

STRATEGIE ANALITICHE PER L'IDENTIFICAZIONE DI MICROINQUINANTI ORGANICI NON OGGETTO DI ORDINARIO CONTROLLO

Sara Bogialli

Dipartimento di Scienze Chimiche, Università degli Studi di Padova

La necessità di avere informazioni sulla presenza nelle acque di microinquinanti organici diversi da quelli oggetto di ordinario (parametrici) o straordinario controllo (es. *Watch List*), e che possano avere un interesse sanitario, è sentita e strutturata nella comunità scientifica e negli Enti internazionali preposti alla tutela della salute dell'uomo e dell'ambiente. Questa esigenza è stata però certamente declinata a livello strategico con l'implementazione dei *Water Safety Plans*. I progressi tecnologici degli ultimi quindici anni nell'ambito della chimica analitica strumentale hanno permesso di proporre protocolli di analisi versatili e più affidabili nelle strategie di analisi di composti non oggetto di ordinario controllo, o analisi di composti incogniti (*unknown*). L'accesso e la diffusione delle strumentazioni e delle relative conoscenze sono stati poi supportati dagli investimenti che molte aziende, anche nel settore idrico, hanno effettuato per dare seguito a strategie di controllo preventivo che aumentano sia il grado di protezione della salute pubblica, sia il valore aggiunto che il prodotto acqua acquista in termini di controllo della filiera produttiva.

Armonizzazione dei protocolli per analisi di composti incogniti: l'esperienza del network NORMAN

Dal punto di vista tecnico, la ricerca in chimica analitica ha proposto per molti anni metodi basati sulla spettrometria di massa ad alta risoluzione (*High Resolution Mass Spectrometry*, HRMS) in grado di determinare con grande accuratezza segnali ionici incogniti per i quali in seguito proporre una identificazione su base strutturale. Questa rivoluzione ha riguardato soprattutto la configurazione strumentale che prevede l'accoppiamento con la cromatografia liquida (*Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry*, LC-HRMS), dal momento che la tecnica GC-MS è da tempo consolidata per confrontare in maniera robusta i dati sperimentali con enormi database di molecole. Solo più recentemente, e anche nell'ambito della rete NORMAN (*Network of reference laboratories, research centres and related organisations for monitoring of emerging environmental substances*) (<https://www.norman-network.net/>) si è cercato di armonizzare i protocolli analitici esistenti per le analisi di composti incogniti con lo scopo di razionalizzare le strategie per il monitoraggio di sostanze emergenti nell'ambiente. Con l'occasione, è stata anche proposta una armonizzazione del linguaggio, definendo le caratteristiche delle analisi con approccio *target*, *suspect screening* e *non-target*. L'approccio, schematizzato in Figura 1, prevede un livello di affidabilità (confidenza) crescente per le ipotesi di identificazione delle sostanze, in relazione alle informazioni ottenute, siano esse puramente strumentali, da letteratura o per comparazione con standard certificati (Schymanski *et al.*, 2015).

Il raggiungimento del livello massimo di confidenza coincide con le analisi *target*, il livello minimo con le analisi *non-target*, e livelli intermedi con analisi denominate di *suspect screening*. Quest'ultimo gruppo è forse quello più interessante dal punto di vista dell'efficacia del monitoraggio di possibili microinquinanti non oggetto di ordinario controllo.

