



Istituto Superiore di Sanità

Metodo per la Determinazione

Multimicotossina AOF

**(aflatossine B1, B2, G1, G2, ocra tossina A
e fumonisine B1 e B2)**

nei 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. APPARECCHIATURE E MATERIALI	4
6. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	5
7. PROCEDURA	5
8. PROCEDURA DI SPIKING	6
9. ANALISI HPLC FUMONISINE	6
10. ANALISI UPLC AFLATOSSINE – OCRATOSSINA A	8
11. CALCOLI	11



1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente procedura specifica il metodo per la determinazione delle micotossine: aflatossine B1, B2, G1, G2, ocratoossina A, fumonisine B1 e B2 contenute in mangimi. Il metodo prevede la purificazione con colonnine di immunoaffinità e l'analisi strumentale con cromatografia liquida ad alta risoluzione (UPLC) con rivelazione spettrofotometrica in UV.

2. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- 2.1 Questo metodo richiede l'uso di soluzioni standard di riferimento di aflatossine B1, B2, G1, G2; ocratoossina A; fumonisine B1 e B2. Le aflatossine B1, B2, G1, G2 sono composti tossici attualmente classificate dallo IARC nel gruppo 1, mentre le ocratoossina A e fumonisine sono classificate nel gruppo 2, pertanto devono essere indossati guanti di protezione e tutte le fasi di preparazione di materiali di riferimento e campioni devono essere condotte sotto cappa.
- 2.2 Le micotossine sono soggette 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 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 standard di lavoro o durante l'analisi dei campioni può causare una perdita delle micotossine. 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. 1831/2003 della Commissione che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 226/3.
- 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.



4. PRINCIPIO DEL METODO

Le micotossine AOF vengono estratte dalla matrice omogeneizzando il campione con una miscela di metanolo:acetonitrile:acqua 25:25:50. La purificazione viene effettuata mediante passaggio su colonnina di immunoaffinità (IAC) disposte a torre; le micotossine vengono quindi eluite con metanolo, e successivamente quantificata tramite UPLC a fase inversa con rivelazione spettrofluorimetrica.

5. APPARECCHIATURE E MATERIALI

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

- 5.1. Bilancia analitica accurata sui 0,01 mg
- 5.2. Bilancia tecnica accurata sui 0,1 g
- 5.3. Omogeneizzatore (tipo Ultra Turrax e/o Blender con capacità di almeno 1 L, dotati di coperchio, funzionanti ad alta velocità).
- 5.4. Vortex per l'agitazione e la miscelazione delle soluzioni nelle vials.
- 5.5. Macinino
- 5.6. Filtro di carta
- 5.7. Pipette, micropipette e puntali per prelevare volumi: 10 mL, 5 mL, 1 mL e 200 µL
- 5.8. Sistema HPLC, composto da:
- 5.9. Sistema di iniezione (valvola di iniezione, loop da almeno 150 µL)
- 5.10. Pompa HPLC, capace di mantenere una velocità di flusso pari 1 mL/min
- 5.11. Fornetto riscaldante per colonna, capace di mantenere una temperatura costante (e.g. 40°C ± 1°C)
- 5.12. Colonna cromatografica, C18, 4.6 mm x 250 mm - 5 µm, o che fornisca analoghe prestazioni
- 5.13. Rivelatore spettrofotometrico munito di cella a flusso e regolato a 225 nm - λ
- 5.14. Software di elaborazione dati
- 5.15 Colonnine di immunoaffinità. Le colonnine di immunoaffinità devono contenere anticorpi specifici per le aflatossine, ocrato tossina A e fumonisine.
- 5.16 Vacuum manifold per alloggiare le colonnine di immunoaffinità
- 5.17. Siringhe monouso (5 mL, 10 mL, 50 mL o simili) e raccordi per le colonnine immunoaffinità



6. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Macinare il campione con un macinino (5.5) 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.

7. 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.

