



Istituto Superiore di Sanità

Metodo per la Determinazione di Aflatossina B1 in mais e mangimi

INDICE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE	3
2. AVVERTENZE E PRECAUZIONI	3
3. RIFERIMENTI NORMATIVI E BIBLIOGRAFICI	3
4. PRINCIPIO DEL METODO	4
5. REAGENTI E MATERIALE DI RIFERIMENTO	4
6. APPARECCHIATURE E MATERIALI	5
7. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	6
8. PROCEDURA	6
9. PROCEDURA DI SPIKING	7
10. ANALISI HPLC	7
11. CALCOLI	9
12. CRITERI DI APPROVAZIONE/SCARTO DEI RISULTATI	10
13. ESPRESSIONE DEL RISULTATO	11
14. INCERTEZZA	11
15. APPENDICE 1. CROMATOGRAMMI	13

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente procedura specifica il metodo per la determinazione della aflatoossina B₁ (AFB₁) contenuta in campioni di mais e mangimi. Il metodo prevede la purificazione con colonnine di immunoaffinità e l'analisi strumentale con cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) e rivelazione spettrofluorimetrica. Questo metodo è stato sottoposto alla validazione con uno studio interlaboratorio su campioni di mais, e alla validazione interna su campioni di mangimi.

Il metodo è stato validato nell'intervallo di concentrazione compreso fra 0,06 e 17,57 µg/kg per il mais e tra 0,51 e 21,07 µg/kg per i mangimi.

2. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- 2.1.** Questo metodo richiede l'uso di soluzioni standard di riferimento di aflatoossina B₁. La aflatoossina B₁ è genotossica ed è attualmente classificata dallo IARC nel gruppo 1, devono pertanto essere indossati guanti di protezione e tutte le fasi di preparazione di materiali di riferimento e campioni devono essere condotte sotto cappa.
- 2.2.** La aflatoossina B₁ è soggetta a degradazione per effetto della luce solare diretta. Pertanto, è necessario proteggere adeguatamente il piano analitico di lavoro dalla luce del giorno e mantenere le soluzioni di riferimento di aflatoossina B₁ protette dalla luce usando fiale ambrate o comunque avvolte in foglio di alluminio.
- 2.3.** L'uso di vetreria nuova non trattata con acidi (fiale, provette, ecc.) nella preparazione delle soluzioni di lavoro del materiale di riferimento certificato di aflatoossina B₁ o durante l'analisi dei campioni può causare una perdita della micotossina. Pertanto, Prima dell'uso la vetreria nuova dovrà essere immersa in acido diluito (acido solforico, 2 mol/L) per 5/6 ore e risciacquata con acqua distillata per rimuovere tutte le tracce di acido (controllare usando un indicatore di pH). Ad ogni modo è fortemente raccomandato l'uso di vetreria silanizzata, per la quale non è necessario effettuare il pretrattamento con acido.

3. RIFERIMENTI NORMATIVI E BIBLIOGRAFICI

- 3.1.** Regolamento (CE) N. 1881/2006 della Commissione che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 364/5.
- 3.2.** Regolamento (CE) N. 401/2006 della Commissione relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 70/12.
- 3.3.** Stroka J., von Holst C., Anklam E. "Immunoaffinity column clean-up with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxin B₁ in cattle feed: collaborative study". Journal of AOAC International, vol. 86(6), 2003.
- 3.4.** ISO 3696:1987: Acqua di qualità analitica - Specifiche e metodi di prova.
- 3.5.** Castegnaro M., Barek J., Fremy J.M., Lafontaine M., Miraglia M., Sansone E.B., Telling G.M. "Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory wastes: some mycotoxins". IARC Scientific Publication No. 113, International Agency for Research on Cancer, Lyon (France), 1991.

