

ANALISI MULTIRESIDUO DI MICOTOSSINE IN CEREALI PER LA PRIMA COLAZIONE E *BABY FOOD* CON TECNICA HPLC/FLUORIMETRO E HPLC/MS/MS

Maria Ferrari, Barbara Romagnoli, Cecilia Bergamini

Riferimento Analitico Regionale (RAR) Alimenti, OGM e Biosicurezza, Agenzia Regionale Protezione Ambiente dell'Emilia Romagna, Sezione Provinciale di Bologna, Bologna

Introduzione

La normativa europea prevede limiti per diverse classi di micotossine nei cereali destinati all'alimentazione umana; al momento sono fissati i livelli massimi per Aflatossine (AF), Ocratossina A (OTA), Deossinivalenolo (DON) e Zearalenone (ZEA), mentre si stanno valutando i limiti per le Tossine T2 e HT-2 (1). Al fine di realizzare un'attività di controllo efficace ed efficiente, che consenta di monitorare tutte le micotossine normate, in un elevato numero di campioni, ottimizzando i tempi e i costi di analisi, è necessario sviluppare metodi multiresiduo che permettano di estrarre e quantificare più micotossine contemporaneamente.

In questo lavoro sono state testate due tipologie di colonnine di immunoaffinità (IAC): una per la determinazione simultanea di AFLA e OTA (AlfaOchra HPLCTM Vicam), seguita da analisi in HPLC/Fluorimetro (*High Performance Liquid Chromatography*) e un'altra per DON, ZEA, T2, HT-2 (DZT R-Biopharm-Rhône LTD), seguita da quantificazione in LC-MS/MS (*Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*). I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli dei metodi precedentemente validati, e correntemente in uso dal laboratorio, sulle IAC singole di AFLA, OTA, DON e ZEA. Nell'ambito di questa sperimentazione per la prima volta sono state ricercate le tossine T2 e HT-2. Sono stati ottenuti buoni livelli di recupero, sia in campioni di cereali per la prima colazione, sia in *baby food*, a due livelli di contaminazione, prossimi ai limiti di legge. I limiti di rivelazione sono inferiori alle concentrazioni massime ammesse nei *baby food*: AFLA 0,05 µg/kg, OTA 0,08 µg/kg, DON 60 µg/kg, ZEA, T2 e HT-2 10 µg/kg. Le prestazioni ottenute soddisfano i criteri di rendimento stabiliti dal Reg. CE 401/2006 (2).

Le colonnine multi-micotossine sono state utilizzate per l'analisi di alcuni prodotti commerciali destinati al controllo ufficiale e campionati dagli organi competenti.

Materiali e metodi

Materiali

Le soluzioni degli standard di AF (Aflatoxin Mix, AFB₁ e AFG₁ 1 µg/mL, AFB₂ e AFG₂ 0,3 µg/mL, in metanolo), OTA (50 µg/mL, in benzene/acido acetico 99/1), DON (200 µg/mL, in etilacetato/metanolo 95/5) e ZEA (50 µg/mL, in acetonitrile) sono fornite da Supelco. Gli standard di T2 e HT-2 sono forniti da R-Biopharm Rhône LTD in forma cristallina, sono stati ricostituiti in acetonitrile, come indicato sul certificato di accompagnamento, ad una concentrazione di 100 µg/mL e conservati a -20°C.

L'acqua ultrapura è prodotta con un impianto Milli-Q (Micropore Corporation, Billerica, MA, USA). Tutti i reagenti sono forniti da Carlo Erba Reagenti (Milano, Italia): l'acetonitrile e il metanolo sono di grado HPLC, il fosfato bibasico di sodio, il fosfato monobasico di potassio e il cloruro di sodio, utilizzati per la preparazione del tampone fosfato (*Phosphate Buffered Saline*, PBS), così come acetato di ammonio, il bromuro di potassio, l'acido acetico glaciale, l'acido nitrico sono di grado tecnico.

Le colonnine di immunoaffinità AlfaOchra HPLCTM sono fornite da Vicam, le colonnine DZT sono della ditta R-Biopharm-Rhône LTD. I filtri di carta sono di Carlo Erba Reagenti, quelli in fibra di vetro sono di Munktell, Bärenstein, Germany.

