DETERMINAZIONE DI ZEARALENONE E SUOI METABOLITI IN URINE BOVINE

Carlo Brera, Emanuela Gregori, Augusto Alberto Pastorelli, Maurizio Fiori, Paolo Stacchini, Barbara De Santis, Francesca Debegnach
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Lo zearalenone (ZEA), un lattone dell'acido resorcilico, è una micotossina prodotta dai funghi del genere *Fusarium*. È presente principalmente nei cereali, come mais, grano, orzo, e la sua presenza negli alimenti e nei mangimi rappresenta un potenziale rischio per la sicurezza alimentare e per il benessere animale.

Dagli studi *in vivo*, sia negli animali sia nell'uomo, sembra che il metabolismo dello ZEA sia influenzato da diversi fattori quali la specie animale, il sesso e l'età (1-6). È stato dimostrato, inoltre, che i metaboliti principali sono alfa-zearalenolo (α-ZEA), il beta-zearalenolo (ß-ZEA), l'alfa-zearalanolo (ZER), il beta-zearalanolo (TAL) (conosciuti rispettivamente come zeranolo e taleranolo) e infine lo zearalanone (ZAN). Lo ZEA e i suoi metaboliti esibiscono un'attività estrogenica e anabolizzante (ZER) in alcune specie animali e sono stati indicati come possibili cause di modificazioni puberali precoci (telarca) nei bambini (7-9). Si rende pertanto necessaria la disponibilità di metodiche analitiche atte a valutare il profilo metabolico completo di tale micotossina anche per poter discriminare tra presenza legata a contaminazione della filiera zootecnica e uso illegale di promotori di crescita.

In questo studio è stato sviluppato e validato un metodo in cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (*Liquid Chromatography – Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry*: LC-MS/MS) per la determinazione simultanea dello ZEA e dei suoi metaboliti in urine bovine. La validazione è stata condotta, utilizzando il software InterVal Plus, con l'approccio statistico alternativo proposto dalla Decisione 2002/657/CE (10) ed è stata effettuata in conformità a quanto stabilito dalla normativa comunitaria.

Materiali e metodi

Materiali e apparecchiature

I materiali di riferimento certificati per tutti gli analiti sono stati comprati dalla Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germania), gli standard interni deuterati, ZER-D4 e TAL-D4, dal laboratorio comunitario di Riferimento (*European Union Reference Laboratory*, EU-RL) Rikilt (Wageningen, Paesi Bassi). I reagenti e i solventi, quali acetato di ammonio, l'enzima glucoronidasi-arilsulfatasi, il metanolo e l'acetonitrile sono stati forniti da Merck (Darmstadt, Germania) e da Carlo Erba (Milano, Italia). Le colonnine di immunoaffinità utilizzate sono state le EASI-EXTRACT® ZEARALENONE della R-Biopharm Rhône LTD (Scozia, Regno Unito).

I campioni di urina sono stati forniti da un allevatore locale.

Soluzioni dei materiali di riferimento

Per ognuno degli analiti e per gli standard interni sono stati pesati circa 2,00 (± 0,01) mg in matraccio tarato e portati a volume con metanolo ottenendo una concentrazione finale di circa 0,2 mg/mL. Da questa sono state preparate le altre soluzioni di lavoro sempre in metanolo. Tutte le soluzioni preparate sono state conservate a -20°C.

Retta di taratura in matrice

Le rette di taratura sono state costruite partendo da 5 mL di un pool di urine bianche fortificato con gli analiti a diverse concentrazioni (0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0 ng/mL); per la costruzione della retta è stato incluso anche lo zero.

L'apparecchiatura utilizzata è stata un sistema LC-MS/MS: HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) Perkin Elmer Series 200, accoppiato con un triplo quadrupolo Applied Biosystems API 3000 con sorgente APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) Heated Nebulizer. Le condizioni operative dello spettrometro di massa sono riassunte in Tabella 1 mentre le condizioni cromatografiche sono state: gradiente lineare con fase mobile acetato di ammonio 0,1 mol/L, acetonitrile; velocità di flusso 0,2 mL/min, colonna Betasil C18 (Thermo electron (250x2,1 mm, 5µm) a temperatura di 40°C.

