 species and are an integral part of phytoplankton blooms.<sup>[1]</sup> Many of the common cyanobacterial species produce toxic metabolites, cyanotoxins, which can be responsible for acute or chronic poisoning of wild/domestic animals and humans.<sup>[2]</sup>

Cyanotoxins are categorized according to their chemical structures: cyclic peptide (microcystins and nodularins); alkaloids (neurotoxins and cylindrospermopsin); and lipopolysaccharides. Microcystins (MCs) are cyclic heptapeptides containing seven peptide-linked amino acids, where the two terminal amino acids of the linear peptide join to form a cyclic compound. The general structure is cyclo-(D-Ala-L-X-D-erythro-β-MeAsp-L-Z-Adda-D-Glu-Mdha) where X and Z are variable L-amino acids, while D-MeAsp is D-erythro-β-methylaspartic acid, and Mdha is N-methyldehydroalanine. The amino acid Adda, (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid, is a key structure in this group

of cyclic peptide toxins.<sup>[1]</sup> The toxins are named according to the two variable L-amino acids at positions X and Z (Fig. 1). The cyclic pentapeptide nodularin contains amino acids similar to those found in MCs, including the key group Adda (Fig. 1). The toxicity of these cyclic peptides is associated with the Adda moiety while the Mdha peptide is responsible for covalent binding of the toxin to protein phosphatases, which is an essential component for many cell regulatory processes such as growth, protein synthesis, glycogen metabolism and muscle contraction.<sup>[3]</sup>

The exposure to cyanobacterial toxins mainly occurs through direct or indirect contact with contaminated water. Moreover, these toxins may be aerosolized and inhaled into the lungs or enter the gastrointestinal system after being deposited in the major airways or following ingestion of food and water.<sup>[4]</sup> The waterborne toxins can be aerosolized when wind causes bubble-bursting processes on white-capped waves. Many studies evaluate the presence of microcystins and nodularin in water or in marine organisms, in order to prevent exposure to these toxins through diet. Little research exists on these toxins in the atmospheric environment.<sup>[5,6]</sup> In response to the need to monitor water sources relative to the proposed World Health Organization (WHO) drinking water guidelines, many techniques were developed to detect and quantify cyanobacterial toxins in water<sup>[7–13]</sup> and other matrices such as tissue,<sup>[9,14–16]</sup> plasma,<sup>[17]</sup> or sediment.<sup>[18]</sup> Only a few studies in the literature<sup>[5,6]</sup> report the investigation

\* Correspondence to: E. Barbaro, Department of Environmental Sciences, Informatics and Statistics (DAIS), University of Venice, Ca' Foscari, Calle Larga Santa Marta 2137, 30123 Venice, Italy.  
E-mail: barbaro@unive.it

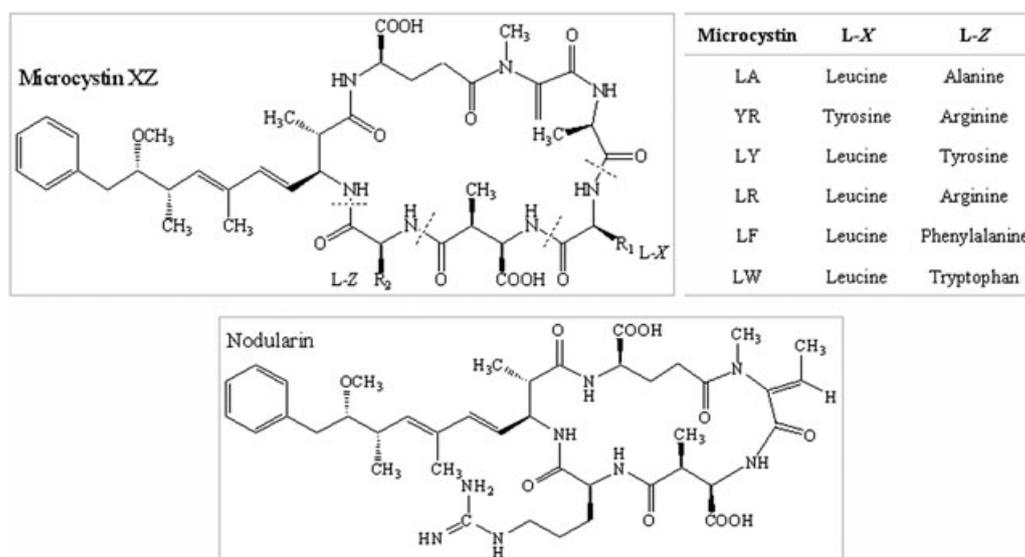


Figure 1. Structures of analyzed microcystin and nodularin compounds.

of cyanotoxins in aerosol samples, and even less is known regarding aerosol contamination and human exposure. Cheng *et al.*<sup>[6]</sup> demonstrated links between microcystin aerosol concentrations and algae blooms whereas Backer *et al.*<sup>[5]</sup> evaluated the effect of these increased microcystin concentrations during algal blooms on human exposure by evaluating the presence of MCs in personal air samples and nasal swabs. Microcystin concentrations in human plasma were below the detection limit<sup>[5]</sup> but the presence of these biological toxins in nasal swabs demonstrates the need to continue assessing their implications for human health.

Two groups of methods for cyanotoxin detection (physicochemical and biological) are generally employed in the literature. These methods differ in terms of sensitivity and selectivity, as reported by Msagati *et al.*<sup>[19]</sup> An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is useful for the routine screening of water for cyanobacterial contamination, while liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) offers robust and reliable methods for the routine confirmation and determination of toxins.<sup>[19]</sup> Chromatography allows individual identification by separating toxins,<sup>[20]</sup> while the ELISA can detect total MCs, but does not identify the individual structural variants of MCs present.<sup>[19]</sup> The recognition of individual toxins is important because each congener has a different toxicity.<sup>[21]</sup> Reversed-phase HPLC coupled with photodiode array UV detection (DAD) has been used to identify a variety of MCs, even if it is recognised that mass spectrometry detection is more specific and sensitive.<sup>[19]</sup> Modern LC/MS protocols for quantitative analysis are usually based on the reversed-phase separation coupled through an electrospray ionization (ESI) source to a single or triple quadrupole MS instrument, obtaining pg per injection values as typical detection limits.<sup>[10,14,17,22]</sup> The aim of this study was to develop a new sensitive method to simultaneously quantify seven cyanobacterial toxins (microcystin LA, LR, LF, LW, LY, YR and nodularin) in the aerosol samples.

We used liquid chromatography coupled with a triple quadrupole mass spectrometer through negative electrospray ionization. To maximize ionization, alkaline conditions were

used for the chromatographic separation, obtaining good sensitivity, good chromatographic resolution and detection limits similar to or lower than the ones reported in literature using a positive ionization source.<sup>[10,14,17,22–24]</sup> The analytical procedure was optimized for aerosol sample treatment so as to improve recovery and accuracy.