4. PRINCIPIO DEL METODO

La aflatoossina B₁ viene estratta dalla matrice omogeneizzando il campione con una soluzione idroalcolica; si effettua poi una diluizione dell'estratto mediante aggiunta di una soluzione tampone a base di sali di fosfato (PBS). La purificazione viene effettuata mediante passaggio su colonnina di immunoaffinità (IAC) contenente anticorpi specifici per la AFB₁; la micotossina viene quindi eluita con metanolo e quantificata tramite HPLC a fase inversa con rivelazione spettrofluorimetrica preceduta da derivatizzazione post-colonna.

5. REAGENTI E MATERIALE DI RIFERIMENTO

Durante l'analisi, a meno che non sia diversamente specificato, usare solo reagenti di grado analitico riconosciuto e solo acqua distillata o acqua di grado 1 come definito in EN ISO 3696. I solventi dovrebbero essere di purezza per analisi HPLC. Possono essere usate soluzioni commerciali di proprietà equivalenti a quelle menzionate.

5.1. Acqua deionizzata

5.2. Acetonitrile per HPLC

5.3. Metanolo per HPLC

5.4. Metanolo per analisi

5.5. Cloruro di potassio (KCl)

5.6. Cloruro di sodio (NaCl)

5.7. Disodio idrogeno fosfato biidrato (Na₂HPO₄·2H₂O)

5.8. Acido cloridrico (0,1 mol/L)

5.9. Idrossido di sodio (0,1 mol/L)

5.10. Tampone fosfato concentrato – PBS (Phosphate Buffered Saline) concentrato

Sciogliere in 1800 mL di acqua 4,0 g di KCl (5.5), 160,0 g di NaCl (6.6), 36,0 g di disodio idrogeno fosfato biidrato (Na₂HPO₄·2H₂O) (5.7). Portare il pH della soluzione a 7,4 con acido cloridrico 0,1 mol/L (5.8) o con idrossido di sodio 0,1 mol/L (5.9) secondo necessità. Il volume finale della soluzione deve essere portato a 2 litri con acqua.

5.11. Tampone fosfato diluito - PBS (Phosphate Buffered Saline) diluito

Prelevare 100 mL di PBS concentrato (5.10) e portare a un litro con acqua.

5.12. Fase mobile per analisi HPLC

Miscelare acqua (5.1):metanolo (5.3):acetonitrile (5.2) nelle proporzioni: 54:29:17 v/v/v.

5.13. Solvente di estrazione

Miscelare metanolo (5.4):acqua (5.1) nelle proporzioni 80:20 v/v.

5.14. Soluzione derivatizzante

Soluzione acquosa di PBPB 0,05 g/L (pyridinium hydrobromide perbromide-CAS N° 39416-48-3).

5.15. Solvente di iniezione

Miscelare metanolo (5.3):acqua (5.1) nelle proporzioni 40:60 v/v.

5.16. Materiale di riferimento certificato di AFB₁ in soluzione

Utilizzare il materiale di riferimento certificato in soluzione commercialmente disponibile. La soluzione deve avere una concentrazione di circa 2 µg/mL di tossina.

5.17. Soluzione di lavoro del materiale di riferimento certificato di AFB₁

Preparare una soluzione che abbia una concentrazione finale di circa 100 ng/mL pipettando 250 μ L della soluzione 5.16 e portando a volume in un matraccio da 5 mL con il solvente di iniezione 5.15.

5.18. Materiale di riferimento certificato di controllo di AFB₁

Da un materiale di riferimento certificato indipendente da quello indicato in 5.16, preparare una soluzione che abbia una concentrazione di circa 100 ng/mL, con le stesse modalità indicate nel paragrafo 5.17.

6. APPARECCHIATURE E MATERIALI

Attrezzature correnti di laboratorio e, in particolare, le seguenti:

6.1. Bilancia analitica accurata sui 0,01 mg

6.2. Bilancia tecnica accurata sui 0,1 g

6.3. Omogeneizzatore (tipo Ultra Turrax e/o Blender con capacità di almeno 1 L, dotati di coperchio, funzionanti ad alta velocità).