Preparazione del campione AflaOchra

50 g di campione finemente macinato, a cui sono aggiunti 5 g di sodio cloruro, sono estratti con 100 mL di metanolo/H₂O (80/20 v/v) agitando per 30 minuti. Dopo filtrazione su carta 10 mL di estratto sono diluiti con 40 mL di H₂O (per i *baby food* 20 mL di filtrato sono diluiti con 50 mL di H₂O) e nuovamente filtrati su fibra di vetro. 25 mL (50 mL per i *baby food*) della soluzione così ottenuta sono caricati sulla colonnina di immunoaffinità (AlfaOchra HPLCTM Vicam) (3). La colonnina è lavata con 10 mL di H₂O e portata a secco facendo fluire aria; le tossine sono eluite con 2 mL di metanolo in un matraccio tarato da 5 mL, si porta a volume con H₂O. Nel caso dei *baby food* l'estratto ottenuto viene portato a secco sotto vuoto con evaporatore rotante con bagnomaria a 35°C. Il residuo è disciolto in 1 mL di metanolo/H₂O (2/3 v/v). Il campione finale è iniettato in HPLC/fluorimetro.

Analisi HPLC/Fluorimetro

Per la determinazione di AF e OTA è stato utilizzato un cromatografo liquido ad alta prestazione Perkin Elmer Serie 200. Vengono effettuate 2 corse cromatografiche distinte. In entrambi i casi si utilizza una colonna Discovery C18 (25 cm x 4.6 mm, 5 µm), con pre-colonna C18, Supelco (Milano, Italia). Colonna e pre-colonna sono termostate a 25°C:

- per AF
Fase mobile: H₂O/acetonitrile/metanolo (6/2/3 v/v/v), ad ogni litro di fase mobile si aggiungono 350 µL di HNO₃ 4,0 mol/L e 120 mg di potassio bromuro. Flusso: 0,9 mL/min. Lunghezza d'onda di eccitazione: 360 nm; lunghezza d'onda di emissione: 435 nm. Volume di iniezione: 200 µL. Tempo di analisi 15 min. Cella elettrochimica Kobra per derivatizzazione post-colonna (4).
- per OTA
Fase mobile: acetonitrile/H₂O/acido acetico (51/47/2 v/v/v). Flusso: 1,0 mL/min. Lunghezza d'onda di eccitazione 333 nm, lunghezza d'onda di emissione 443 nm. Volume di iniezione 200 µL. Tempo di analisi 12 min (5).

Preparazione del campione DZT

25 g di campione finemente macinato sono estratti con 100 mL di metanolo/acqua (75/25 v/v); dopo 30 minuti di agitazione l'estratto viene passato su filtro di carta. Per i campioni di cereali 2 mL di filtrato sono diluiti con 48 mL di PBS, per i *baby food* 5 mL di filtrato sono diluiti con 120 mL di PBS. L'estratto diluito è filtrato su fibra di vetro e passato su colonnina di immunoaffinità (DZT R-Biopharm-Rhône LTD) (25 mL per i cereali, 100 mL per i *baby food*)

alla velocità di 1-2 gocce al secondo (6). La colonnina è lavata con 10 mL di H₂O. Le tossine sono eluite con 2 mL di metanolo e la colonnina asciugata facendo fluire aria. Il campione viene portato a secco sotto vuoto con evaporatore rotante con bagnomaria a 35°C. Il residuo è disciolto in 1 mL di metanolo/H₂O 20/80 (v/v) + 5mM acetato di ammonio e analizzato in LC-MS/MS.

Analisi in LC-MS/MS

Lo strumento utilizzato per l'identificazione e la quantificazione di DON, ZEA, T2 e HT-2 è un HPLC Alliance® 2695 combinato con uno spettrometro di massa Tandem Quattro Micro™ API (Waters, Milliford, MA, USA). Lo spettrometro opera in modalità MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), con ionizzazione *elettrospray* (ESI) in modalità "alternata" negativa-positiva-negativa.