The developed method was applied to aerosol samples from the Venice Lagoon, identifying the presence of these compounds in the Venetian environment. Paoli *et al.*<sup>[25]</sup> demonstrated the presence of cyanobacteria in the Venice Lagoon but no studies were conducted to estimate the presence of toxins in the marine or atmospheric environment. To the best of our knowledge, this is the first study to determine single congeners in the aerosol matrix, as only reports of ELISA determinations exist in the literature.<sup>[5,6]</sup> This study is the first time that MCs are identified in the Venice Lagoon and future studies should be conducted to define the origin of the Venetian aerosol toxins by evaluating also their presence in the lagoon water.

## EXPERIMENTAL

### Chemicals

HPLC/MS-grade methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN) were obtained from Romil Ltd. (Cambridge, UK). The ultrapure water (18.2 M $\Omega$  cm, 0.01 TOC) was produced by a Purelab Ultra system (Elga, High Wycombe, UK). The mobile phase additive ammonium hydroxide was purchased from Fluka (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland). The algal toxins, including microcystin LA (MC-LA), microcystin LR (MC-LR), microcystin LF (MC-LF), microcystin LW (MC-LW), microcystin YR (MC-YR), microcystin LY (MC-LY) and nodularin (NOD), were purchased from Vinci Biochem (Vinci, Italy). Leucine enkephalin acetate (ENK), used as internal standard, was obtained from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany).

## Stationary phase

The Synergi Hydro (4  $\mu\text{m}$  particles, 50 mm  $\times$  4.6 mm i.d., pH range 1.5–7.5) and Synergi Fusion (4  $\mu\text{m}$  particles, 100 mm  $\times$  2 mm i.d., pH range 1.5–10) columns were purchased from Phenomenex (Torrance, USA) and the Zorbax Extend C18 column (3.5  $\mu\text{m}$  particles, 150 mm  $\times$  4.6 mm i.d., pH range 2–11.5) from Agilent Technologies (Wilmington, USA).

## Sample processing

Samples were collected in Venice on the Sacca San Biagio Island (Lat. 45°25'40.14" N–Long. 12°18'36.73"E) near the Venice harbour from June to October 2007. This area was characterized by a seasonal pattern with high temperatures in summer (July–August 20–25 °C) and low temperatures in winter (December–January 0–5 °C), as registered from station EZI-n.23 located in the industrial area by Ente della Zona Industriale di Marghera (EZI). Precipitation events are extremely variable in the spring and autumn.

The sample filters were stored in a cold room at –20 °C before analysis. The airborne aerosol was collected on a pre-combusted (4 h at 400 °C in a muffle furnace) quartz fibre filter (QFF) (SKC Inc., Eighty Four, To-13 model) using a TE 5000 high-volume air sampler (Tisch Environmental Inc., OH, USA). Blank samples were collected by loading, carrying and installing the filter holder in the instrument with the air pump closed. Samples and field blanks were stored at –20 °C in aluminium foil envelopes until analysis.

A section of the filter (1/8) was broken into small pieces and placed in a 2.0 mL Safe-Lock tube (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) using steel tweezers. The tube was previously cleaned with methanol and by sonication at room temperature. The filters were spiked with an internal standard of 100 pg of ENK before ultrasonically extracting it with 1 mL of MeOH. The extract was filtrated through a 0.2  $\mu\text{m}$  PTFE filter in order to remove particulate and filter traces before instrumental analysis. The filtrated extract solution was concentrated with nitrogen (flow max 5 psi) to dryness and the sample was reconstituted with 100  $\mu\text{L}$  of water.

## Analysis parameters

The instrumentation consisted of an Agilent 1100 series LC system (Agilent, Waldbronn, Germany) coupled to an API 4000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Toronto, Ontario, Canada) equipped with Turbo V source. The LC/MS/MS system was equipped with a vacuum degasser, binary HPLC pump system, autosampler and a thermostated column compartment, maintained at 20 °C. Analyst Software version 1.4.1. (Applied Biosystems, MDS SCIEX Instruments) was used for identification and quantification of target compounds.

### MS/MS-MRM parameters

The mass spectrometer was operated using an electrospray ionization (ESI) interface in negative mode as follows: temperature 620 °C, GS1 125 psi, GS2 60 psi, curtain gas 25 psi, collision gas (CAD) 6, ion spray voltage (IS) –4450 eV. Data were collected in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The first quadrupole (Q1) selected the precursor ion while the third quadrupole (Q3) selected the product ion of

interest and both Q1 and Q3 were set at unit resolution with peak width of  $0.7 \pm 0.1$  amu at 50% of maximum peak height.

In order to achieve the highest possible sensitivity, the declustering potential (DP), the collision energy (CE), and the collision cell exit potential (CXP) were optimized. The voltage of the orifice was controlled by the DP parameter, the CE was the amount of energy that the precursor ions received as they were accelerated into the collision cell, and the CXP was used to focus and accelerate the ions after leaving the collision cell. Optimization was performed using direct infusions of 1 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  of individual toxin standards. A summary of the monitored transitions and the DP, CE and CXP parameters for each compound are given in Table 1.

### Chromatography

The chromatographic separation used for the sample determination of MCs and NOD was conducted using a Zorbax Extend-C18 column (Rapid Resolution, 4.6  $\times$  150 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ; Agilent Technologies). Elution was achieved by a linear gradient (A: water with 19 mM  $\text{NH}_4\text{OH}$ ; B: methanol/acetonitrile (80:20)). The binary elution gradient program with flow rate of 0.5 mL  $\text{min}^{-1}$  was as follows: 0–1 min, 0% eluent B; 1–3 min, 45% eluent B; 7 min, 90% eluent B; 9–15 min, 100% eluent B; 17–27 min, equilibration with 0% eluent B; 80  $\mu\text{L}$  of sample was injected for analysis. The chromatographic separation for a standard solution of toxins is reported in Fig. 2.

### Internal standard

No isotope-labelled MCs for internal standards are commercially available, but Cong *et al.*<sup>[12]</sup> suggest that ENK can be used as an internal standard for microcystin quantification. ENK is a linear pentapeptide with the sequence Tyr–Gly–Gly–Phe Leu. ENK is usually absent in atmospheric aerosols because it is an endogenous opioid peptide neurotransmitter, found naturally in the brains of many animals and in humans. In our research, ENK demonstrated a comparable chromatographic and spectrometric behaviour to MCs.