6.4. Vortex per l'agitazione e la miscelazione delle soluzioni nelle vials.

6.5. Macinino

6.6. Filtro di carta

6.7. Filtro microfibra di vetro

6.8. Pipette, micropipette e puntali per prelevare volumi: 10 mL, 5 mL, 1 mL e 200 μ L

6.9. Sistema HPLC, composto da:

6.9.1 Sistema di iniezione (valvola di iniezione, loop da almeno 150 μ L)

6.9.2 Pompa HPLC, capace di mantenere una velocità di flusso pari 1 mL/min

6.9.3. Fornetto riscaldante per colonna, capace di mantenere una temperatura costante (e.g. 40°C \pm 1°C)

6.9.4. Colonna cromatografica, C18, 4.6 mm x 250 mm - 5 μ m, o che fornisca analoghe prestazioni

6.9.5. Pompa per derivatizzazione post-colonna, capace di mantenere una velocità di flusso pari 0,4 mL/min

6.9.6. Rivelatore spettrofluorimetrico munito di cella a flusso e regolato a 365 nm - λ di eccitazione, e 435 nm - λ di emissione

6.9.7. Software di elaborazione dati

6.10. Colonnine di immunoaffinità

Le colonnine di immunoaffinità devono contenere anticorpi specifici per la aflatossina B1

6.11. Vacuum manifold per alloggiare le colonnine di immunoaffinità

6.12. Siringhe monouso (5 mL, 10 mL, 50 mL o simili) e raccordi per le colonnine di immunoaffinità

7. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Macinare il campione con un macinino (7.5) e miscelare bene, prima di prelevare il campione di analisi. Se il campione risultasse congelato e/o sottoforma di slurry, si deve procedere all'analisi solo dopo completo scongelamento.

8. PROCEDURA

L'esecuzione della prova prevede l'analisi in doppio del campione oggetto di revisione. Poichè il risultato dell'analisi deve essere accompagnato da un dato di esattezza è necessario lavorare, contestualmente al campione di revisione, un opportuno campione, ad esempio un bianco o un "naturalmente contaminato" e uno spike oppure un materiale di riferimento certificato. L'esecuzione della prova deve sempre prevedere l'analisi di un campione di controllo.

8.1 Estrazione

Pesare direttamente nell'omogeneizzatore (6.3) 50,0 g di campione (accuratezza $\pm 0,1$ g). Aggiungere 5,0 g di cloruro di sodio (5.6) e 250 mL di solvente di estrazione (5.13). Chiudere il coperchio dell'omogeneizzatore ed agitare ad alta velocità il campione per 3 minuti. Evitare di surriscaldare l'omogeneizzatore durante l'estrazione ad alta velocità.

Filtrare l'estratto su filtro di carta (6.6). Prelevare 20 mL di filtrato e diluirli con 20 mL di PBS (5.11) (fattore di diluizione $D = 2$). Miscelare adeguatamente. Filtrare nuovamente il campione su filtro a microfibra di vetro (6.7). Applicare il campione diluito alla colonnina di immunoaffinità (6.10) come descritto nella sezione successiva.

8.2 Purificazione: passaggio in colonnina di immunoaffinità (IAC)

Preparare la colonnina di immunoaffinità (6.10) secondo le istruzioni del fornitore. Collegare la colonnina di immunoaffinità al vacuum manifold (6.11), e attaccare la siringa (6.12) alla IAC.

Pipettare 20 mL di estratto diluito (equivalente a 2.0 grammi di campione) nella siringa trasferendoli in IAC ad una velocità di flusso di circa 3 mL/min, applicando un vuoto moderato o utilizzando sistemi equivalenti (il flusso comunque non deve eccedere i 5 mL/min).

Fare attenzione a non mandare a secco la IAC durante il passaggio del campione.

Lavare la IAC con 10 mL di acqua alla fine del passaggio del campione. Asciugare la colonnina passando almeno 2 volumi di aria.