I parametri di massa sono stati ottimizzati mediante infusione diretta, a un flusso di 10 µL/min, di 4 soluzioni contenenti le singole tossine a una concentrazione di 2 µg/mL; per ZEA, T2 e HT-2 la soluzione di infusione è stata preparata in metanolo, per DON in metanolo/acqua (20/80 v/v) + 5mM di ammonio acetato. In Tabella 1 sono indicati i parametri di *tuning* dello ione precursore e dei frammenti selezionati per i quattro composti. I parametri operativi ottimali sono: voltaggio del capillare, 4,0 kV, temperatura della sorgente ESI, 120°C, temperatura di desolvatazione, 400°C, flusso del gas di desolvatazione, 300 L/h (azoto prodotto dal generatore High Purity Nitrogen Generator, Peak Scientific, Scozia).

Per la separazione cromatografica è stata utilizzata una colonna Discovery C18 (25 cm x 2,1 mm, 5 µm), termostata a 25°C. L'eluizione è condotta in gradiente, come indicato in Tabella 2. Il flusso della fase mobile è 0,3 mL/min e il tempo di analisi di 30 minuti.

Per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati si è utilizzato il software MassLynx 4.0 (Waters, Milliford, MA, USA).

Tabella 1. Parametri di *tuning* degli ioni precursori e dei frammenti selezionati

Analita	Tr (min)	Ion mode	Voltaggio Cono (V)	Transizione di quantificazione	Energia di collisione (eV)	Transizione di conferma	Dwell (s)
DON	11,30	ESI -	15,0	355>295	11,0	355>265	0,2
ZEA	17,50	ESI -	40,0	317>160	30,0	317>132	0,2
T2	18,15	ESI +	20,0	484>305	15,0	484>215	0,2
HT-2	19,00	ESI +	15,0	442>263	15,0	442>215	0,2

Tabella 2. Gradiente di eluizione

Tempo (min)	Eluente A % (H ₂ O + 10 mM NH ₄ Ac)	Eluente B % (metanolo)
0,0	90,0	10,0
12,0	10,0	90,0
18,0	10,0	90,0
20,0	90,0	10,0
30,0	90,0	10,0

Risultati e discussione

Determinazione simultanea di AFB₁ e OTA

Le rette di taratura per le AF sono state ottenute partendo da una soluzione di lavoro contenente le quattro Aflatossine in metanolo, preparata per diluizione dello standard Supelco, alle concentrazioni di 0,1 µg/mL per AFB₁ e AFG₁ e di 0,03 µg/mL per AFB₂ e AFG₂. Sono stati analizzati 5 livelli di concentrazione negli intervalli 0,4 – 4,0 ng/mL per AFB₁ e AFG₁ e 0,1 – 1,2 ng/mL per AFB₂ e AFG₂. Il coefficiente di correlazione è sempre maggiore di 0,99. Tenendo conto dei passaggi di diluizione del metodo di preparazione del campione, il limite di rivelazione è 0,05 µg/kg per i *baby food* e 0,5 µg/kg per i cereali.

La retta di taratura per OTA è stata ottenuta partendo da una soluzione di lavoro in metanolo, preparata per diluizione dello standard Supelco, alla concentrazione di 1,0 µg/mL. Sono stati analizzati 6 livelli di concentrazione nell'intervallo 0,5-20 ng/mL. Il coefficiente di correlazione è sempre maggiore di 0,99. Tenendo conto dei passaggi di diluizione del metodo di preparazione del campione, il limite di rivelazione è 0,08 µg/kg per i *baby food* e 0,8 µg/kg per i cereali.

Le prestazioni delle colonnine AlfaOchra HPLCTM Vicam sono state valutate con 6 prove ripetute, a due livelli di contaminazione, prossimi ai limiti di legge (1) per i cereali e i *baby food*. Un campione bianco di cereali per la prima colazione e uno di farina per l'alimentazione destinata alla prima infanzia, sono stati contaminati mediante aggiunta di standard ai livelli indicati in Tabella 3.

Tabella 3. Recuperi % delle IAC AlfaOchra HPLCTM Vicam, confrontati con quelli delle IAC singole

Analita	Livello di Contaminazione (µg/kg)		R% IAC AflaOchra	R% IAC Singole
AFB ₁	cereali	2,0	90	94 ⁽¹⁾
	<i>baby food</i>	0,6	78	
AFB ₂	cereali	2,0	97	98 ⁽¹⁾
	<i>baby food</i>	0,6	90	
AFG ₁	cereali	2,0	95	91 ⁽¹⁾
	<i>baby food</i>	0,6	70	
AFG ₂	cereali	2,0	100	100 ⁽¹⁾
	<i>baby food</i>	0,6	80	
OTA	cereali	4,0	90	97 ⁽²⁾
	<i>baby food</i>	0,5	92	