Tabella 1. Condizioni operative dello spettrometro di massa per il metodo utilizzato

Analiti	Ione precursore (m/z) $[M - H]^-$	Ione prodotto (m/z)	Ce (eV)	Dp (V)
ZEA	317,0	131 175	-41	-35
α-ZEA	319,0	174 205	-33	-35
ß- ZEA	319,0	174 205	-33	-35
ZAN	319,0	205 275	-35	-3
TAL	321,0	277 303	-35	-60
ZER	321,0	277 303	-35	-60
ZER-D4	325,0	281	-33	-35
TAL-D4	325,0	281	-33	-35

Metodo

I campioni di urina (5,0 mL) sono stati addizionati con 50 µL della soluzione degli standard interni e poi filtrati (0,45 µm). In seguito sono stati diluiti con 5 mL di tampone acetato 1 mol/L a pH=5,2 e addizionati con 60 µL dell'enzima ß-glucuronidasi/arilsulfatasi e poi incubati per la deconiugazione. Dopo incubazione, i campioni riportati a temperatura ambiente sono stati purificati mediante colonnine di immunoaffinità. Dopo il caricamento del campione, le colonnine sono state lavate con 5 mL di acqua per due volte, e in seguito gli analiti sono stati eluiti con 3 mL di metanolo. L'eluato è evaporato sotto flusso di azoto e ripreso con 100 µL di metanolo (utilizzando vial ad alto recupero) prima di essere iniettato nel sistema LC-MS/MS.

In Figura 1 sono riportati a titolo di esempio i cromatogrammi di un campione di urina bovina non contaminato (bianco) e di uno addizionato.