## RESULTS AND DISCUSSION

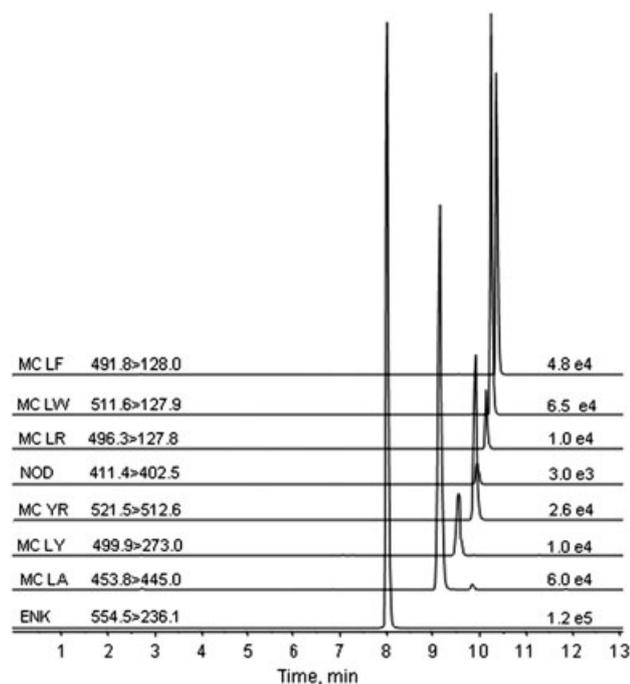
### Instrumental performance

The full scan spectra were acquired in positive and negative mode for all considered cyanotoxins where we obtained the most intense ions with negative polarity. In Fig. 3 we report the full scan spectra of a MC LA standard solution (250 pg  $\mu\text{L}^{-1}$ ) in positive and negative mode to show the more intense signal of the  $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$  ion ( $7.8 \cdot 10^6$  counts) compared to that of the  $[\text{M}+\text{H}]^+$  signal ( $5.0 \cdot 10^5$  counts). We conducted the direct infusion analysis in negative mode using single standard compounds in methanol, while single standard compounds in methanol with 0.1% formic acid were used to obtain positive full scan spectra. Moreover, Fig. 3 clearly shows that positive ionization generates more interfering species than negative ones, because we observe compound adducts with sodium, lithium, ammonium, or other cationic species in positive ion ESI.<sup>[26]</sup> The relative abundance of  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  formed by sodium (always present in the mobile phase as impurities) may vary decreasing the repeatability

**Table 1.** Transitions monitored in Q1 and Q3 and compound parameters optimized for the analytes

	MM	Precursor ion	Q1 <i>m/z</i>	Q3 <i>m/z</i>	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
NOD	824.4	[NOD-2H] <sup>2-</sup>	411.4	<b>402.5</b> 127.9	-67.0 -67.0	-18.4 -33.5	-12.0 -11.0
MC LA	909.5	[LA-2H] <sup>2-</sup>	453.9	<b>445.0</b> 127.9	-58.0 -58.0	-20.2 -29.0	-12 -11.0
ENK	555.3	[ENK-H] <sup>-</sup>	554.5	<b>236.1</b> 129.9	-100.0 -100.0	-42.0 -54.0	-6.2 -11.0
MC YR	1044.5	[YR-2H] <sup>2-</sup>	521.5	<b>512.6</b> 127.8	-70.0 -70.0	-24.0 -40.0	-15.0 -6.6
MC LY	1001.5	[LY-2H] <sup>2-</sup>	499.9	<b>273.0</b> 127.9	-62.0 -62.0	-25.2 -42.0	-6.0 -12.0
MC LW	1024.5	[LW-2H] <sup>2-</sup>	511.6	296.2 <b>127.9</b>	-66.8 -66.8	-26.0 -39.0	-8.5 -10.0
MC LF	985.5	[LF-2H] <sup>2-</sup>	491.8	<b>482.8</b> 128.0	-62.0 -62.0	-21.0 -35.0	-6.5 -7.0
MC LR	994.5	[LR-2H] <sup>2-</sup>	496.3	487.5 <b>127.8</b>	-57.0 -57.0	-23.3 -37.0	-8.0 -11.0

DP: declustering potential; CE: collision energy; CXP: collision cell exit potential.



**Figure 2.** Ion chromatogram of considered toxins and internal standard.

of the analysis.<sup>[27]</sup> With these considerations in mind, we chose an analysis with a negative ionization to simultaneously quantify all cyanotoxins investigated in this research.

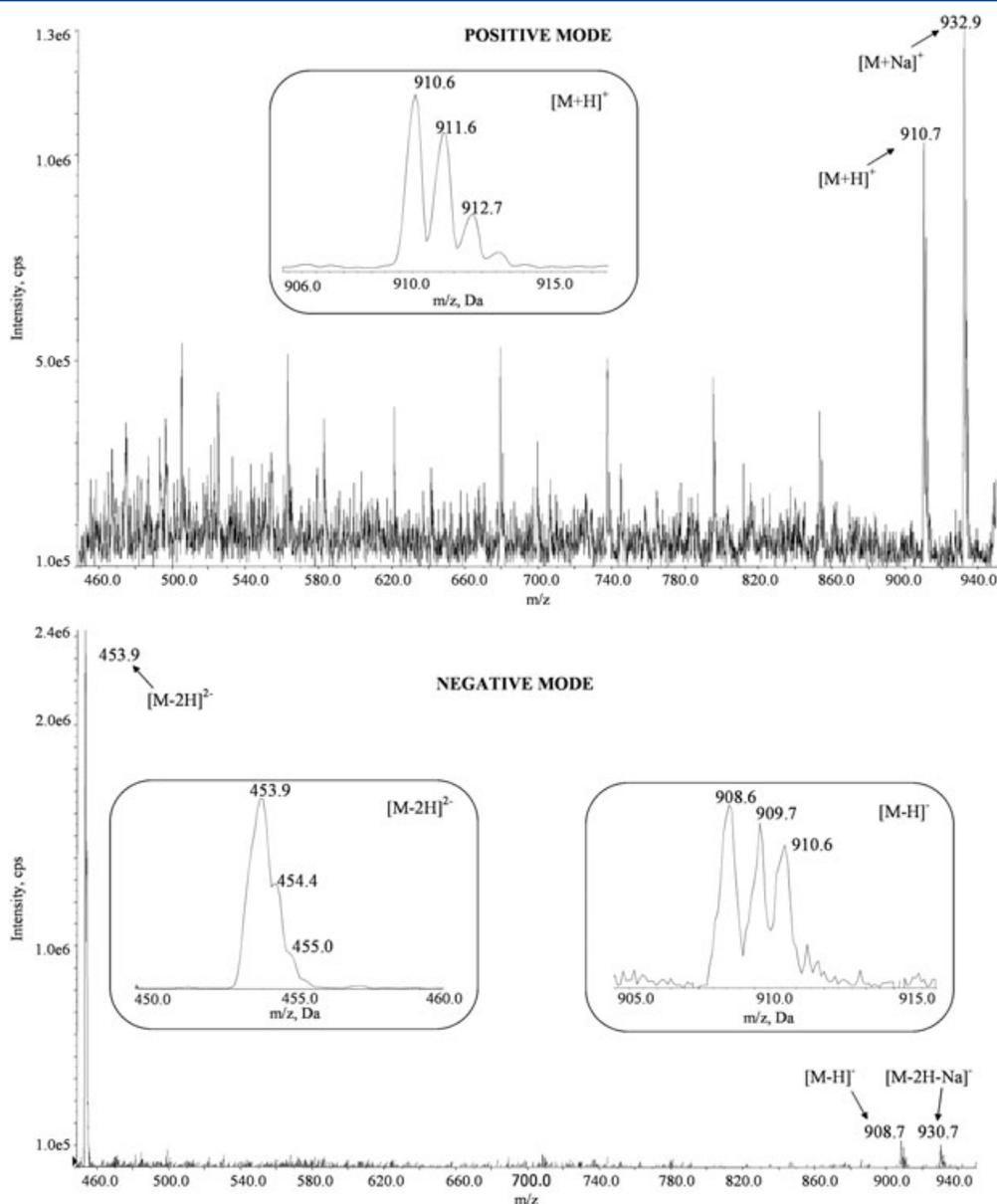
The negative full scan spectra demonstrate the prevalent presence of [M-2H]<sup>2-</sup> ions compared with the deprotonated ions [M-H]<sup>-</sup> for all MCs except for the internal standard ENK, which showed the exclusive presence of [M-H]<sup>-</sup>. These ions, generated in the first quadrupole, are used as precursor ions for MRM mode. The studies conducted in positive mode<sup>[22,28-31]</sup> report the ion fragment at *m/z* 135