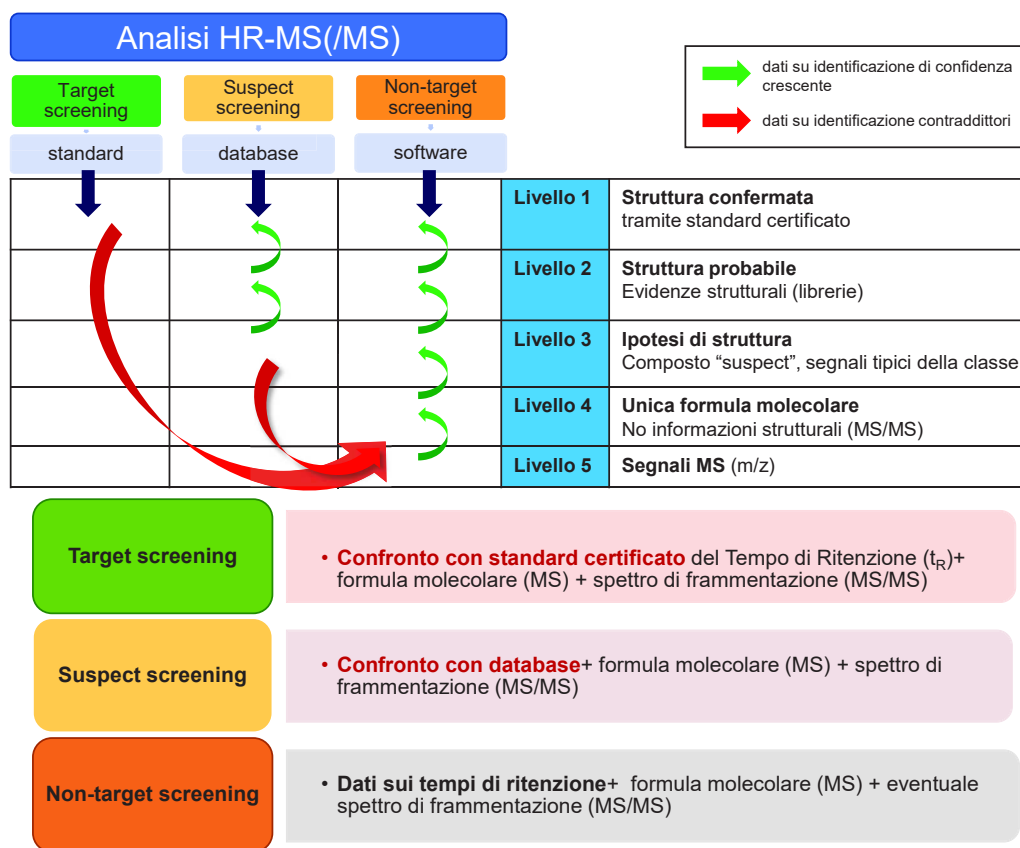


Figura 1. Definizioni e livelli di confidenza caratteristici delle strategie analitiche basate su spettrometria di massa ad alta risoluzione

La strategia analitica si basa essenzialmente sull'avere delle ipotesi a proposito della presenza di un certo numero di contaminanti, dei quali è possibile recuperare informazioni sulla struttura chimica e sui segnali mass spettrometrici associati alle misure della molecola intatta o frammentata (modalità *tandem mass spectrometry*). Questo permette di confrontare i segnali acquisiti con le informazioni presenti in una libreria, popolata da informazioni derivanti da dati sperimentali, che servono per assegnare una identificazione affidabile. D'altra parte il processo di identificazione prevede che i livelli di confidenza si possano perdere o acquisire: questo vuol dire che una convenzionale analisi *target*, in assenza della perfetta rispondenza ai requisiti tecnici previsti, può essere declassata (caso di falso positivo); allo stesso modo un risultato strumentale di tipo *non-target* che guadagni informazioni utili, può infine raggiungere il massimo livello di confidenza se in seguito alle ipotesi fatte ci si procura uno standard certificato con cui confrontare i dati ottenuti.

Utilizzo dei protocolli analitici per analisi di composti incogniti nell'ambito dei *Water Safety Plans*

È interessante interpretare, alla luce delle possibilità analitiche appena descritte, quanto stabilito dal DM del 14 giugno 2017 (recepimento della Direttiva 2015/1787) nella parte relativa alla valutazione del rischio (C, art. 4 c) che recita che la valutazione del rischio deve comprendere

“[...] dati di monitoraggio per elementi chimici e sostanze non oggetto di ordinario controllo sulla base di elementi di rischio sito-specifici”. In effetti la valutazione del rischio sito-specifica può essere facilmente tradotta in una lista di composti da utilizzare per il monitoraggio anche tramite il protocollo del *suspect screening*.

Questo è un esempio di strategia che può essere descritta come “top-down” analogamente alle definizioni utilizzate in altre discipline, come la proteomica. Molte informazioni già in possesso degli impianti, i dati storici, la banca dati della filiera idro-potabile, alcuni elenchi di controllo trasmessi dall’Unione Europea, dalle Agenzie per la protezione ambientale o sanitaria, da istituti nazionali o comunitari possono concorrere, in seguito ad un adeguato processo di revisione critica e prioritizzazione, a compilare una efficace lista per il *suspect screening*.

L’approccio opposto, denominato “bottom-up” in sostanza declina il protocollo di analisi *non-target*. Questo è il vero tentativo di ricerca di composti incogniti, molto più difficile, per cui non ci sono ipotesi a priori; i risultati sperimentali costituiscono la base dati che deve essere filtrata attraverso step consecutivi in modo da ridurre l’enorme mole di dati (un tipico ordine di grandezza è di circa 2000-10000 composti evidenziati in estratti di campioni di acqua) prima di arrivare a proposte di identificazione affidabili. Questo passaggio di analisi dei dati è in genere supportato da potenti software commerciali in grado di evidenziare i segnali più significativi, e contemporaneamente fare analisi statistiche e di classificazione. È sicuramente indispensabile comunque supervisionare i dati in maniera critica per aggiungere il valore che solo specifiche competenze possono assicurare. In Figura 2 è riportata una rappresentazione dei due differenti approcci.