8.3 Preparazione della soluzione test

Eluire, direttamente in matraccio da 5 mL, la aflatoxina B₁ seguendo una procedura in due fasi:

- applicare 1 mL di metanolo (5.3) alla IAC e lasciarlo fluire per gravità.
- aspettare 1 minuto ed applicare una seconda porzione di 1 mL di metanolo (5.3).

Raccogliere il solvente di eluizione residuo passando, con una siringa da 10 mL, attraverso la IAC un volume d'aria pari a due/tre volte il volume della stessa. Portare a volume, in un matraccio da 5 mL, aggiungendo acqua (5.1), miscelare adeguatamente al vortex (6.4) e conservare il campione a 4°C fino all'analisi in HPLC.

8.4 Derivatizzazione

La aflatoxina B₁ viene derivatizzata post-colonna in una camera di reazione mediante una soluzione acquosa di PBPB (5.14) (pyridinium hydrobromide perbromide) 0.05 g/L erogata da una pompa derivatizzante (6.9.5) ad un flusso di 0.4 mL/min.

9. PROCEDURA DI SPIKING

Pesare direttamente nell'omogeneizzatore (6.3) 50 g di campione (accuratezza $\pm 0,1$ g) non contaminato (bianco) di mais/mangime. Pipettare nel campione bianco appropriati volumi della soluzione di lavoro del materiale di riferimento di aflatoxina B₁ (5.17). Lasciare sotto cappa il campione fortificato per almeno 2 ore, procedere poi come indicato al punto 8.

Nel caso non fosse disponibile un campione bianco sarà possibile effettuare lo spike fortificando un campione naturalmente contaminato.

Il recupero viene calcolato come segue:

$$\text{Recupero}(\%) = \frac{C_t - C_s}{C_a} \cdot 100$$

dove:

C_t: concentrazione ottenuta dal campione fortificato, (μg/kg)

C_s: concentrazione ottenuta dal campione non fortificato (nel caso del campione bianco C_s=0), (μg/kg)

C_a: concentrazione di analita aggiunta, (μg/kg)

I valori di recupero percentuale devono essere il più possibile prossimi a 100 e comunque contenuti all'interno degli intervalli ritenuti accettabili secondo il Regolamento (CE) N. 401/2006.

10. ANALISI HPLC

10.1. Preparazione delle soluzioni di taratura

Preparare le soluzioni di taratura in matracci da 10 mL o 5 mL. Diluire le soluzioni di taratura fino al segno del menisco del matraccio con il solvente di iniezione (5.15). In tabella 1 sono riportati, a titolo di esempio, i volumi di soluzione di lavoro del materiale di riferimento certificato di aflatoxina B₁ (5.17) e di solvente di iniezione per la preparazione di soluzioni di taratura.

Tabella 1. Preparazione delle soluzioni di taratura

Soluzione di taratura n°	Solvente di iniezione (6.15) (μL)	Soluzione 6.17 (μL)	Concentrazione della soluzione (ng/mL)	Contaminazione corrispondente (μg/kg)
1	9998	2	0,02	0,05
2	9980	20	0,20	0,50
3	9960	40	0,40	1,00
4	9920	80	0,80	2,00
5	9800	200	2,00	5,00
6	9760	240	2,40	6,00

Le soluzioni di taratura così preparate, opportunamente conservate a +4 °C e protette dalla luce diretta, possono essere utilizzate per un massimo di sei mesi se i controlli previsti rispettano i criteri stabiliti.

10.2. Preparazione della soluzione del materiale di riferimento di controllo

La soluzione di materiale di riferimento di controllo viene preparata con una soluzione certificata indipendente dalle soluzioni di taratura. Preparare dalla soluzione ottenuta in 5.18 una soluzione che abbia una concentrazione finale di circa 0,80 ng/mL seguendo le indicazioni date nella tabella 1.