as the most intense ion. This ion is formed by the fragmentation of the [M+H]<sup>+</sup> and [M+2 H]<sup>2+</sup> ions by cleavage of Adda residue.

Although ESI-MS/MS is the best instrument for microcystin quantification and results in the lowest detection limits, the structural characterization of these compounds based only on mass spectrometry is not possible.<sup>[32]</sup> Dorr *et al.*<sup>[32]</sup> investigated the dissociation behaviour of important structurally related MCs (MC LR, YR and LA) where they employed ESI in negative ion mode using an LTQ Orbitrap Velos hybrid Fourier-transform mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany). A characteristic structural fragment at *m/z* 128 was present in negative ion mode using the above-mentioned mass spectrometer with a HCD cell, a standard collision cell comparable with those used in triple quadrupole mass spectrometers. Dorr *et al.*<sup>[32]</sup> identified this fragment ion as a product of a charge-transfer reaction at a cyclic acid unit, present in all variants tested in this study.

In the present study we found the product ion at *m/z* 128 in all analyzed compounds, where we then used this characteristic ion fragment to confirm the presence of microcystins and nodularin. We found the most intense product ion at *m/z* 129.8 in the internal standard ENK and identified this ion as the leucine residue. The most intense fragments (highlighted in Table 1) were used for sample quantification while the other fragments were used to confirm compound identity. In positive mode, the ESI process is usually maximized by the addition of an acid additive, such as formic acid, acetic acid, trifluoroacetic acid or acid buffers.<sup>[27]</sup> In the chromatographic separation, these additives act as ion-pairing agents in order to minimize the interaction between basic groups and silanol groups on the silica surface.<sup>[20]</sup>

The proposed alternative method demonstrates high sensitivity and low detection limits but required avoiding acid additives, as these additives improve chromatographic separation, but cause an enormous decrease in ionization. For this reason, we used every mobile phase at neutral or



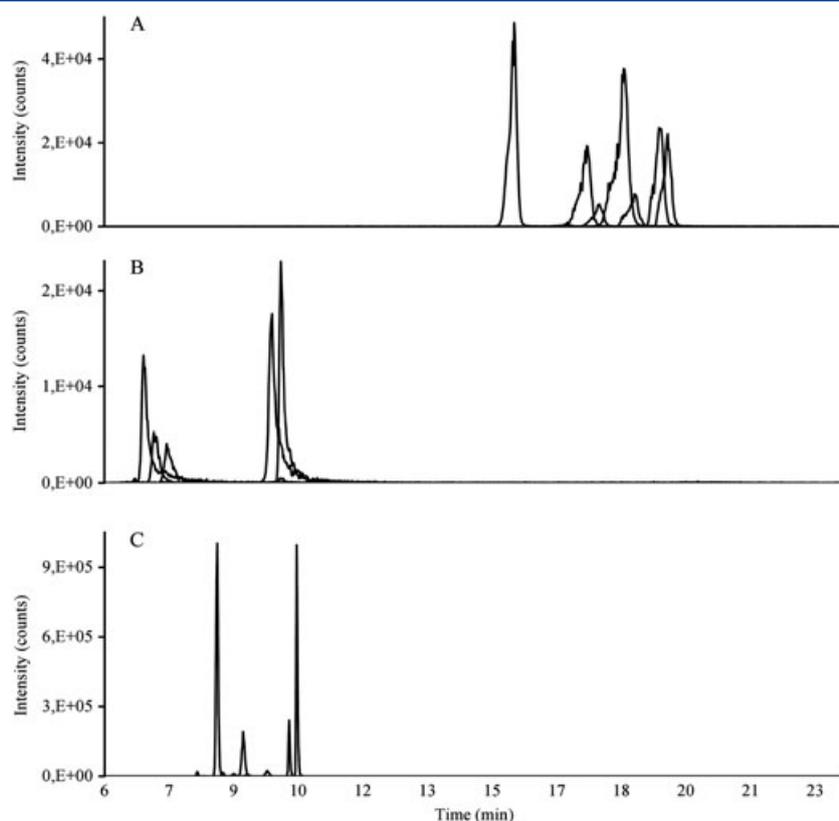
**Figure 3.** Positive and negative Q1 full scan spectra of microcystins LA standard solutions ( $250 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ ) with isotope clusters for the main ions.

basic pH. Using these mobile phases, the three columns tested (Synergi Fusion, Synergi Hydro and Zorbax Extend C18 column) retain MCs. The best conditions were optimized for each of the three columns (Fig. 4), after testing many gradients and mobile phases. We experimentally observed that the band-broadening processes for tested compounds was avoided when 100% of aqueous phase was used in the chromatographic run. The analyzed non-polar compounds showed a greater affinity with the non-polar stationary phase compared to the polar mobile phase when working with the 100% aqueous mobile phase. The combination of a Zorbax Extend C18 column and increasing the negative ion signals in mass spectrometry resulted in peak reproducibility in a 19 mM ammonium solution (pH 11). We obtained the best peak shape using the Zorbax Extend C18 column, as this column omitted tails on the chromatographic peaks (Fig. 4). We determined that methanol is the best solvent

for the ESI source<sup>[27]</sup> but the addition of acetonitrile in eluent B is necessary to improve the peak symmetry for the analyzed compounds.

