

METODI DI ANALISI PER LA DETERMINAZIONE DELL'OCRATOSSINA A (OTA) NEGLI ALIMENTI

Francesca Debegnach

Reparto OGM e Xenobiotici di Origine Fungina
Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari
Istituto Superiore di Sanità

francesca.debegnach@iss.it



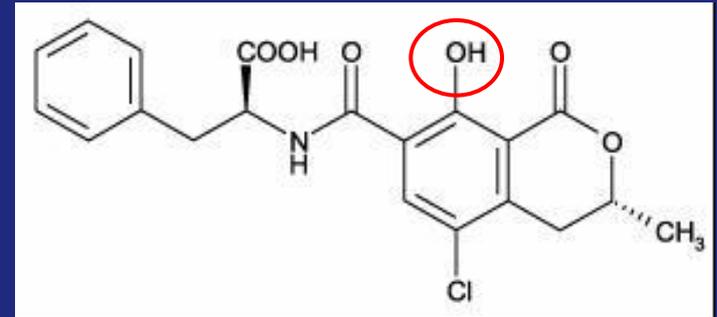
La problematica delle micotossine nella filiera agro-alimentare: stato dell'arte e prospettive
Istituto Superiore di Sanità, 14-15 novembre 2007



OCRATOSSINA A (I)

Le ocratossine costituiscono un gruppo di derivati della isocumarina legati alla L-fenilalanina.

L'ocratossina A è un composto incolore e cristallino, con peso molecolare 403.8 e punto di fusione a 90°C.



L'OTA è solubile nei solventi organici polari e in soluzione acquosa di bicarbonato di sodio, lievemente solubile in acqua.

Lo spettro di assorbimento all'UV varia con la polarità del solvente e con il pH.

In etanolo sono presenti massimi di assorbimento a 213 nm ($\epsilon = 36.600$) e a 332 nm ($\epsilon = 6400$), mentre è presente un solo massimo di assorbimento a 333 nm a pH acido e a 380 nm a pH basico. Ciò è attribuibile alla ionizzazione del gruppo ossidrilico sull'anello fenolico. Il coefficiente di estinzione molare a 330 nm oscilla tra 4100 e 6500 e ciò può essere legato alla dipendenza dal pH.

La massima fluorescenza di emissione è a 467 nm in etanolo al 96%. In soluzione etanolica l'OTA può essere conservata, se refrigerata, anche per un anno, ma si decompone irreversibilmente sotto l'azione della luce.

OCRATOSSINA A (II)

L'ocratossina A viene prodotta più frequentemente da quei funghi che proliferano durante la conservazione del prodotto.



Matrici suscettibili alla contaminazione da OTA

- ✓ Cereali (grano, orzo, mais, avena...)
- ✓ Frutta secca (uvetta)
- ✓ Caffé
- ✓ Cacao
- ✓ Spezie (paprica, pepe...)
- ✓ Liquirizia
- ✓ Vino
- ✓ Birra



Metodi ufficiali (AOAC/CEN) per la determinazione dell'ocratossina A (I)

Matrice	Riferimento	Metodo
Cereali e prodotti derivati	CEN ISO 15141-1-1999	Cleanup gel di silice; HPLC; spettrofluorimetro
Cereali e prodotti derivati	CEN ISO 15141-2-1999	Cleanup bicarbonato; HPLC; spettrofluorimetro
Mais e orzo	AOAC-991.44	HPLC
Orzo	AOAC-2000.03	Cleanup IAC; HPLC; spettrofluorimetro
Orzo e caffè tostato	CEN 14132:2003/AC:2006	Cleanup IAC; HPLC; spettrofluorimetro
Caffé tostato	AOAC-2000.09	Cleanup IAC; HPLC; spettrofluorimetro

<http://www.aoac.org>

<http://www.cen.eu/cenorm/homepage.htm>



La problematica delle micotossine nella filiera agro-alimentare: stato dell'arte e prospettive
Istituto Superiore di Sanità, 14-15 novembre 2007



Metodi ufficiali (AOAC/CEN) per la determinazione dell'ocratossina A (II)

Matrice	Riferimento	Metodo
Caffé verde	AOAC-2004.10	HPLC
Vino e birra	AOAC-2001.01	Cleanup IAC; HPLC; spettrofluorimetro
	CEN 14133:2003/AC:2006	

Orzo	AOAC-973.37	TLC
Orzo e caffè verde	AOAC-975.38	TLC

<http://www.aoac.org>

<http://www.cen.eu/cenorm/homepage.htm>



La problematica delle micotossine nella filiera agro-alimentare: stato dell'arte e prospettive
Istituto Superiore di Sanità, 14-15 novembre 2007



DETERMINAZIONE DELL'OTA IN CAMPIONI DI GRANO E PRODOTTI DERIVATI

Metodo interno validato



Estensione del metodo CEN 14132:2003 “Determination of ochratoxin A in barley and roasted coffee – HPLC method with immunoaffinity column clean-up”

Le modifiche riguardano:

- Tipologia di matrice
- Composizione della miscela di estrazione
- Composizione della fase mobile
- Preparazione del campione