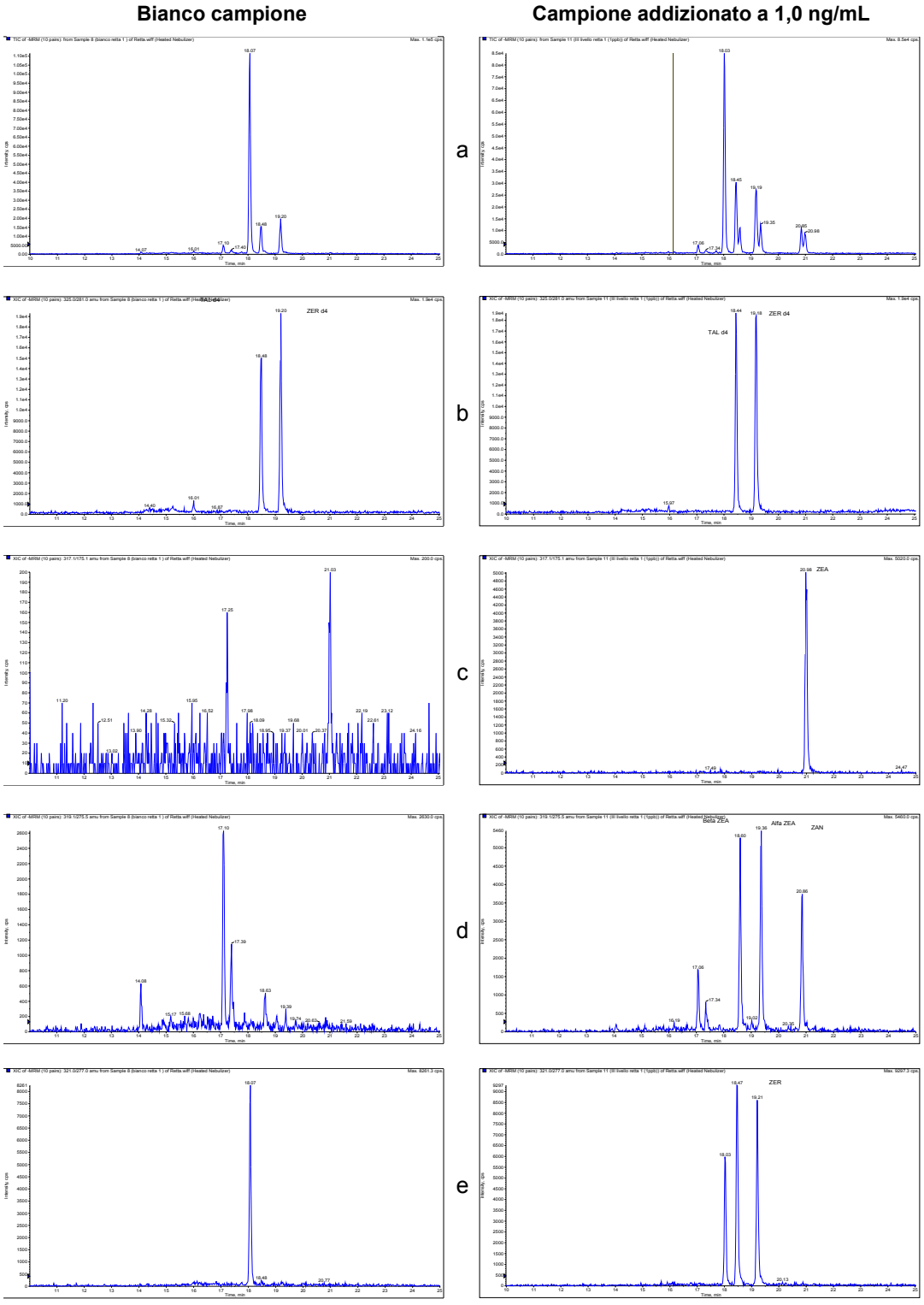

Figura 1. Cromatogrammi LC-MS/MS di un campione di urine non contaminato (bianco) e di un campione addizionato: a) TIC; b) MRM standard interni deuterati; c) MRM di ZEA; d) MRM di α-ZEA, ß-ZEA e ZAN; e) MRM di ZER e TAL

Validazione

La validazione è stata effettuata in accordo alla Decisione 2002/657/CE utilizzando l'approccio *in-house* alternativo mediante il software InterVal Plus (quo data Gmbh, Dresda, Germania). Il software permette lo sviluppo di un disegno sperimentale, che applicato consente di determinare contemporaneamente tutte le performances del metodo per una validazione completa, includendo anche la robustezza e la riproducibilità intra-laboratorio. L'applicazione del disegno sperimentale individuato dal software permette, inoltre, di valutare possibili effetti matrice, effetti delle condizioni analitiche e di campionamento.

Nel nostro studio, data la semplicità del metodo, sono stati selezionati quattro differenti "fattori di validazione", ognuno dei quali variabile su due livelli, nello specifico: l'operatore, le condizioni della deconiugazione in termostato, l'attesa prima dell'analisi cromatografica e la marca dei solventi. Nella Tabella 2 viene riportato il disegno sperimentale per le prove utili per l'intera validazione, per un totale di otto esperimenti che sono stati eseguiti tutti in otto giorni lavorativi.

Tabella 2. Disegno sperimentale ottenuto dal software per il metodo utilizzato

Corsa	Giorno	Operatore	Condizioni deconiugazione	Giorni prima dell'analisi cromatografica	Marca solventi
07	1	PT01	tutta la notte a 37°C	2	1
03	1	PT02	tutta la notte a 37°C	2	-1
05	2	PT01	4 ore at50°C	2	-1
08	2	PT01	tutta la notte a 37°C	0	1
06	3	PT01	4 ore a 50°C	0	-1
04	3	PT02	tutta la notte a 37°C	0	-1
01	4	PT02	4 ore a 50°C	2	1
02	4	PT02	4 ore a 50°C	0	1

Risultati

Sviluppo del metodo

La semplicità e la tempistica della preparazione del campione insieme all'uso di standard interni deuterati per un'analisi quantitativa altamente ripetibile rappresentano alcuni dei vantaggi rispetto ai metodi già presenti in bibliografia (11-14).