In order to establish the best chromatographic separation, we calculated selectivity ( $\alpha$ ) and resolution for four pairs of close compounds. The  $\alpha$  value determines a separation of two components and is the ratio of their capacity factors, using the convention  $\alpha \geq 0$ . This factor relates the retention time of an analyte ( $t_R$ ) to the time necessary for an unretained compound to elute from the column under identical conditions ( $t_0$ ).<sup>[33]</sup> Another measure of how well species are separated is by measuring the resolution of peak widths.<sup>[33]</sup> The selectivity for each pair is similar for the three columns while the resolution, which includes the peak widths, differs between columns (Table 2).

In general, a resolution of 1.0 is usually sufficient for a qualitative analysis and a resolution of 1.5 or greater is needed for an accurate quantitative analysis.<sup>[34]</sup> If we consider this



**Figure 4.** (A) Chromatogram of the best separation of the analyzed cyanotoxins on the Synergi Fusion 100 mm  $\times$  2 mm i.d. column with 10  $\mu$ L injected. Mobile phase: aqueous solution (A) and methanol/acetonitrile 80:20 (B). Flow rate: 200  $\mu$ L  $\text{min}^{-1}$ . Linear gradient: 0–2 min 0% B, 4 min 75% B, 10 min 50%B, 15–20 min 100% B; 27–37 min 0% B. (B) Chromatogram obtained with Synergi Hydro 50 mm  $\times$  4.6 mm i.d. column. 10  $\mu$ L injected. Mobile phase: aqueous solution (A) and methanol (B). Flow rate: 500  $\mu$ L  $\text{min}^{-1}$ . Linear gradient: 0–2 min 0% B, 3–6 min 5% B, 7–9 min 75% B; 11–16 min, 100% eluent B; 18–25 min 0% B. (C) Chromatogram obtained with Zorbax Extend C18 150 mm  $\times$  4.6 mm column. The conditions used are reported in the ‘Chromatography’ section.

**Table 2.** Chromatographic performance data from comparing various columns

Selectivity			
	Synergi Fusion	Synergi Hydro	Zorbax Extend
YR/LA	0.95	0.96	1.08
LR/LY	0.95	1.01	1.13
LR/LA	0.97	1.04	1.15
LR/YR	1.02	1.08	1.07
Resolution			
	Synergi Fusion	Synergi Hydro	Zorbax Extend
YR/LA	0.55	0.17	1.37
LR/LY	0.68	0.05	1.84
LR/LA	0.41	0.19	2.40
LR/YR	3.09	3.70	2.94

parameter, the only column allowing a quantitative analysis is the Zorbax Extend column. We observed that both Synergi columns degraded within a few weeks while the Zorbax Extend column demonstrated reproducible performances in the long

term. As suggested by the producer of the Zorbax Extend column, we used a 19 mM ammonium (pH 11) solution as eluent A in order to inhibit non-charged basic compounds interacting with the underlying silica and diminishing column degradation.

### Quality control

We validated the analytical procedure by determining of trueness, precision, procedural blank, detection limit, quantification limit, extraction yield and linearity range.

#### Linear range

As we quantified toxins using internal standards, we estimated the linearity of the calibration curve by considering the ratio between the concentration of toxins and ENK and the ratio between relative peak areas. We used a series of standard solutions prepared in water at the concentrations of 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5, 10, 20, 50, 75 and 100  $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$  resulting in a linearity of  $R^2 > 0.99$  (Table 3). The instrumental precision at four concentration levels (0.05, 1, 10, 100  $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$ ,  $n=3$ ) resulted in relatively low coefficients of variation (CV%) (Table 3).

#### Trueness, recovery and repeatability

Due to the lack of certified reference materials for aerosol or dust, we estimated trueness, precision and recovery by analyzing five spiked cleaned QFF with 100  $\text{pg}$  of ENK and 100  $\text{pg}$  of every considered toxin. The difference between the mean values and the 'true' values ranged from  $-10\%$  (MC LR) to  $16\%$  (NOD). The method precision in terms of repeatability was obtained by calculating the standard deviation (SD) and the relative standard deviation (RSD%) by consecutive measurements of the spiked samples ( $n=5$ ). Repeatability was always lower than  $9\%$ .

We evaluated the recovery by conducting the entire analytical procedure without the preconcentration phase, in order to estimate possible errors exclusively linked to the preconcentration step. We observed that the recoveries without the preconcentration phase ranged between  $74\%$  (MC YR) and  $98\%$  (NOD) while total procedure recoveries decreased between  $42\%$  (MC YR) and  $89\%$  (MC LF), revealing high losses in this step. Even with the observed losses, the preconcentration phase is a key step to change the solvent and to improve the peak shape in order to decrease the procedural detection limits.

#### Detection limit

The instrumental detection (LOD) and quantification (LOQ) limits were evaluated using the method of Bliesner<sup>[35]</sup> who defined the LOD and LOQ as three and ten times the

signal-to-noise (S/N) ratio of a known absolute amount of the analyzed target compound in a standard solution (Table 3). We obtained LOD values ranging between  $1 \text{ fg}/\mu\text{L}$  (MC LW, MC LF) and  $9 \text{ fg}/\mu\text{L}$  (MC YR). The literature reports LODs ranging between  $\text{pg}/\mu\text{L}$  and  $\text{ng}/\mu\text{L}$ .<sup>[7,11,12,17,22,23]</sup> Our observed instrumental detection limits are similar to the best LOD values reported in the literature<sup>[14]</sup> using ESI(+)-MS/MS, proving that our method is a valid alternative.

We quantified the detection limit (MDL) and the quantification limit (MQL) of the analytical procedure as three and ten times the SD of the average value of the field blanks ( $n=5$ ). We obtained the lowest value of MDLs for MC LA (23  $\text{pg}$  absolute amount), MC LW (29  $\text{pg}$  absolute amount), MC LF (49  $\text{pg}$  absolute amount) and MC LY (55  $\text{pg}$  absolute amount), while MDLs of MC YR (88  $\text{pg}$  absolute amount), NOD (140  $\text{pg}$  absolute amount) and MC LR (164  $\text{pg}$  absolute amount) were much higher. To the best of our knowledge, only Cheng *et al.*<sup>[6]</sup> have reported a procedural LOD of 648  $\text{pg}$  absolute amount for the determination of MC LR in aerosol samples.