⁽¹⁾Easy Extract Aflatoxin R-Biopharm-Rhône LTD, ⁽²⁾Ochraprep R-Biopharm-Rhône LTD

I recuperi delle colonnine di immunoaffinità (IAC) AlfaOchra HPLCTM Vicam sono stati confrontati con i recuperi medi, ottenuti dai controlli di qualità interni effettuati con IAC singole (Easy Extract Aflatoxin e Ochraprep R-Biopharm-Rhône LTD) durante gli ultimi 3 anni di lavoro. Per entrambi i livelli di contaminazione le prestazioni delle IAC multi-micotossine e delle IAC singole sono confrontabili e soddisfano i criteri di rendimento stabiliti dal Reg. CE 401/2006 (2).

Determinazione simultanea di DON, ZEA e tossine T2 e HT2 (DZT)

Quattro rette di taratura sono state ottenute partendo da una soluzione standard di lavoro in metanolo/acqua (1/4 v/v) + 5mM di ammonio acetato contenente le quattro micotossine in miscela, alle seguenti concentrazioni: DON 12 µg/mL, ZEA 1,5 µg/mL, T2 e HT-2 2 µg/mL.

Sono stati analizzati 4 livelli di concentrazione negli intervalli: DON 60-480 ng/mL, ZEA 7,5-60 ng/mL, T2 e HT-2 10-80 ng/mL. Il coefficiente di correlazione è sempre maggiore di 0,99. Il limite di rivelazione è di 60 µg/kg per DON e 10 µg/kg per ZEA, T2 e HT-2, sia per i *baby food*, sia per i cereali.

Le prestazioni delle IAC DZT R-Biopharm-Rhône LTD sono state valutate con 6 prove ripetute, a due livelli di contaminazione, prossimi ai limiti di legge (1) per i cereali (adulti) e i *baby food*. Un campione bianco di cereali per la prima colazione e uno di farina per l'alimentazione destinata alla prima infanzia, sono stati contaminati mediante aggiunta della soluzione standard di lavoro, utilizzata per la retta di taratura, ai livelli indicati in Tabella 4. I cromatogrammi delle transizioni per i campioni contaminati ai due livelli *baby* e adulti sono riportati nelle Figure 1 e 2.

Tabella 4. Recupero % delle colonnine DZT, confrontati con quelli delle IAC singole.

Analita	Livello di Contaminazione (µg/kg)		R% AC DZT	R% IAC Singole
DON	cereali	480	75	98 ⁽¹⁾
	<i>baby food</i>	190	60	
ZEA	cereali	60	70	108 ⁽¹⁾
	<i>baby food</i>	20	70	
T2	cereali	80	90	Non testato
	<i>baby food</i>	30	95	
HT-2	cereali	80	90	Non testato
	<i>baby food</i>	30	95	

⁽¹⁾ Donprep R-Biopharm-Rhône LTD, ⁽²⁾ Easy Extract Zearalenone R-Biopharm-Rhône LTD