Identificazione

Il metodo presentato rispetta i criteri che devono essere soddisfatti per l'identificazione delle sostanze vietate (gruppo A tabella 1 del D.L.vo 158/2006) (15), secondo la Decisione 2002/657/CE: i 4 punti di identificazione, sono soddisfatti con l'identificazione di 1 ione precursore e 2 ioni prodotto; i rapporti tra gli ioni in termini di abbondanza percentuale rispettano i limiti di tolleranza previsti.

Quantificazione

L'analisi quantitativa è stata effettuata impiegando le rette di taratura in matrice (pool di urine) costruite riportando i rapporti delle aree misurate dello ione prodotto selezionato e dello

standard interno in funzione delle loro rispettive concentrazioni, usando il modello di regressione lineare dei minimi quadrati. Le altre rette preparate dalle singole urine sono considerate come campioni di concentrazione sconosciuta e così quantificati.

Tutte le rette ottenute negli esperimenti mostrano dei coefficienti di correlazione più che soddisfacenti per tutti gli analiti ($R2 \geq 0,995$).

Validazione

La validazione condotta con l'aiuto del software InterVal Plus comporta un numero di esperimenti minore di quello utile per una validazione classica secondo la Decisione 2002/657/CE con conseguente risparmio di ore/uomo e materiali. L'intera validazione è stata finalizzata in due settimane di lavoro.

In Tabella 3 sono riassunti i risultati della validazione. I valori di CCα e di CCβ sono in linea con le richieste dell' EU-RL competente "Recommended concentration" di 2,0 ng/mL. I recuperi, espressi come esattezza, variano dal 99 al 115 % per tutti gli analiti a tutti i livelli e anche la selettività/specificità è buona visto che non si sono registrati interferenti nell'analisi cromatografica.

I dati di ripetibilità intra-laboratorio sono compresi tra il 5 e il 15% per tutti gli analiti al limite di decisione CCα.

La riproducibilità intra-laboratorio è minore del 20% per la maggioranza degli analiti, mentre si registrano valori più alti (~ 25 %) per zearalanone, alfa-zearalenolo e beta-zearalenolo alle concentrazioni minori del CCα.

Tabella 3. Risultati della validazione del metodo utilizzato (intervallo curva di taratura 0,500-5,000 ng/mL)

Analita	CCα	CCβ	Recupero [%] al CCα	RSD [%] al CCα
ZEA	0,66	0,78	100,5	9,0
α-ZEA	0,85	1,17	101,5	15,1
β-ZEA	0,73	0,99	102,8	15,3
ZAN	1,29	1,83	105,0	15,3
ZER	0,71	0,86	99,8	10,0
TAL	0,69	0,82	100,1	9,7

Conclusioni

Il metodo proposto è di facile esecuzione e la sua validazione ha dato risultati più che soddisfacenti rispondendo pienamente ai requisiti stabiliti dalla Decisione 2002/657/CE e alle raccomandazioni dello EU-RL competente.

Dopo alcuni studi apparsi in letteratura (1-6,16), che hanno correlato la presenza di zeranolo in animali alimentati con mangime contaminato da ZEA, lo EU-RL ha deciso di estendere i controlli ufficiali riguardanti la Categoria A4 All. 1 D.L.vo 158/2006 allo zearalenone e a tutti i possibili metaboliti proprio per cercare di discriminare un trattamento illecito da una contaminazione delle filiera zootecnica da parte del fungo micotossigeno.

L'interpretazione dei risultati, comunque, appare difficoltosa e soggetta all'interpretazione personale dell'operatore in quanto non esistono ancora linee guida ufficiali adottate nel controllo ufficiale, sia in Europa sia in Italia, per la conformità di quei campioni che mostrano la copresenza di zeranolo e ZEA con i suoi metaboliti. In passato un progetto europeo "Natural

zeranol" ha cercato di stabilire un criterio quantitativo per distinguere la contaminazione da *Fusarium* spp. dall'uso non autorizzato di zeranolo e allo scopo ha formulato un modello matematico (16) applicabile, però, solamente alla matrice urina bovina, escludendo di conseguenza la sua applicabilità alle altre razze. La problematica resta quindi ancora aperta e risulta quindi auspicabile che l'Autorità Competente, i laboratori regionali e il Laboratorio Nazionale di Riferimento sui residui negli alimenti di origine animale individuino un criterio attendibile per valutare la conformità in modo tale da fornire alle strutture laboratoristiche operanti sul territorio uno strumento di intervento armonizzato.