### Method application

We analyzed ten aerosol samples collected in the Venice Lagoon from June to October 2007 using the developed method (Fig. 5). The concentrations of MC LY, MC YR, MC LR and NOD were below the detection limits in all analyzed samples, while MC LA, MC LW and MC LF were found in some samples from June to July. MC LA concentrations ranged between 90 and  $706 \text{ fg m}^{-3}$ , MC LW values between 177 and  $262 \text{ fg m}^{-3}$  and MC LF concentrations varied between 130 and  $369 \text{ fg m}^{-3}$ . In order to assure the effective presence of MCs in the aerosol samples, we considered the ratio between quantifier and qualifier ions. The differences between relative abundances in product ions are expected to agree with  $20\%$  of the absolute abundance of the same ions in the reference standard analyzed under the same experimental conditions.<sup>[36]</sup> We verified this principle in all samples where the concentration of MCs was over the detection limits. The selected ion chromatograms for MC LA in the 19 July sample are reported in Fig. 6.

Identifying the origin of the considered cyanotoxins found in the atmosphere is complicated because MCs are very stable compounds<sup>[37]</sup> and particulate matter may

**Table 3.** Calibration curve parameters, instrumental precision as coefficients of variation (CV%), instrumental detection (LOD) and quantification limit (LOQ) for all analyzed toxins. 80  $\mu\text{L}$  volume of samples were injected

	Calibration curve	$R^2$	CV% $0.05 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$	CV% $1 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$	CV% $10 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$	CV% $100 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$	LOD ( $\text{pg}$ )	LOQ ( $\text{pg}$ )
NOD	$y = 0.1513x + 0.1421$	0.9959	2	4	3	4	0.4	1.7
MC LA	$y = 0.6511x + 1.2516$	0.9859	8	3	2	3	0.4	1.4
MC LY	$y = 0.175x + 0.1889$	0.9929	4	13	6	2	0.2	0.8
MC YR	$y = 0.4217x + 0.1014$	0.9993	10	2	3	2	0.7	3.8
MC LW	$y = 0.2381x + 0.1526$	0.9969	6	5	5	4	0.1	0.5
MC LF	$y = 0.8373x + 1.085$	0.9941	4	10	9	2	0.1	0.2
MC LR	$y = 0.342x + 0.3328$	0.9975	9	6	2	3	0.4	3.1

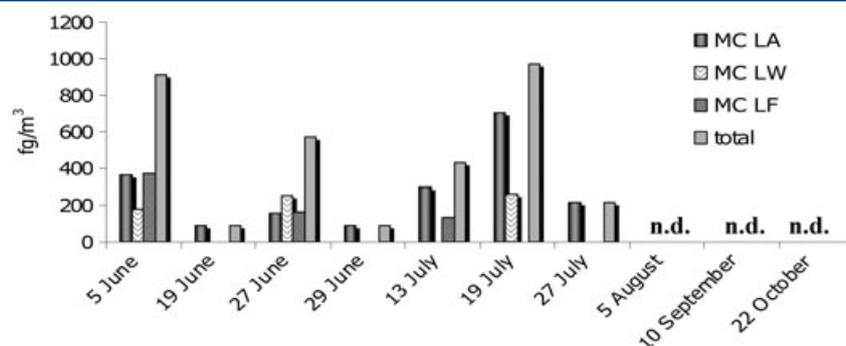


Figure 5. Concentration of microcystins in aerosol samples in the Venice Lagoon.

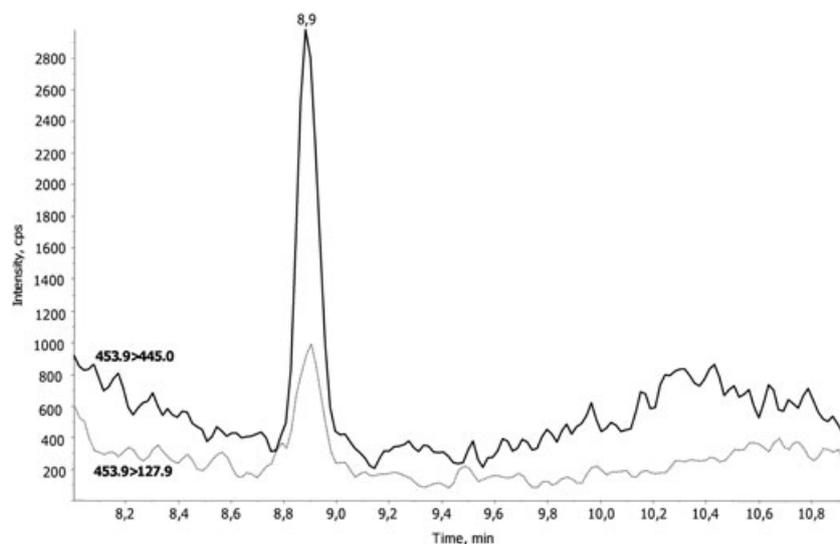


Figure 6. Selected ion chromatography of MC LA in a July 19 Venetian aerosol sample.

transport these compounds for many kilometres without degradation. Paoli *et al.*<sup>[25]</sup> report the presence of cyanobacteria in the Adriatic Sea and in the Venice Lagoon, even if they do not conduct research to investigate the presence of cyanotoxins. Miller *et al.*<sup>[38]</sup> argue that transportation from freshwater sources may be an important source of atmospheric cyanotoxins. Backer *et al.*<sup>[39]</sup> investigated microcystin concentrations in aerosol samples using a high-volume sampler during a *Microcystis aeruginosa* bloom, resulting in concentrations between 50  $\text{pg m}^{-3}$  to 23  $\text{ng m}^{-3}$ . Another study of aerosols during a *Microcystis aeruginosa* bloom resulted in concentration values of 1.8  $\text{pg m}^{-3}$ .<sup>[40]</sup>

In our work, the total concentration of MCs varies between 91 and 909  $\text{fg m}^{-3}$ . These values are lower than previous studies<sup>[5,39–41]</sup> which analyzed aerosols when *Microcystis* blooms were near the sampling sites. Our lower values indicate a probable long-range transport of cyanotoxins on particulate matter. More studies are needed to increase our knowledge of the atmospheric transformations of cyanotoxins in Venetian aerosols.

## CONCLUSIONS

We have created a sensitive analytical method to determine trace concentrations of six microcystins and nodularin in aerosol samples, using liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometer using negative ionization. We developed a chromatographic separation using alkaline conditions, resulting in high-resolution separation. The LODs for all toxins were determined between 1 and 9  $\text{fg}/\mu\text{L}$ , which are similar to or lower than those reported in the literature,<sup>[7,11,12,17,22,23]</sup> while the MDLs ranged between 23 and 164  $\text{pg}$  absolute amount. As no available cyanotoxin certified reference atmospheric materials exist, we validated the method by spiking five clean fibre filters. We obtained good precision, recoveries and low percentage errors for all considered cyanotoxins. We applied the method to ten aerosol samples from the Venice Lagoon where we found trace concentrations of MC LA, MC LF and MC LW and values below detection limits for the other investigated toxins. Further studies should assess the origin of these compounds in the urban atmosphere.