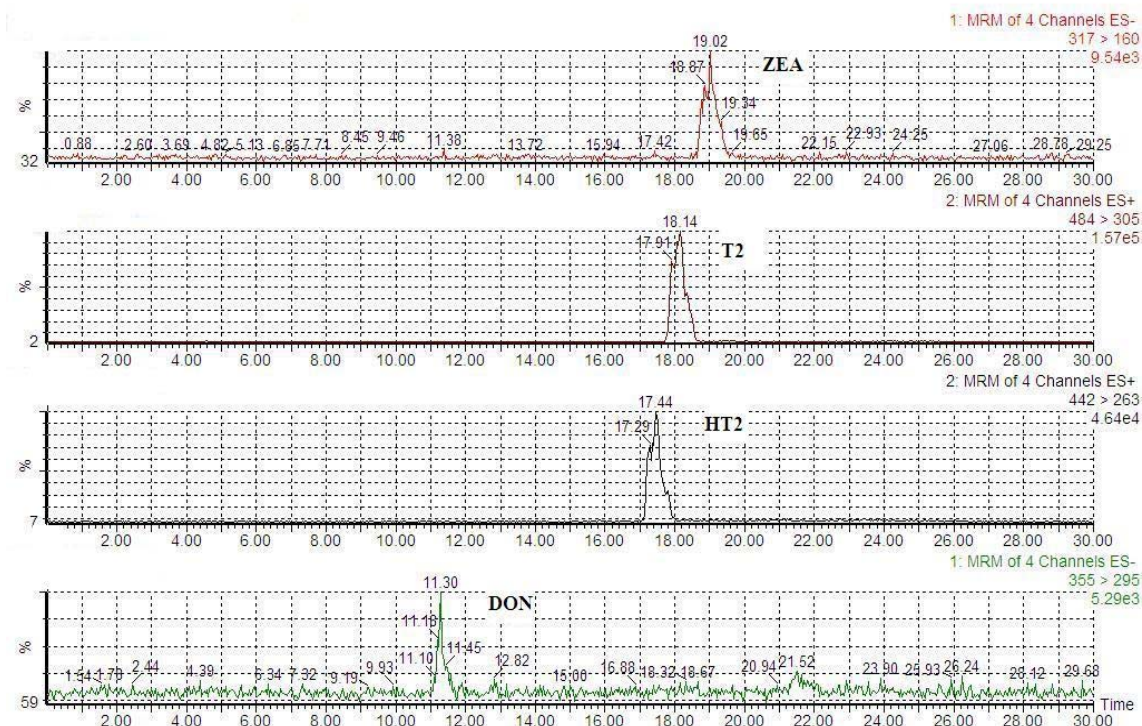


Figura 1. Cromatogrammi delle transizioni di quantificazione per DON, ZEA, T2 e HT-2 in un campione di *baby food* contaminato a livelli prossimi ai limiti di legge

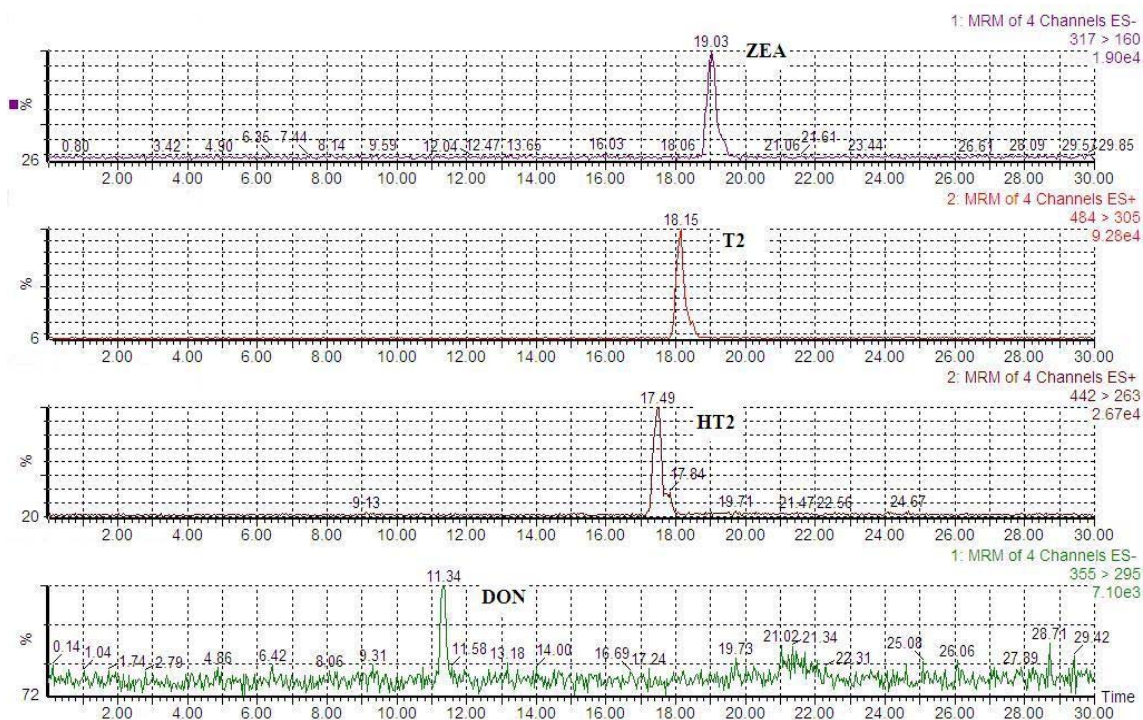


Figura 2. Cromatogrammi delle transizioni di quantificazione per DON, ZEA, T2 e HT-2 in un campione di cereali contaminato a livelli prossimi ai limiti di legge