La soluzione del materiale di riferimento di controllo così preparata, opportunamente conservata a +4 °C e protetta dalla luce diretta, può essere utilizzata per un massimo di sei mesi se il controllo previsto rispetta i criteri stabiliti.

10.3. Curva di taratura

Predisporre una sequenza di iniezioni in HPLC mettendo in successione le soluzioni di taratura preparate secondo lo schema riportato in tabella 1. La curva di taratura sarà generata dai cromatogrammi risultanti dalle iniezioni in triplicato di ciascun livello.

La curva di taratura ottenuta è ritenuta valida se soddisfa il criterio di accettabilità delle curve di taratura: $r^2 > 0,9950$.

Per poter utilizzare una curva di taratura precedentemente preparata sarà necessario procedere alla verifica preliminare dei parametri (concentrazione attesa e tempo di ritenzione dell'analita) prima di ogni sessione di analisi. La verifica avviene iniettando in HPLC, in triplicato, una delle soluzioni di lavoro del materiale di riferimento ed una soluzione del materiale di riferimento di controllo. I criteri di accettabilità sono riportati di seguito:

- Criterio di accettabilità della soluzione di lavoro del materiale di riferimento di controllo: $\pm 10\%$ dell'area attesa.
- Criterio di accettabilità del livello di una delle soluzioni di lavoro del materiale di riferimento: $\pm 10\%$ dell'area attesa.
- Criterio di accettabilità per il tempo di ritenzione dell'analita rispetto ai tempi memorizzati nel metodo strumentale: $\pm 20\%$.

10.4. Condizioni operative per il sistema HPLC

La colonna deve rispettare le specifiche dettagliate in 6.9.4.

Il sistema HPLC deve essere settato secondo i seguenti parametri:

- Flusso: 1.0 mL/min
- Temperatura del forno: $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$
- Flusso della pompa derivatizzante: 0.4 mL/min
- Lunghezze d'onda del rivelatore spettrofluorimetrico: 365 nm - λ di eccitazione, e 435 nm - λ di emissione
- Volume di iniezione: 150 μL

10.5. Identificazione

Predisporre una sequenza di iniezioni seguendo lo schema:

- Iniezione soluzione di taratura (almeno 1 iniezione)
- Iniezione soluzioni test (inclusi i campioni lavorati per la verifica dell'esattezza ed il campione di controllo)
- Iniezione soluzione di taratura (almeno 1 iniezione)

Iniettare una soluzione di taratura almeno ogni 10 iniezioni di soluzioni test da analizzare.

Iniettare un uguale volume della soluzione test e della soluzione di taratura.

Identificare l'analita confrontando il tempo di ritenzione del picco rilevato nel cromatogramma della soluzione test con il tempo di ritenzione del picco del materiale di riferimento certificato di aflatoossina B₁.

10.6. Determinazione

Il sistema di gestione informatizzato associato all'HPLC utilizzato, costruisce una curva di regressione lineare che interpola i dati acquisiti, sulla base dei minimi quadrati, elaborando i dati provenienti dalle iniezioni delle soluzioni di taratura. L'equazione lineare sarà del tipo:

$$Area = a + b \cdot amount$$

dove:

Area = area del picco cromatografico

a = intercetta curva di calibrazione

b = pendenza curva di calibrazione

amount = quantità di analita nella soluzione analizzata, (ng)

E' necessario verificare che esista una buona correlazione tra i dati acquisiti nel campo di linearità indagato (coefficiente di determinazione (r^2) > di 0,9950).

11. CALCOLI

I nanogrammi di AFB₁ (m_{AFB1}) contenuti nell'aliquota test che risultano dalla soluzione iniettata sono ricavati direttamente dall'equazione lineare della curva di calibrazione riportata in 11.6:

$$Amount = \frac{Area - a}{b}$$

Il valore dei nanogrammi è fornito dal sistema nel "report" cromatografico relativo al campione test in esame.