7.1 Estrazione

Pesare direttamente nell'omogeneizzatore (5.3) 25,0 g di campione (accuratezza $\pm 0,1$ g). Aggiungere 2.5 g di NaCl e 125 ml di solvente di estrazione (metanolo:aceto nitrile:H₂O, 25:25:50). 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 (5.6). Prelevare 10 mL di filtrato e diluirli con 40 mL di PBS (5.11). Miscelare adeguatamente. Filtrare nuovamente il campione su filtro a microfibra di vetro (5.7). Applicare il campione diluito alla colonnina di immunoaffinità (5.10) come descritto nella sezione successiva.

7.2 Purificazione: passaggio in colonnina di immunoaffinità (IAC)

Preparare la colonnina di immunoaffinità (5.9) secondo le istruzioni del fornitore disponendole a torre AflaOcr sopra e Fumonisine sotto. Collegare la colonnina di immunoaffinità al vacuum manifold (5.10), e attaccare la siringa (5.11) alla IAC.

Pipettare 40 mL di estratto filtrato 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 PBS alla fine del passaggio del campione. Asciugare la colonnina passando almeno 2 volumi di aria.

7.3 Preparazione della soluzione test

Eluire il entrambe le IAC seguendo una procedura in due fasi:

AflaOcr: applicare 750 μ L di metanolo alla IAC e lasciarlo fluire per gravità, ripetere l'operazione per 3 volte in un matraccio da 5 ml, portare a volume con H₂O.

Fumonisine: applicare 750 μ L di metanolo per due volte e 750 ml di H₂O per due volte. Raccogliere l'eluato in una vial ambrata.

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.



8. PROCEDURA DI SPIKING

Pesare direttamente nell'omogeneizzatore (5.3) 25,0g di campione (accuratezza $\pm 0,1$ g) non contaminato (bianco) di grano o prodotti derivati. Pipettare nel campione bianco appropriati volumi della soluzione di spiking di ciascuna micotossina d'interesse. Lasciare sotto cappa il campione fortificato per almeno 2 ore (quando possibile è preferibile lasciare tutta la notte) per far evaporare il solvente, e procedere come 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, ($\mu\text{g/kg}$)

C_s : concentrazione ottenuta dal campione non fortificato (nel caso del campione bianco $C_s=0$), ($\mu\text{g/kg}$)

C_a : concentrazione di analita aggiunta, ($\mu\text{g/kg}$)

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.

9. ANALISI HPLC Fumonisine

9.1 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 (5.14). In tabella 1 sono riportati, a titolo di esempio, i volumi di soluzione di lavoro del materiale di riferimento certificato di aflatossina B₁ (5.17) e di solvente di iniezione per la preparazione di soluzioni di taratura.

Tabella 1. Preparazione delle soluzioni di taratura FUMONISINE

Soluzione di taratura n°	Volume di soluzione preparato (μL)	Volume della Soluzione stock prelevato (μL)	Concentrazione della soluzione FB1 (ng/mL)	Concentrazione della soluzione FB2 (ng/mL)
1	5000	50	0,10	0,05
2	5000	125	0,20	0,125
3	5000	500	1,00	0,50
4	5000	1000	2,00	1,00

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



9.2 Curva di taratura

Predisporre una sequenza di iniezioni in HPLC mettendo in successione le soluzioni di taratura. 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 di linearità: $\pm 10\%$ della concentrazione attesa.
- Criterio di accettabilità del livello di una delle soluzioni di lavoro del materiale di riferimento: $\pm 10\%$ della concentrazione attesa.
- Criterio di accettabilità per il tempo di ritenzione dell'analita rispetto ai tempi memorizzati nel metodo strumentale: $\pm 20\%$.

9.3 Derivatizzazione pre-colonna Fumonisine

Pesare 40mg di OPA, aggiungere 1 ml di Metanolo e diluire con 5 ml di una soluzione 0,1M di Borace, aggiungere 50ul di 2-mercaptoetanolo.

La soluzione derivatizzante così preparata va conservata al riparo dalla luce a temperatura ambiente per non più di sette giorni.

9.4 Condizioni operative per il sistema HPLC

Mescolare 50uL di soluzione derivatizzante con 50uL di campione. Vortexare per qualche secondo e poi iniettare entro 3 minuti dalla formazione del derivato.