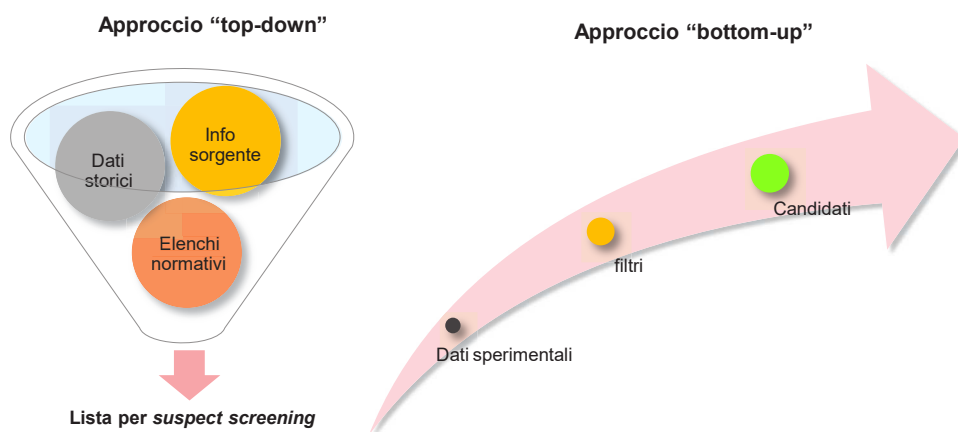


Figura 2. Diversi approcci strategici per il monitoraggio di composti non oggetto di ordinario controllo nelle acque

Degno di nota è il fatto che il protocollo *non-target* può fornire informazioni utili ad integrare la lista del *suspect screening* con un processo iterativo. È possibile inoltre, attraverso strumenti statistici, desumere informazioni importanti sulla caratterizzazione del sito o sulla correlazione tra composti presenti in campioni diversi, come per esempio prima o dopo un trattamento specifico di potabilizzazione.

Esempi di applicazioni di protocolli analitici per il monitoraggio di microinquinanti organici incogniti nelle acque

Sono qui riportati due esempi di applicazione di questi protocolli di analisi al monitoraggio non ordinario di differenti tipologie di acque. Il primo si riferisce ad un monitoraggio specifico di una classe di contaminanti (cianotossine) in acque superficiali destinate a consumo umano, il secondo al monitoraggio non ordinario di acque reflue.

Analisi di cianotossine

È stata costruita una libreria di circa 400 composti appartenenti a varie classi di cianotossine (es. microcistine, anabaenopetine, nodularine e altri oligopetidi) comprendente la formula bruta e di struttura in file leggibili dai software commerciali. Campioni di acqua trattati secondo protocolli convenzionalmente utilizzati per le analisi di composti *target*, sono stati processati secondo due approcci, entrambi basati sul *suspect screening* (Figura 3) (Bogialli *et al.*, 2017): il primo approccio prevede un protocollo analitico in due step (due corse analitiche), tra i quali viene effettuata un'analisi dei dati post-acquisizione strumentale. Nel primo step vengono registrati i segnali relativi alla molecola intera. La libreria viene usata per evidenziare i potenziali risultati positivi, i dati vengono filtrati e i composti sospetti vengono sottoposti a conferma strutturale (step due) tramite spettrometria di massa tandem (MS/MS). La seconda possibilità prevede la costruzione di un protocollo di analisi automatico che utilizza la libreria direttamente per cercare i segnali selezionati, e in caso positivo, si procede direttamente a conferma strutturale tramite MS/MS, il tutto in una analisi unica.