Calcolare la frazione di massa di AFB₁, W_{AFB1} , in nanogrammi per grammo (ng/g) usando la seguente equazione:

$$W_{AFB1} = \frac{m_{AFB1}}{m_S} \cdot \frac{V_1}{V_2} \cdot \frac{V_3}{V_4} D$$

dove:

m_{AFB1} = massa della aflatoossina B₁ nell'aliquota di soluzione test iniettata in colonna, ng

m_S = massa del campione estratto, g (50.0 g)

V_1 = volume del solvente di estrazione, mL (250 mL)

V_2 = volume della aliquota di soluzione test passata in colonnina per la purificazione, mL (20 mL)

V_3 = volume totale della soluzione test, mL (5 mL)

V_4 = volume di iniezione della soluzione test, mL (0.150 mL)

D = fattore di diluizione, (2)

12. CRITERI DI APPROVAZIONE/SCARTO DEI RISULTATI

12.1. Precisione (ripetibilità)

La verifica della ripetibilità è ritenuta importante per valutare la competenza tecnica dei laboratori. Il RSA micotossine deve verificare che i valori della prova in doppio eseguita diano esito conforme, che rientrino cioè nei valori di ripetibilità del metodo.

Nel caso in cui il dato di concentrazione ottenuto per il campione di revisione risultasse significativamente diverso dai livelli di concentrazione per i quali sono disponibili i dati di precisione si farà comunque riferimento al livello di concentrazione numericamente più vicino al fine di valutare l'accettabilità del valore di ripetibilità ottenuto nella specifica sessione di analisi.

Tabella 2. Limiti di ripetibilità (r) per il mais.

Livello (µg/kg)		Limite di ripetibilità (r) (µg/kg)
1,72	Naturalmente contaminato	0,52
2,25	Fortificato	0,37
4,72	Fortificato	0,30
17,57	Naturalmente contaminato	2,00

Tabella 3. Limiti di ripetibilità (r) per il mangime

Livello (µg/kg)		Limite di ripetibilità (r) (µg/kg)
0,06	Naturalmente contaminato	0,01
0,51	Naturalmente contaminato	0,04
5,17	Fortificato	0,12
6,64	Naturalmente contaminato	0,20
18,66	Fortificato	1,00
21,07	Naturalmente contaminato	2,30

12.2. Esattezza (fattore di recupero)

Il RSA micotossine deve verificare che il valore del fattore di recupero ottenuto nella sessione di analisi sia conforme ai criteri di rendimento indicati nel Regolamento della commissione (CE) N. 401/2006.

13. ESPRESSIONE DEL RISULTATO

La concentrazione della AFB₁ viene espressa in µg/kg. Il risultato deve essere espresso con un numero di cifre decimali conforme con quanto indicato nell'espressione dei limiti massimi riportati nel Regolamento della Commissione (CE) N. 1881/2006. Inoltre il risultato deve essere accompagnato dal valore della incertezza di misura estesa, calcolata utilizzando un fattore di copertura 2 corrispondente ad un livello di fiducia del 95% circa, e corretto per il fattore di recupero, in conformità con quanto riportato dal Regolamento della Commissione (CE) N. 401/2006.

Nel rapporto di prova viene dunque riportato:

- il risultato corretto per il recupero espresso in µg/kg
- il valore del recupero applicato espresso in %
- il valore dell'incertezza espresso in µg/kg
- il valore del Limite di Quantificazione (LQ) del metodo espresso in µg/kg

14. INCERTEZZA

Nel caso di analisi di micotossine con metodi interni e per valori nell'intervallo di applicabilità del metodo che è stato oggetto di validazione, la direzione del Reparto OG ha scelto di associare al risultato un valore di incertezza estesa (U_E) calcolata seguendo l'approccio metrologico (EURACHEM), che sfrutta i dati di validazione. L'intervallo di fiducia scelto è del 95%; il K, fattore di copertura, è scelto in funzione dei gradi di libertà effettivi calcolati; quando i gradi di libertà effettivi risultano di numero pari o superiore a 10, sarà posto $K = 2$ (NOTA si veda quanto descritto nella guida Sinal DT-0002 rev Feb 2000).