## Acknowledgements

This work was supported by the National Research Council of Italy (CNR). The authors gratefully acknowledge the help of ELGA LabWater in providing the PURELAB Option-R and Ultra Analytic, which produced the ultra-pure water used in these experiments. The authors thank Dr. Sara Bogialli (University of Padova) for the scientific discussions.

## REFERENCES

- [1] M. E. van Apeldoorn, H. P. van Egmond, G. J. A. Speijers, G. J. I. Bakker. Toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 7.
- [2] J. Osswald, S. Rellan, A. Gago, V. Vasconcelos. Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environ. Int.* **2007**, *33*, 1070.
- [3] R. W. MacKintosh, K. N. Dalby, D. G. Campbell, P. T. W. Cohen, P. Cohen, C. MacKintosh. The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. *FEBS Lett.* **1995**, *371*, 236.
- [4] B. M. Paddle. Therapy and prophylaxis of inhaled biological toxins. *J. Appl. Toxicol.* **2003**, *23*, 139.
- [5] L. C. Backer, S. V. McNeel, T. Barber, B. Kirkpatrick, C. Williams, M. Irvin, Y. Zhou, T. B. Johnson, K. Nierenberg, M. Aubel, R. LePrel, A. Chapman, A. Foss, S. Corum, V. R. Hill, S. M. Kieszak, Y. S. Cheng. Recreational exposure to microcystins during algal blooms in two California lakes. *Toxicon* **2010**, *55*, 909.
- [6] Y. S. Cheng, Y. Zhou, C. M. Irvin, B. Kirkpatrick, L. C. Backer. Characterization of aerosols containing microcystin. *Mar. Drugs* **2007**, *5*, 136.
- [7] O. Allis, J. Dauphard, B. Hamilton, A. N. Shuilleabhain, M. Lehane, K. J. James, A. Furey. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry application, for the determination of extracellular hepatotoxins in Irish lake and drinking waters. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 3436.
- [8] M. V. Ame, L. N. Galanti, M. L. Menone, M. S. Gerpe, V. J. Moreno, D. A. Wunderlin. Microcystin-LR, -RR, -YR and -LA in water samples and fishes from a shallow lake in Argentina. *Harmful Algae* **2010**, *9*, 66.
- [9] L. A. Lawton, H. Chambers, C. Edwards, A. A. Nwaopara, M. Healy. Rapid detection of microcystins in cells and water. *Toxicon* **2010**, *55*, 973.
- [10] C. M. Li, R. Y. Y. Chu, D. P. H. Hsieh. An enhanced LC-MS/MS method for microcystin-LR in lake water. *J. Mass Spectrom.* **2006**, *41*, 169.
- [11] L. F. Zhang, X. F. Ping, Z. G. Yang. Determination of microcystin-LR in surface water using high-performance liquid chromatography/tandem electrospray ionization mass detector. *Talanta* **2004**, *62*, 193.
- [12] L. M. Cong, B. F. Huang, Q. Chen, B. Y. Lu, J. Zhang, Y. P. Ren. Determination of trace amount of microcystins in water samples using liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *569*, 157.
- [13] M. Douma, Y. Ouahid, F. F. del Campo, M. Loudiki, K. Mouhri, B. Oudra. Identification and quantification of cyanobacterial toxins (microcystins) in two Moroccan drinking-water reservoirs (Mansour Eddahbi, Almassira). *Environ. Monit. Assess.* **2010**, *160*, 439.
- [14] A. Mekebri, G. J. Blondina, D. B. Crane. Method validation of microcystins in water and tissue by enhanced liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 3147.
- [15] J. L. Ott, W. W. Carmichael. LC/ESI/MS method development for the analysis of hepatotoxic cyclic peptide microcystins in animal tissues. *Toxicon* **2006**, *47*, 734.
- [16] K. M. Karlsson, L. E. M. Spooft, J. A. O. Meriluoto. Quantitative LC-ESI-MS analyses of microcystins and nodularin-R in animal tissue – Matrix effects and method validation. *Environ. Toxicol.* **2005**, *20*, 381.
- [17] M. Dai, P. Xie, J. Chen, G. D. Liang, Y. Liu, T. Qiu. Quantitative determination of microcystins in rat plasma by LC-ESI tandem MS. *Chromatographia* **2008**, *68*, 811.
- [18] B. C. Sekadende, T. J. Lyimo, R. Kurmayer. Microcystin production by cyanobacteria in the Mwanza Gulf (Lake Victoria, Tanzania). *Hydrobiologia* **2005**, *543*, 299.
- [19] T. A. M. Msagati, B. A. Siame, D. D. Shushu. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquat. Toxicol.* **2006**, *78*, 382.
- [20] J. Meriluoto. Chromatography of microcystins. *Anal. Chim. Acta* **1997**, *352*, 277.
- [21] R. R. Stotts, M. Namikoshi, W. M. Haschek, K. L. Rinehart, W. W. Carmichael, A. M. Dahlem, V. R. Beasley. Structural modifications imparting reduced toxicity in microcystins from *Microcystis* spp. *Toxicon* **1993**, *31*, 783.
- [22] J. Pietsch, S. Fichtner, L. Imhof, W. Schmidt, H. J. Brauch. Simultaneous determination of cyanobacterial hepato- and neurotoxins in water samples by ion-pair supported enrichment and HPLC-ESI-MS-MS. *Chromatographia* **2001**, *54*, 339.
- [23] S. Hiller, B. Krock, A. Cembella, B. Luckas. Rapid detection of cyanobacterial toxins in precursor ion mode by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42*, 1238.
- [24] A. D. Jungblut, I. Hawes, D. Mountfort, B. Hitzfeld, D. R. Dietrich, B. P. Burns, B. A. Neilan. Diversity within cyanobacterial mat communities in variable salinity melt-water ponds of McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Environ. Microbiol.* **2005**, *7*, 519.
- [25] A. Paoli, M. Celussi, A. Valeri, C. Larato, A. Bussani, S. F. Umani, M. R. Vadrucchi, C. Mazziotti, P. Del Negro. Picocyanobacteria in Adriatic transitional environments. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **2007**, *75*, 13.
- [26] N. B. Cech, C. G. Enke. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrom. Rev.* **2001**, *20*, 362.
- [27] R. Kostianen, T. J. Kauppila. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 685.
- [28] M. Yuan, M. Namikoshi, A. Otsuki, K. L. Rinehart, K. Sivonen, M. F. Watanabe. Low-energy collisionally activated decomposition and structural characterization of cyclic heptapeptide microcystins by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **1999**, *34*, 33.
- [29] H. Mazur-Marzec, J. Meriluoto, M. Plinski, J. Szafranek. Characterization of nodularin variants in *Nodularia spumigena* from the Baltic Sea using liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 2023.
- [30] C. Hummert, J. Dahlmann, K. Reinhardt, H. P. H. Dang, D. K. Dang, B. Luckas. Liquid chromatography-mass spectrometry identification of microcystins in *Microcystis aeruginosa* strain from Lake Thanh Cong, Hanoi, Vietnam. *Chromatographia* **2001**, *54*, 569.
- [31] L. Spooft, P. Vesterkvist, T. Lindholm, J. Meriluoto. Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1020*, 105.
- [32] F. A. Dorr, D. Oliveira-Silva, N. P. Lopes, J. Inglesias, D. A. Volmer, E. Pinto. Dissociation of deprotonated microcystin variants by collision-induced dissociation following electrospray ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 1981.