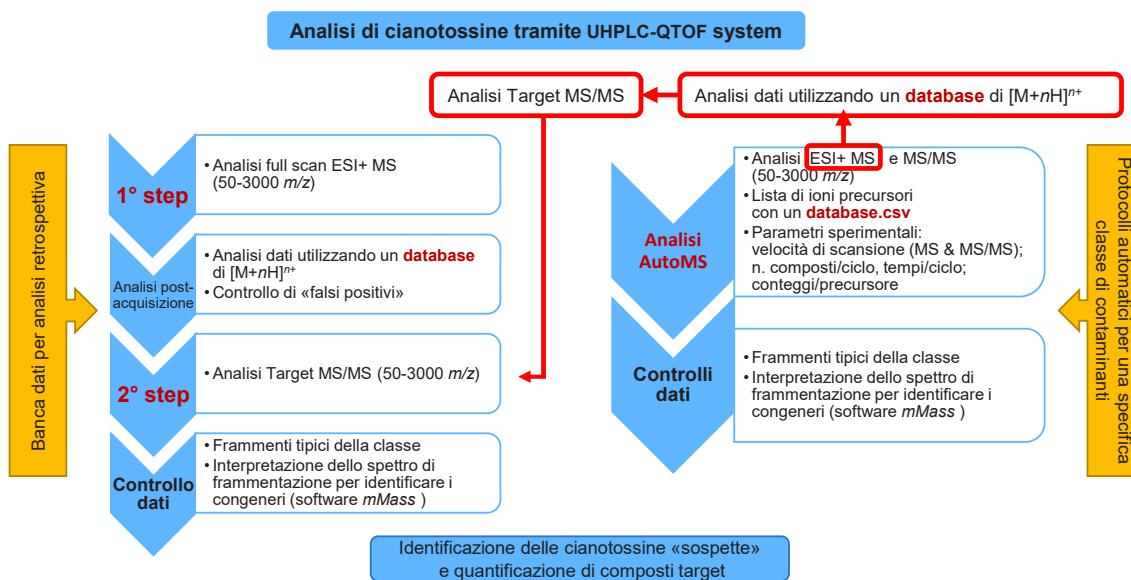


Figura 3. Esempio di due diverse metodologie di *suspect screening* per le analisi di cianotossine nelle acque

Per questioni legate alle performance strumentali, il primo protocollo è più indicato quando si voglia utilizzare il file acquisito come banca dati generale per analisi retrospettive, al quale eventualmente applicare diverse librerie nell'analisi dati. Il secondo protocollo rende più agevole un'analisi specificatamente rivolta a identificare quella particolare classe di contaminanti, avendo subito una conferma della loro plausibile presenza.

Analisi di microinquinanti organici nelle acque reflue

In questo caso sono stati applicati entrambi gli approcci: dalle informazioni specifiche sulle industrie conferenti all'impianto di depurazione, dalle liste di composti con potenziale impatto ecotossicologico avverso, come le SVHC (*Substance of Very High Concern*) oggetto di restrizioni europee, o lista di controllo (*Watch List*) contenuta nella Decisione 2015/495/EC, e da altri dati in ingresso, è stata costruita una lista per *suspect screening* di circa 380 composti, appartenenti a diverse classi, ad es. pesticidi, farmaci, *personal care products*, composti descritti come interferenti endocrini. La lista è stata utilizzata come libreria per l'analisi automatica in LC-HRMS, in maniera simile a quanto descritto nel protocollo automatico schematizzato in Figura 3. Contemporaneamente delle acquisizioni strumentali alternative sono state processate con approccio *non-target* tramite software commerciale, facendo emergere molti altri composti non inclusi nella lista di screening. I risultati ottenuti sono stati utili per descrivere i possibili scenari di contaminazione che possono essere catalogati in tre diverse categorie, associabili principalmente a:

- 1) una produzione industriale specifica;
- 2) uso civile intensivo o professionale;
- 3) uso civile diffuso.

Conclusioni

I recenti progressi tecnologici in termini di chimica analitica strumentale, in particolare relativa alle tecniche di spettrometria di massa ad alta risoluzione, hanno permesso di ridefinire le strategie di monitoraggio di composti chimici organici.

È possibile affiancare alle tradizionali analisi per il monitoraggio dei parametri target, oggetto di ordinario controllo, alcuni protocolli analitici che operino come screening di secondo livello su base strutturale, allo scopo di far emergere la presenza di microinquinanti di interesse sanitario nelle acque. I metodi sono versatili e possono essere adattati alle esigenze e conoscenze dei Gestori idropotabili. Certamente è necessaria una profonda conoscenza della materia ed estrema cautela nella supervisione dei dati per evitare di avere un sovraccarico di informazioni inaccurate e fuorvianti. Infine, bisogna ricordare che in assenza di standard certificati i risultati positivi non corrispondono a dati quantitativi, ed è dunque indispensabile saperne interpretare la significatività, sulla base del rischio relativo ad un loro possibile potenziale tossicologico. Nonostante le difficoltà associate, queste metodologie sono un potente mezzo in grado di affiancare egregiamente l'approccio preventivo del *Water Safety Plans*.

Bibliografia

Bogialli S, Bortolini C, Di Gangi IM, Nigro Di Gregorio F, Lucentini L, Favaro G, Pastore P. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometric methods for the surveillance monitoring of cyanotoxins in freshwaters. *Talanta* 2017;170:322-30.

Europa. Direttiva del 6 ottobre 2015, n. 2015/1787/CE recante modifica degli allegati II e III della direttiva 98/83/CE del Consiglio concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 260, 7 ottobre 2015.

Schymanski EL, Singer HP, Slobodnik J *et al.* Non-target screening with high-resolution mass spectrometry: critical review using a collaborative trial on water analysis. *Anal Bioanal Chem* 2015;407:6237-55.