

## DETERMINAZIONE DELLA MONILIFORMINA MEDIANTE CROMATOGRAFIA CON IONI LA<sup>3+</sup> IN FASE MOBILE

Terenzio Bertuzzi, Silvia Rastelli, Annalisa Mulazzi, Amedeo Pietri  
Dipartimento di Scienze Animali, della Nutrizione e degli Alimenti, Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza, Italia

### Introduzione

La Moniliformina (MON) è una *Fusarium* tossina, spesso presente nei cereali; è principalmente prodotta da *F. avenaceum*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. tricinctum* e *F. verticilloides*.

MON è una molecola a basso peso molecolare e altamente polare; inoltre, a causa del suo basso pKa (< 1,7), è presente in acqua come sale di Na o di K. MON è risultata tossica su animali, causando degenerazione del miocardio, debolezza muscolare e patologie respiratorie; l'EFSA ha segnalato ematossicità e cardiotoxicità come principali effetti negativi sulla salute (1). La stessa Commissione ha raccomandato lo sviluppo di metodi analitici validati per la sua determinazione.

A causa della sua natura ionica, MON è debolmente trattenuta dalle più comuni fase stazionarie usate nella cromatografia in fase inversa; la sua determinazione può essere effettuata con la formazione di coppie ioniche o utilizzando fasi stazionarie specifiche per composti polari. Anche la cromatografia *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) è stata utilizzata, non ottenendo sempre risultati soddisfacenti.

In questo lavoro è stato valutato un nuovo approccio cromatografico, basato sull'interazione tra l'analita e un legante addizionato alla fase mobile. Oltre alla sua natura ionica, MON è un  $\alpha$ -di-chetone (1-idrossiciclobut-1-ene-3,4-dione; Figura 1a). I di-chetoni possono formare complessi con gli ioni dei lantanidi (Ln), come La<sup>3+</sup>, Tb<sup>3+</sup> o Eu<sup>3+</sup>; generalmente, tre di-chetoni si legano a uno ione metallico (Figura 1b). Si è quindi valutato se l'aggiunta di un sale di Lantanio nella fase mobile potesse migliorare la separazione cromatografica e la successiva determinazione mediante rivelazione UV e spettrometria di massa.

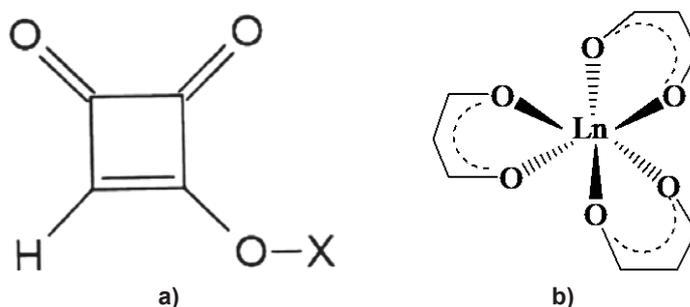


Figura 1: a) struttura della moniliformina;  
b) complesso [Ln-( $\beta$ -di-chetone)<sub>3</sub>] (Ln: ione lantanide)

## Materiali e metodi

### Analisi HPLC-UV per la determinazione della moniliformina

La MON è stata estratta da 10 g di cereali con 40 mL di una miscela acetonitrile:acqua 50+50 v/v usando un agitatore rotante per 60 min. Dopo diluizione su filtro di carta, 2 mL di estratto sono stati purificati su una colonna LC-NH<sub>2</sub> (500 mg, 3 mL, Supelco, Bellefonte, PA 16823, USA), precedentemente condizionata con 2 mL di una soluzione acetonitrile:acqua 50+50 v/v. La colonna è stata lavata con CH<sub>3</sub>CN (2 mL), acqua deionizzata (2 mL) e 1 mL di soluzione LaCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O 12,5 mM; quindi, la MON è stata eluita in provetta graduata con altri 2 mL di soluzione LaCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O 12,5 mM. L'estratto purificato è stato diluito (1+1) con acetonitrile e iniettato in HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) con rivelatore UV impostato a 219 e 260 nm. La MON è stata separata usando una colonna Supelcosil LC-NH<sub>2</sub> (250 x 3 mm, 5 µm, Supelco) e come fase mobile un gradiente di eluizione acetonitrile – soluzione acquosa LaCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O 2,5 mM (o TbCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O). Il gradiente utilizzato partiva da un 15% di LaCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O 2,5 mM, salendo al 35% in 3 minuti e rimanendovi per altri 5 minuti. Il flusso è stato impostato a 0,7 mL/min e la colonna termostata a 25°C.