- [33] V. L. McGuffin. *Chromatography*, Journal of Chromatography Library, **2004**.
- [34] B. Ardrey. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. An Introduction*, John Wiley, Chichester, **2003**, p. 18.
- [35] D. M. Bliesner. *Validating Chromatographic Methods: A Practical Guide*, John Wiley, Hoboken, NJ, **2006**.
- [36] A. Zaccaroni, D. Scaravelli. *Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection*. CNR Institute of Biophysics, Pisa, Italy, **2007**.
- [37] L. Y. T. Li, D. A. Campbell, P. K. Bennet, J. Henion. Acceptance criteria for ultratrace HPLC-tandem mass spectrometry: quantitative and qualitative determination of sulfonyleurea herbicides in soil. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3397.
- [38] K. Tsuji, T. Watanuki, F. Kondo, M. F. Watanabe, S. Suzuki, H. Nakazawa, M. Suzuki, H. Uchida, K. Harada. Stability of microcystins from cyanobacteria. 2. Effect of UV light on decomposition and isomerization. *Toxicon* **1995**, *33*, 1619.
- [39] M. A. Miller, R. M. Kudela, A. Mekebri, D. Crane, S. C. Oates, M. T. Tinker, M. Staedler, W. A. Miller, S. Toy-Choutka, C. Dominik, D. Hardin, G. Langlois, M. Murray, K. Ward, D. A. Jessup. Evidence for a novel marine harmful algal bloom: cyanotoxin (microcystin) transfer from land to sea otters. *Plos Ones* **2010**, *9*, e12576.
- [40] L. C. Backer, W. Carmichael, B. Kirkpatrick, C. Williams, M. Irvin, Y. Zhou, T. B. Johnson, K. Nierenberg, V. R. Hill, S. M. Kieszak, Y. S. Cheng. Recreational exposure to low concentrations of microcystins during an algal bloom in a small lake. *Mar. Drugs* **2008**, *6*, 389.
- [41] S. A. Wood, D. R. Dietrich. Quantitative assessment of aerosolized cyanobacterial toxins at two New Zealand lakes. *J. Environ. Monit.* **2011**, *13*, 1617.

## **Ringraziamenti**

*Dedico questa tesi al mio papà che nonostante non abbia potuto tenerla tra le mani ha condiviso insieme a me i momenti felici e le delusioni di questo lungo periodo di studi. Un ringraziamento a tutta la mia famiglia, la mia mamma e la mia sorellina, i miei nonni e Mariuccia per avermi sopportata e avermi sempre sostenuto. Un grazie particolare a Omar, mio primo aiuto non solo morale ma anche pratico: la mia mano lo ringrazia per aver ideato il sistema di filtrazione, oltre ai tanti prelievi di acqua di mare e di molluschi che mi hanno permesso di fare le numerose prove contenute nella tesi.*

*Questo dottorato mi ha permesso di essere inserita in un gruppo di ricerca composto da tante persone eccezionali che mi hanno sostenuto e aiutato ad affrontare i vari problemi che si sono presentati.*

*Il primo grazie lo devo a Roberta, che mi ha trasmesso la passione per la chimica analitica e che mi ha insegnato tutto quello che so sulla tecnica LC-MS. Secondo ma non meno importante grazie va al prof. Gambaro, che mi ha sempre sostenuto e spronato durante i vari insuccessi della mia ricerca, sollevandomi il morale con la celeberrima frase: "la ricerca è sofferenza". Ringrazio entrambi per i preziosi consigli che mi hanno permesso di concludere questo dottorato.*

*Ringrazio il mio tutor, il prof. Barbante, e il CNR-IDPA per avermi messo a disposizione le strumentazioni e il materiale per il mio lavoro.*

*Un ringraziamento speciale va alla mia bionda (Chiara) che oltre ad aver condiviso con me la scrivania è stata un'amica, presente nei vari momenti del dottorato. Ma come non ringraziare Saretta, che con la sua spontaneità ha sempre rallegrato tutto questo periodo intenso di lavoro, oltre ad essere è stata la mia "maestra" del sistema LC-ICP-MS. Non posso dimenticare i mesi passati al Q1 con Marco Roman, che ringrazio per la pazienza avuta a lavorare con me, sotto la supervisione di Warren, che nonostante io abbia rotto tutti i possibili pezzi dell'ICP, ha sempre affrontato la cosa con il solito humor inglese.*

*L'aspetto animato è sempre stato un mio grosso limite e quindi come non ringraziare Fabiana per avermi fatto conoscere ed apprezzare le bestie algali. Grazie a Stefano per essere sempre disponibile a scambiare opinioni. Un grande ringraziamento a Silvia che (insieme a Elisa, Valentina, Michela, Anna e Lisa) mi ha aiutato nei tanti esperimenti contenuti nella tesi.*

*L'esperienza più incredibile della mia vita è stata la spedizione antartica e quindi un primo ringraziamento lo devo fare alle persone che mi hanno permesso di vivere queste emozioni. Ricordando i mesi intensissimi che hanno preceduto la partenza, esprimo la mia gratitudine a Valter, con il quale ho passato due mesi a preparare il container e le magiche GO-FLO. Ringrazio anche Clara per i suoi preziosissimi consigli sulla campagna oceanografica. Un ringraziamento lo dedico a Marco Vecchiato, con il quale ho condiviso il corso di addestramento e alcune emozioni della spedizione "ringraziandolo" anche per i suoi continui rimproveri in laboratorio che mi "rallegrano" le giornate.*

*Un grazie generale lo estendo a tutti i partecipanti della campagna oceanografica che mi hanno aiutato e sopportato nei due mesi di lavoro in nave. Uno particolare lo devo al "gruppo chimica": Silvia, la mia compagna di cabina e di cantate, Sandro e Simone, per l'aiuto a filtrare i numerosissimi campioni. Un grazie speciale a Pierluigi che mi ha fatto risorgere dal mal di mare e per l'aiuto informatico.*

*Grazie a tutti voi mi avete fatto crescere professionalmente, regalandomi momenti fantastici nonostante il periodo non fosse dei migliori!*