Bibliografia

1. Kleinova M, Zöllner P, Kahlbacher H, Hochsteiner W, Lindner W. Metabolic profiles of the mycotoxin zearalenone and of the growth promoter zeranol in urine, liver, and muscle of heifers. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2002;50(17):4769-76.
2. Kennedy DG, Hewitt SA, McEvoy JD, Currie JW, Cannavan A, Blanchflower WJ, Elliot CT. Zeranol is formed from Fusarium spp. toxins in cattle in vivo. *Food Additives and Contaminates* 1998;15(4):393-400.
3. Erasmuson AF, Scahill BG, West DM. Natural zeranol (α-zearalanol) in the urine of pasture-fed animals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1994; 42:2721-5.
4. Zöllner P, Jodlbauer J, Kleinova M, Kahlbacher H, Kuhn T, Hochsteiner W, Lindner W. Concentration levels of zearalenone and its metabolites in urine, muscle tissue, and liver samples of pigs fed with mycotoxin-contaminated oats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50(9):2494-501.
5. Miles Co, Erasmuson AF, Wilkins Ai, Towers NR, Smith BL, Garthwaite I, Scahill BG, Hansen RP. Ovine metabolism of zearalenone to α-zearalanol (zeranol). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996;44:3244-50.
6. Migdalof BH, Dugger HA, Heider JG, Coombs RA, Terry MK. Disposition and metabolismin the female rat, rabbit, dog, monkey, and man. *Xenobiotica* 1983;13:209-21.
7. Zinedine A, Soriano JM, Moltò JC, Manes J. Review on the toxicity, occurence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chemistry and Toxicology* 2007;45(1):1-18.
8. Minervini F, Dell'aquila ME. Zearalenone and reproductive function in farm animals. *International Journal of Molecular Science* 2008;9(12):2570-84.
9. Bandera EV, Chandran U, Buckley B, Lin Y, Isukapalli S, Marshall I, King M, Zarbl H. Urinary mycoestrogens, body size and breast development in New Jersey girls. *The Science of Total Environment* 2011;409(24):5221-7.
10. Italia. Decreto Legislativo 16 marzo 2006, n. 158. Attuazione della direttiva 2003/74/CE, concernente il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze beta-agoniste nelle produzioni animali. *Gazzetta Ufficiale* n. 98 del 28 aprile 2006.
11. Wang S, Wang XH. Analytical methods for the determination of zeranol residues in animal products: a review. *Food Additives and Contaminates* 2007;24(6):573-82.
12. Schmidt K, Stachel C, Gowik P. Development and in-house validation of an LC-MS/MS method for the determination of stilbenes and resorcylic acid lactones in bovine urine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2008;391(4):1199-210.

13. Blokland MH, Sterk SS, Stephany RW, Launay FM, Kennedy DG, van Ginkel LA Determination of resorcylic acid lactones in biological samples by GC-MS. Discrimination between illegal use and contamination with fusarium toxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2006;384(5):1221-7.

14. Dusi G, Bozzoni E, Assini W, Tognoli N, Gasparini M, Ferretti E. Confirmatory method for the determination of resorcylic acid lactones in urine sample using immunoaffinity cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Chimica Acta* 2009;637(1-2):47-54.

15. Europa. Decisione n. 2002/657/CE della Commissione che attua la direttiva n. 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati. (Testo rilevante ai fini del SEE). *Gazzetta ufficiale delle Comunità Europee* L 221/8 17 agosto 2002

16. Launay FM, Ribeiro L, Alves P, Vozikis V, Tsitsamis S, Alfredsson G, Sterk SS, Blokland M, Iitia A, Lövgren T, Tuomola M, Gordon A, Kennedy DG. Prevalence of zeranol, taleranol and Fusarium spp. toxins in urine: implications for the control of zeranol abuse in the European Union. *Food Additives and Contaminates* 2004;21(9):833-9.