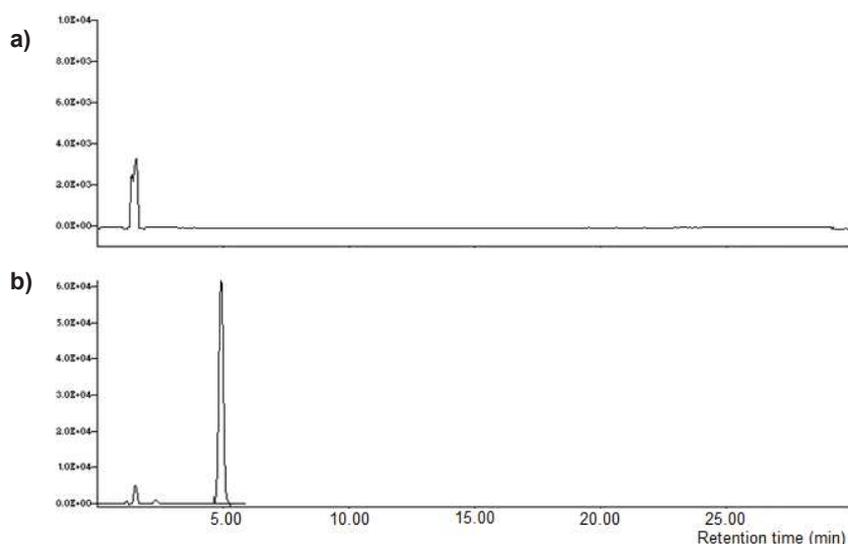
### Analisi LC-MS/MS per la determinazione della moniliformina

Dopo estrazione e filtrazione come riportato per l'analisi HPLC-UV, l'estratto è stato diluito (1+1) con metanolo-acqua 85+15 v/v e iniettato in LC-MS/MS (*Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry*). La MON è stata separata usando una colonna Supelcosil LC-NH<sub>2</sub> (75 x 3 mm, 3 µm, Supelco, Bellefonte, PA 16823, USA) e come fase mobile un gradiente di eluizione metanolo – soluzione acquosa 25 mM ammonio acetato contenente LaCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,25 mM. Il gradiente utilizzato partiva da un 15% di LaCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O 2,5 mM, salendo al 35% in 3 minuti e rimanendovi per 1 minuto. Il flusso è stato impostato a 0,3 mL min<sup>-1</sup>. La ionizzazione è stata eseguita con interfaccia ESI in modalità negativa con i seguenti parametri: *spray capillary voltage* 3,5 kV, *sheath e auxiliary voltage* 40 e 15 psi; *skimmer* 9 V, temperatura del capillare 350°C. La determinazione è stata effettuata in modalità SRM (*Selected Reaction Monitoring*). Per la frammentazione dell'ione 97 m/z, la pressione di collisione dell'Argon è stata impostata a 1,2 mTorr e l'energia di collisione a 21 V. Lo ione di frammentazione rilevato e quantificato è stato il 41 m/z.