Inoltre, quando il risultato è fuori dall'intervallo di applicabilità del metodo, la direzione del Reparto OG assocerà un valore dell'incertezza estesa (U_E) ricavato dall'applicazione dell'equazione di Horwitz (provvisoriamente in attesa di raccogliere un numero maggiore di dati).

I dati di incertezza estesa (U_E) ottenuti in sede di validazione sono di seguito riportati nelle tabelle riassuntive dei valori di incertezza calcolati per il mais ed il mangime (tabelle 4 e 5).

Tabella 4. Valori di incertezza per il mais

Livello (µg/kg)	U estesa (µg/kg)
1,72	0,33
2,25	0,33
4,72	0,55
17,57	2,16

Tabella 5.Valori di incertezza per il mangime

Livello (µg/kg)	U estesa (µg/kg)
0,06	0,01
0,51	0,10
5,17	0,60
6,64	0,78
18,66	2,07
21,07	2,34

15. APPENDICE 1.

Cromatogrammi

Figura 1. Cromatogramma di una soluzione di tartura di aflatossine (AFB₁ 2,40 ng/mL)

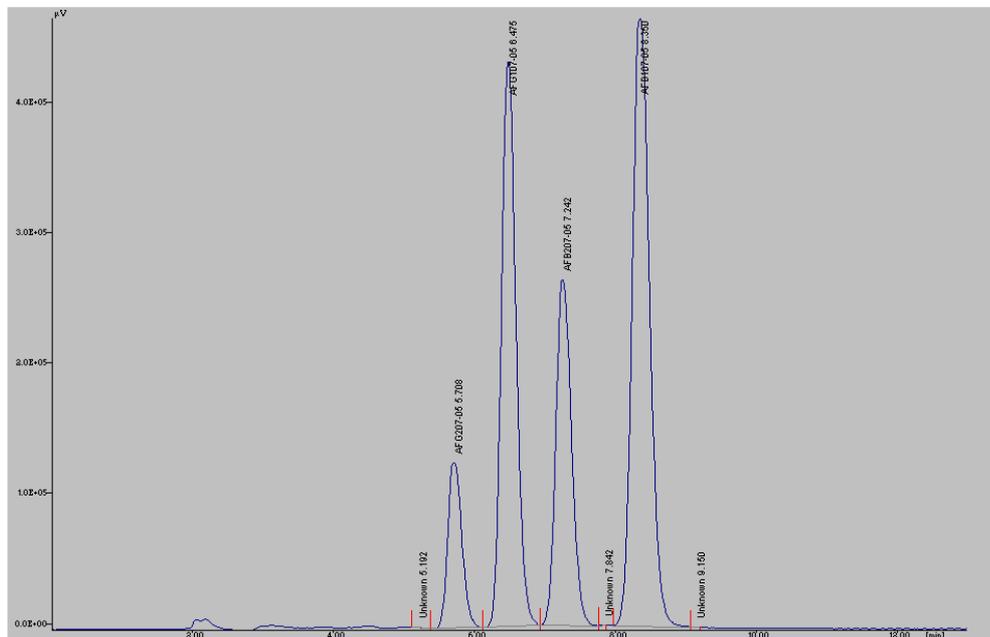


Figura 2. Cromatogramma di un campione di mangime naturalmente contaminato (0,90 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