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
- Fase mobile: MeOH: soluzione 0.1M NaH_2PO_4 v:v, 77:23 (pH=3.35).
- Temperatura del fornello: $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$
- Lunghezza d'onda del rivelatore spettrofluorimetrico: $\lambda_{\text{ecc}} 335 \text{ nm}$ - $\lambda_{\text{em}} 440 \text{ nm}$
- Volume di iniezione: 150 μL



9.5 Identificazione

Predisporre una sequenza di iniezioni seguendo lo schema:

- Iniezione soluzione di taratura (almeno 1 iniezione)
- Iniezione soluzione test (inclusi i campioni lavorati per il calcolo del fattore di recupero)
- 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

9.6 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).

10. ANALISI UPLC AFLA-OCRA

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 (5.14). In tabella 2 sono riportati, a titolo di esempio, i volumi di soluzione di lavoro del materiale di riferimento certificato di aflatossine e ocra tossina A, e di solvente di iniezione per la preparazione di soluzioni di taratura.



Tabella 2. Preparazione delle soluzioni di taratura AFLATOSSINE OCRATOSSINA A

Soluzione di taratura n°	Volume di soluzione preparato (µL)	Concentrazione della soluzione AFB1/AFG1 (ng/mL)	Concentrazione della soluzione AFB2/AFG2 (ng/mL)	Concentrazione della soluzione OTA (ng/mL)
1	5000	0.4	0.1	0.5
2	5000	1.0	0.25	1
3	5000	2.0	0.5	2
4	5000	5.0	1.25	8

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 Curva di taratura

Predisporre una sequenza di iniezioni in HPLC mettendo in successione le soluzioni di taratura. 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 di linearità: $\pm 10\%$ della concentrazione attesa.
- Criterio di accettabilità del livello di una delle soluzioni di lavoro del materiale di riferimento: $\pm 10\%$ della concentrazione attesa.
- Criterio di accettabilità per il tempo di ritenzione dell'analita rispetto ai tempi memorizzati nel metodo strumentale: $\pm 20\%$.

10.3 Condizioni operative per il sistema UPLC

La colonna deve rispettare le specifiche dettagliate.

Il sistema UPLC deve essere settato secondo i seguenti parametri:

- Fase mobile A: H₂O acidulata al 2% con acido acetico
- Fase mobile B: MeOH



- Flusso 0.35 mL/min; V inj= 20µL
- Colonna BEH C18 50x2.1mm, 1.7µm
- Temperatura del fornello: 40°C ± 1°C
- Gradiente applicato:

Tempo	%A	%B
0	68	32
3	58	42
5.4	20	80
5.5	68	32
8	68	32

Gradiente spettro fluorimetrico:

- **Tempo – 0 minuti:** λ_{ecc} : 365 nm, λ_{em} : 440 nm
- **Tempo – 3 minuti** λ_{ecc} : 333 nm, λ_{em} : 460 nm

10.4 Identificazione

Predisporre una sequenza di iniezioni seguendo lo schema:

- Iniezione soluzione di taratura (almeno 1 iniezione)
- Iniezione soluzione test (inclusi i campioni lavorati per il calcolo del fattore di recupero)
- 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.

10.5 Determinazione

Il sistema di gestione informatizzato associato all'UPLC 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 micotossina 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 delle micotossine, W_{mico} , in nanogrammi per grammo (ng/g) usando la seguente equazione:

$$W = \frac{m}{m_S} \cdot \frac{V_1}{V_2} \cdot \frac{V_3}{V_4} D$$

dove:

m = massa della micotossina nell'aliquota di soluzione test iniettata in colonna, ng

m_S = massa del campione estratto, g

V_1 = volume del solvente di estrazione, mL

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

V_3 = volume totale della soluzione test, mL

V_4 = volume di iniezione della soluzione test, mL

D = fattore di diluizione, (1)

Esprimere il risultato finale in microgrammi per chilogrammo, ($\mu\text{g/kg}$).