## Risultati

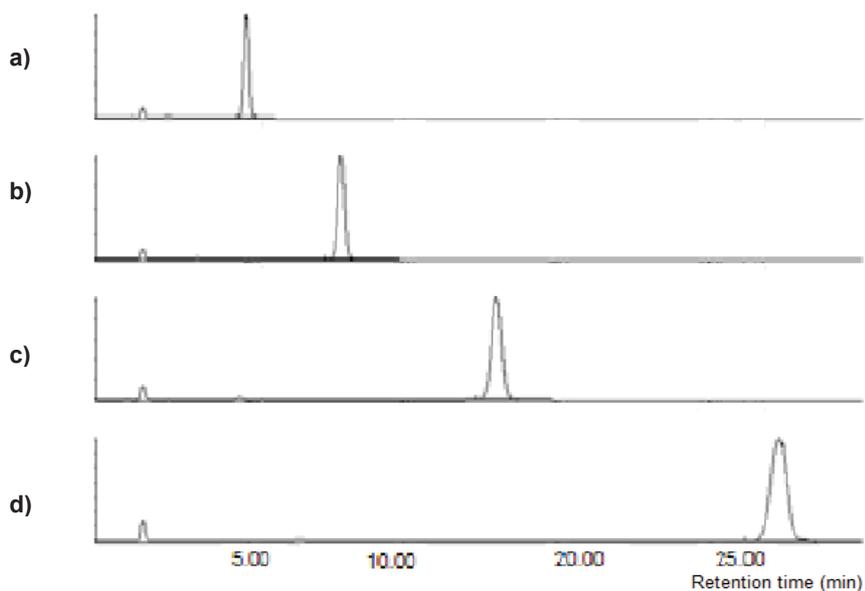
È noto che la MON, composto ad alta polarità, è poco trattenuta in cromatografia in fase inversa; recentemente sono state usate per la sua determinazione specifiche colonne per composti polari. In questo lavoro, sono state inizialmente testate le seguenti colonne, utilizzando un sistema HPLC con rivelazione UV: una colonna RP-8 (Lichrospher, 5 µm particle size, 125x4 mm i.d., Merck, Darmstadt, Germany), una X-Select HSS T3 (RP-18 a bassa densità di legante, 2,5 µm particle size, 100 x 2,1 mm i.d., Waters Corporation, Milford, MA, USA), una XBridge BEH Amide (2,5 µm particle size, 100 x 2,1 mm i.d., Waters Corporation, Milford, MA, USA) e una Supelcosil LC-NH<sub>2</sub> (250 x 3 mm, 5 µm, Supelco, Bellefonte, PA 16823, USA); come fase mobile è stata usata una miscela acetonitrile:acqua 20+80 v/v a flusso 1,0 mL/min<sup>-1</sup>. Iniettando una soluzione standard di MON (a 1000 µg L<sup>-1</sup>), la micotossina è stata debolmente trattenuta dalle colonne RP-8, X-Select HSS T3 e BEH Amide (tempo di ritenzione inferiore a 2,0 min); invece, MON è risultata fortemente trattenuta dalla colonna LC-NH<sub>2</sub> (nessun picco fino a 30 min).

Successivamente, la fase mobile è stata sostituita con acetonitrile:  $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10 mM 20+80 v/v; se nessuna differenza rilevante del tempo di ritenzione è stata osservata per le colonne RP-8, X-Select HSS T3 e BEH Amide, MON è stata eluita dalla colonna LC-NH<sub>2</sub> a 4,9 min (Figura 2).



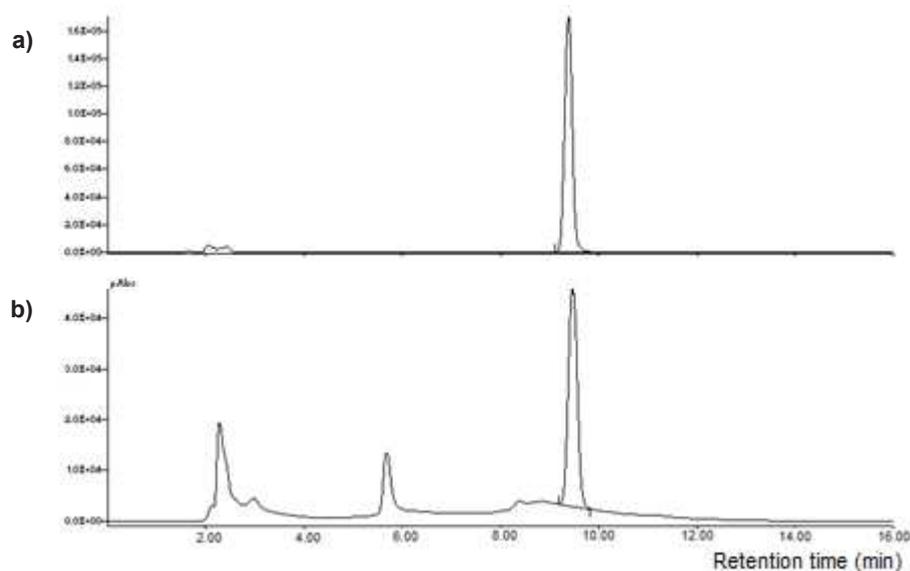
**Figura 2. Separazione cromatografica di una soluzione standard di MON ( $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) con colonna LC-NH<sub>2</sub> usando acqua (a) o una soluzione acquosa di  $\text{La}^{3+}$  10 mM (b) nella fase mobile.**