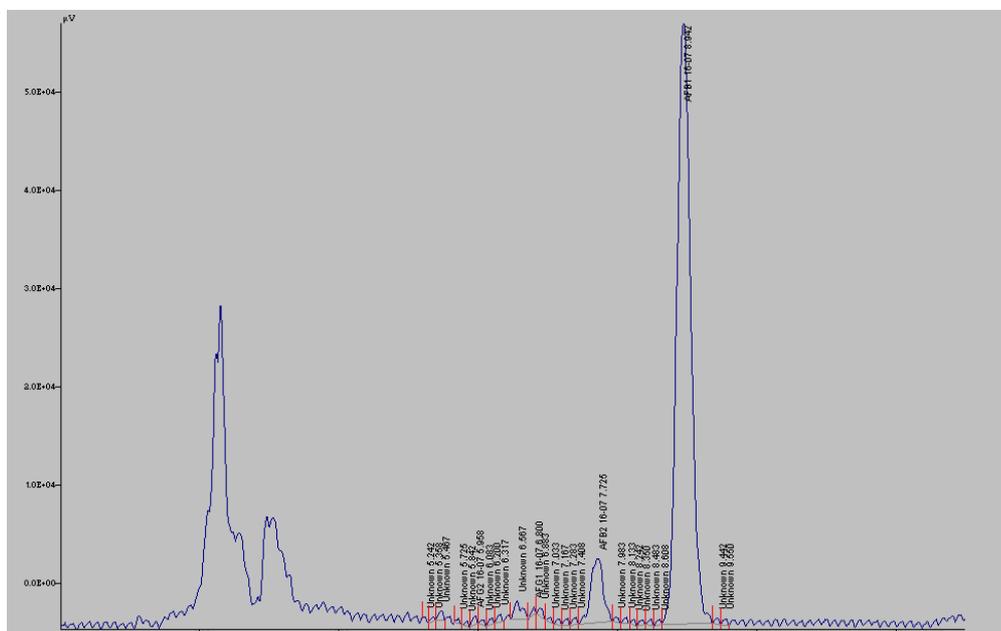


Figura 3. Cromatogramma di un campione di mais naturalmente contaminato (2,30 µg/kg)

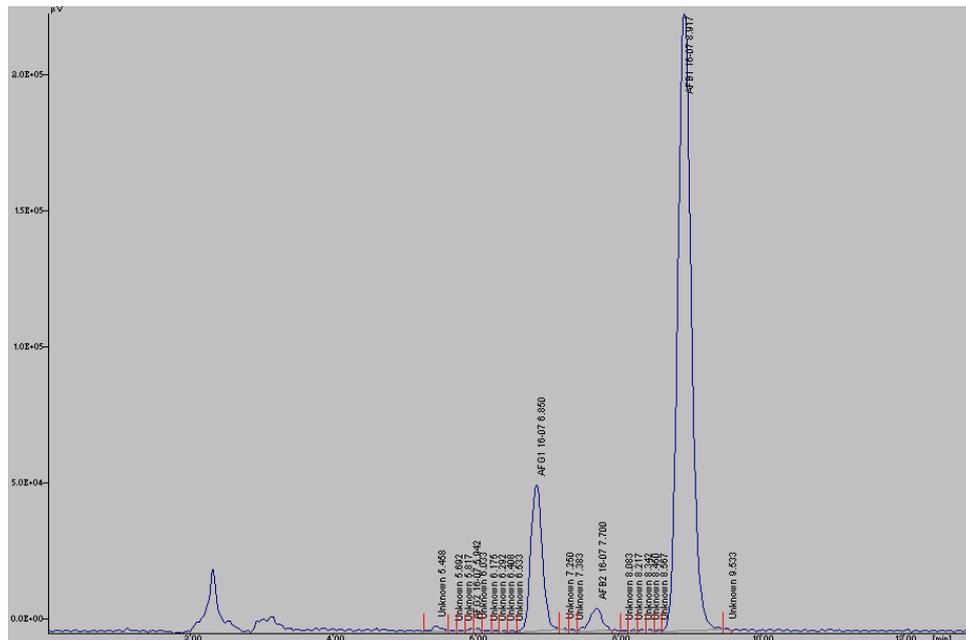


Figura 4. Cromatogramma di un campione di mais addizionato con 2,00 µg/kg (contaminazione totale 4,33 µg/kg)