I recuperi delle IAC multimicotossine DZT sono stati confrontati con i recuperi medi, ottenuti dai controlli di qualità interni effettuati con le IAC singole (Donprep e Easy Extract Zearalenone, R-Biopharm-Rhône LTD) durante gli ultimi 3 anni di lavoro. Per entrambi i livelli di contaminazione le prestazioni delle IAC multi-micotossine sono inferiori a quelle delle IAC singole, pur rientrando nei criteri di rendimento stabiliti dal Reg. CE 401/2006 (2). Il valore di recupero più critico è quello del DON al livello di contaminazione del limite di legge dei *baby food*.

Controllo di campioni commerciali

Il metodo è stato utilizzato per l'analisi di 37 campioni (11 cereali per la prima colazione e 16 *baby food*) prelevati nel 2009, nell'ambito del piano regionale per il controllo delle micotossine della Regione Emilia Romagna. I risultati sono riportati in Tabella 5.

Nessuno dei campioni presenta livelli di contaminazione superiori ai limiti di legge. AFLA e OTA risultano sempre inferiori al limite di rivelazione. La metà dei campioni di cereali per la prima colazione è contaminata da DON; la presenza di ZEA è stata trovata in 3 campioni. Le Tossine T2 e HT-2 sono state rilevate in 4 campioni, 2 di cereali e 2 di baby food.

Tabella 5. Monitoraggio dei 37 campioni commerciali di cereali e baby food analizzati nel 2009

Micotossina	Cereali 1° colazione		Baby food	
	µg/kg	n. campioni	µg/kg	n. campioni
AFB ₁	< 0,5	11	< 0,05	16
	0,5-2,0	/	0,05-0,10	–
OTA	< 0,8	11	< 0,08	16
	0,5-3,0	/	0,08-0,50	–
DON	< 60	5	< 60	16
	60-500	6	60-200	–
ZEA	< 10	8	< 10	16
	10-50	3	10-20	–
T2	< 10	11	< 10	15
	> 10	/	> 10	1
HT-2	< 10	9	< 10	15
	> 10	2	> 10	1

Conclusioni

In questo lavoro sono stati messi a punto due metodi: il primo per la determinazione simultanea di AFLA e OTA, con quantificazione mediante HPLC/Fluorimetro, il secondo per DON, ZEA, T2 e HT-2, con analisi in LC-MS/MS. I metodi sono entrambi accurati, selettivi e sensibili. I bassi limiti di rivelazione ne consentono l'applicazione per il controllo ufficiale di cereali e alimenti destinati alla prima infanzia (*baby food*). I recuperi ottenuti, tutti compresi tra 60 e 100%, soddisfano i criteri di rendimento indicati dal Reg. CE 401/2006.

I due metodi presentano alcuni vantaggi in termini di riduzione dei tempi e dei costi di analisi: con due sole colonnine di immunofinità è possibile controllare sullo stesso campione 9 micotossine. Inoltre il metodo per DON, ZEA, T2 e HT-2 necessita di una sola corsa cromatografica e fa uso di un'unica soluzione di lavoro, contenente le 4 tossine in miscela, sia per la preparazione della retta di taratura, sia per la contaminazione dei campioni.

Bibliografia

1. Unione Europea. Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *GUCE* L364, 20 dicembre 2006, aggiornato il 23 luglio 2008.
2. Unione Europea. Regolamento (CE) n. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *GUCE* L70, 9 marzo 2006.
3. AlfaOchra HPLCTM Instruction Manual # GN-MC9521-1, VICAM Science Technology, 03.08.1999.
4. AOAC Official method 999.07. *Aflatoxin B1 and total Aflatoxins in peanuts butter, pistacchio paste, fig paste, and paprika powder*. AOAC International; 2000.
5. AOAC Official method 2000.03. *Ochratoxin A in barley*. AOAC International; 2002.
6. R-Biopharm-Rhône LTD Application note for DZT Multi Myco IACs for LCMS determination. Ref. N°: A1-P73.V2. Aug 2007