Iniettando cinque soluzioni standard a diversa concentrazione (20, 100, 250, 500 e  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) è stata ottenuta una soddisfacente curva di calibrazione ( $R^2=0,998$ ). Successivamente, aumentando la concentrazione di  $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  nella fase mobile da 1 a 50 mM, è stato osservato una diminuzione del tempo di ritenzione (Figura 3).



**Figura 3. Cromatogrammi di soluzioni standard di MON usando concentrazioni 10, 5, 2,5 e 1 mM di  $\text{La}^{3+}$  - acetonitrile 8+2 v/v come fase mobile (a, b, c, d)**

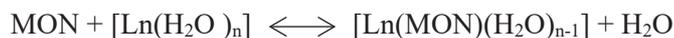
Infine, è stata ottenuta una soddisfacente separazione cromatografica applicando un gradiente lineare acetonitrile: LaCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O 2,5 mM come fase mobile (Figura 4).



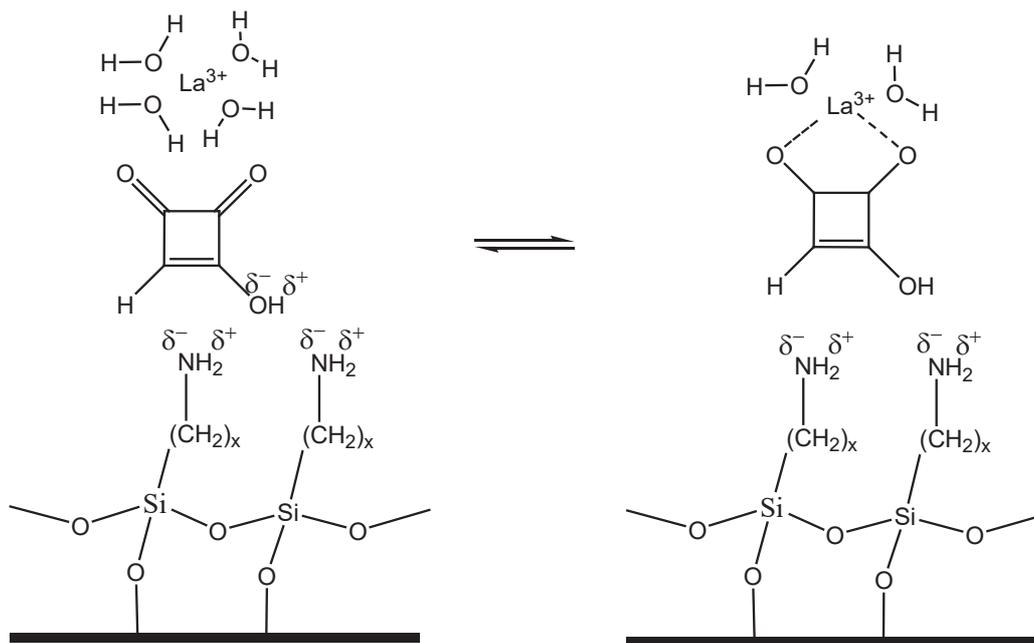
**Figura 4. Cromatogramma di: a) soluzione standard di MON (1000 µg L<sup>-1</sup>); b) estratto di mais fortificato con MON (250 µg L<sup>-1</sup>). La separazione cromatografica è stata effettuata usando un gradiente lineare acetonitrile: soluzione acquosa di LaCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O 2,5 mM; rilevazione a 260 nm (UV)**

Risultati simili sono stati ottenuti aggiungendo alla miscela eluente TbCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O o EuCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O. I cromatogrammi hanno indicato una coordinazione della MON con gli ioni dei lantanidi durante la separazione, risultando in una maggiore affinità della micotossina per la fase mobile e una conseguente più veloce eluizione dalla colonna. Inoltre, aumentando la concentrazione degli ioni dei lantanidi, è favorita una maggiore affinità per la fase mobile e conseguentemente tempi di ritenzione più corti.

Questo processo di separazione può essere spiegato considerando la teoria della cromatografia a scambio di legante (*Ligand Exchange Chromatography, LEC*), un processo cromatografico nel quale i composti di coordinazione formati sono separati attraverso la formazione e la rottura continua di deboli legami di coordinazione con lo ione metallico, attraverso una partizione tra fase mobile e fase stazionaria (2). Basandosi su questa teoria, la coordinazione dello ione lantanide con le molecole di acqua nella fase mobile può essere parzialmente sostituita con la coordinazione alla MON, portando alla formazione di complessi misti di coordinazione (Figura 5). Tali composti sono cineticamente deboli, la loro continua formazione e dissociazione è veloce e può essere descritta dalla seguente reazione di equilibrio:

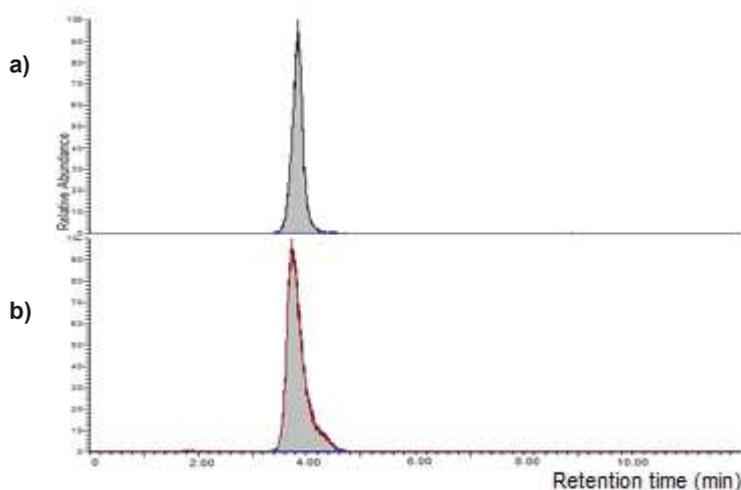


Questo processo potrebbe spiegare la maggiore affinità della MON per la fase mobile e la più veloce eluizione, quando viene aumentata la concentrazione dello ione lantanide. In assenza di tali ioni, la MON è fortemente trattenuta dalla fase stazionaria della colonna LC-NH<sub>2</sub>.



**Figura 5. Possibile struttura del complesso di coordinazione durante la separazione cromatografica della MON in presenza di  $\text{La}^{3+}$  nella fase mobile**

Infine, l'analisi cromatografica è stata effettuata mediante LC-MS/MS (triplo quadrupolo) per ottenere una migliore accuratezza della presenza di MON e valori di rilevabilità più bassi; in questo caso è stata usata una concentrazione di  $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  molto bassa (1,25 mM) per evitare problematiche durante la ionizzazione. La MON è stata separata usando una colonna LC- $\text{NH}_2$  75 x 3 mm, 3  $\mu\text{m}$  (Supelco, Bellefonte, PA 16823, USA) e rilevata a circa 4,4 min, portando il limite di rilevabilità (LOD) a 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  riferito al campione iniziale (Figura 6).



**Figura 6. Cromatogramma di: a) soluzione standard di MON (100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ); b) campione di mais naturalmente contaminato (1637  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). La separazione cromatografica è stata effettuata usando un gradiente lineare metanolo-  $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,25 mM in ammonio acetato 25 mM; rilevazione mediante MS/MS (MRM transizione  $m/z$  97  $\rightarrow$  41)**

## Sviluppo di un metodo di estrazione e purificazione per la determinazione di MON in cereali

Normalmente, MON è estratta usando una miscela acetonitrile-acqua 84:16 (come per i tricoteceni); considerando l'alta polarità della MON, Barthel *et al.* (3) e Herrera *et al.* (4) hanno aumentato la percentuale di acqua nella miscela estraente, usando una miscela acetonitrile-acqua 50+50 v/v o acqua deionizzata al 100%, ottenendo maggiori rese di estrazione. Avendo ottenuto degli estratti non limpidi con acqua al 100%, probabilmente per la presenza di composti polari ad alto peso molecolare, è stata preferita la miscela acetonitrile-acqua 50+50 v/v.

Per quanto riguarda il passaggio di purificazione, diversi autori hanno usato o colonne SAX o MycoSep® MON 240 (5-6); tuttavia, Herrera *et al.* non hanno ottenuto percentuali di recupero soddisfacenti usando queste colonne e conseguentemente ha sviluppato un metodo senza passaggio di purificazione. In questo lavoro, abbiamo precedentemente testato colonne MycoSep® MON 240 (Romer Labs, Getzersdorf, Austria), MAX, WAX e HLB OASIS (Waters Corporation, Milford, MA, USA) e la tecnica QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*); in tutti i test, sono state ottenute purificazioni insoddisfacenti o bassi recuperi. Inoltre abbiamo confermato che l'evaporazione sotto azoto diminuisce il recupero, come riportato da Herrera *et al.*

Infine, è stata utilizzata una colonna di purificazione LC-NH<sub>2</sub> (Supelco, Bellefonte, PA 16823, USA), allo scopo di trattenere la MON e eluirla usando una soluzione di ioni lantanio, come sviluppato per la separazione HPLC.

Questa fase di purificazione è stata introdotta solo per l'analisi mediante HPLC-UV; per quella LC-MS/MS, la presenza di un'alta concentrazione di La<sup>3+</sup> nell'estratto purificato ha creato problematiche nella rivelazione strumentale.

## Conclusioni

È stato sviluppato un semplice e efficiente metodo cromatografico per la determinazione della MON; la semplice aggiunta di ioni lantanidi alla fase mobile ha permesso una facile determinazione della MON usando sia la rivelazione UV che quella spettrometrica di massa. Con questo metodo si possono facilmente ottenere dati sulla contaminazione da MON in mangimi e alimenti con soddisfacente accuratezza. Infine, questa tecnica cromatografica può essere applicata anche per la rivelazione di altre micotossine e anche per lo sviluppo di separazioni chirali.

## Bibliografia

1. EFSA Panel Contam. Risks to human and animal health related to the presence of moniliformin in food and feed. *EFSA Journal* 2018;16(3):1-95.
2. Davankov VA, Navratil JD, Walton HF. *Ligand Exchange Chromatography*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1988.
3. Barthel J, Rapp M, Holtmannspötter H, Gottschalk C. 2018. A rapid LC-MS/MS method for the determination of moniliformin and occurrence of this mycotoxin in maize products from the Bavarian market. *Mycotoxin Research*, 2018; 349(13):9-12.
4. Herrera M, van Dam R, Spanjer M, de Stoppelaar J, Mol H, de Nijs M, López P. 2017. Survey of moniliformin in wheat- and corn-based products using a straightforward analytical method. *Mycotoxin Research* 2017;33:333-41.

5. Lim CW, Lai KY, Yeo JF, Tai SH, Chan SH. Quantitative assessment of moniliformin in cereals via alternative precipitation pathways, aided by LC-LIT-MS and LC-Q-TOF-MS. *Food Chem* 2015;174:372-9.
6. Scarpino V, Blandino M, Negre M, Reyneri A, Vanara F. Moniliformin analysis in maize samples from North-West Italy using multifunctional clean-up columns and the LC-MS/MS detection method. *Food Addit Contam.* 2013;30(5):876-84.