PARAMETRI DEL METODO

Intervallo di concentrazione 1.0÷4.9 µg/kg

LR = 0.22 µg/kg

LQ = 0.30 µg/kg

RSD_r = 2.41 %

Recupero = 98%



*

µg/kg	RSD _r %	RSD _R %	Recupero %
<1	≤40	≤60	50-120
1-10	≤ 20	≤ 30	70-110

*Regolamento CE N° 401/2006

PROCEDURA ANALITICA - PREPARAZIONE DEL CAMPIONE



- Pesare e macinare l'intero campione di laboratorio
- Aggiungere un volume di acqua pari al peso del campione (rapporto peso/peso, campione/acqua: 1/1)
- Miscelare per alcuni minuti con opportuno miscelatore fino ad ottenere un impasto omogeneizzato di consistenza pastosa



Capacità 1L



Capacità 4L



Omogeneizzatori ad immersione



Slurry

PROCEDURA ANALITICA - ESTRAZIONE

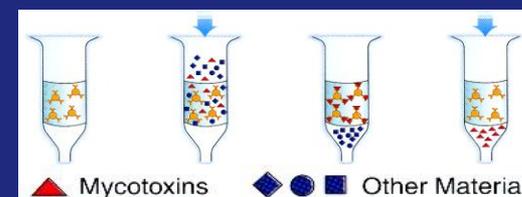


- ❖ Pesare 50.0 g di slurry direttamente in blender
- ❖ Aggiungere 75 mL di solvente di estrazione (AcCN:H₂O 80:20 v/v)
- ❖ Estrarre in blender ad alta velocità per 3 minuti
- ❖ Filtrare l'estratto su filtro di carta
- ❖ Diluire 5 mL di campione filtrato con 55 mL di PBS

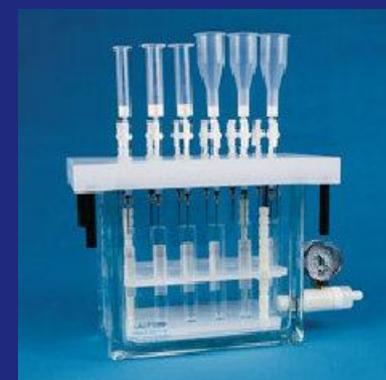
PROCEDURA ANALITICA - PURIFICAZIONE



- o Passare nella colonna di immunoaffinità (IAC) 48 mL di estratto diluito ad una velocità di circa 5 mL/min (1-2 gocce/sec)
- o Lavare la IAC con 10 mL di H₂O
- o Asciugare la IAC passando almeno 2 volumi di aria



- Eluire l'OTA con 1 mL di metanolo (500+500 µL) direttamente in una vial da 4 mL
- Aggiungere 1 mL di H₂O
- Agitare al vortex
- Conservare il campione a 4°C fino al momento dell'analisi



ANALISI IN HPLC – Condizioni operative del sistema HPLC

- Flusso
1 mL/min
- Composizione della fase mobile
AcCN:MeOH:H₂O acidulata al 2% con acido acetico glaciale 35:25:40
- Temperatura fornetto colonna
40°C
- Rivelazione spettrofluorimetrica
 $\lambda_{\text{eccitazione}}=333 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{emissione}}=460 \text{ nm}$
- Volume di iniezione
100 μL
- Colonna cromatografica
C18 4.6x150 mm, 5 μm



ANALISI IN HPLC – Preparazione delle soluzioni standard di ocratossina A

Soluzione madre di materiale di riferimento liquida
deve avere una concentrazione minima di OTA di 10 µg/mL

Soluzione madre di materiale di riferimento in forma cristallina
sciogliere l'OTA in una miscela solvente toluene:acido acetico glaciale 99:1 v/v in modo da ottenere una soluzione con concentrazione compresa tra 10 e 100 µg/mL. Per determinare l'esatta concentrazione della soluzione registrare la curva di assorbimento fra i 300 e 370 nm, in una cella di quarzo da 1 cm con una spettrofotometro UV e la miscela toluene:acido acetico glaciale 99:1 v/v come riferimento.

Individuare la lunghezza d'onda per il massimo assorbimento e calcolare la concentrazione di OTA (ρ_{OTA}) in µg/mL.

$$\rho_{OTA} = \frac{A_{\max} \cdot M \cdot 100}{\varepsilon \cdot \delta}$$

ρ_{OTA} = concentrazione di OTA in µg/mL

A_{\max} = assorbanza al massimo della curva di assorbimento ($\lambda = 333$ nm)

M = peso molecolare dell'OTA (403.8 g/mol)

ε = coefficiente di estinzione molare (5440 m²/mol)

δ = cammino ottico (1 cm)



ANALISI IN HPLC – Preparazione della curva di calibrazione

Predisporre una sequenza di iniezioni in HPLC mettendo in successione le soluzioni di taratura preparate secondo lo schema riportato in tabella.

La curva di taratura sarà generata dai cromatogrammi risultanti dall'iniezione in triplicato di ciascun livello (5 punti per un totale di 15 iniezioni).

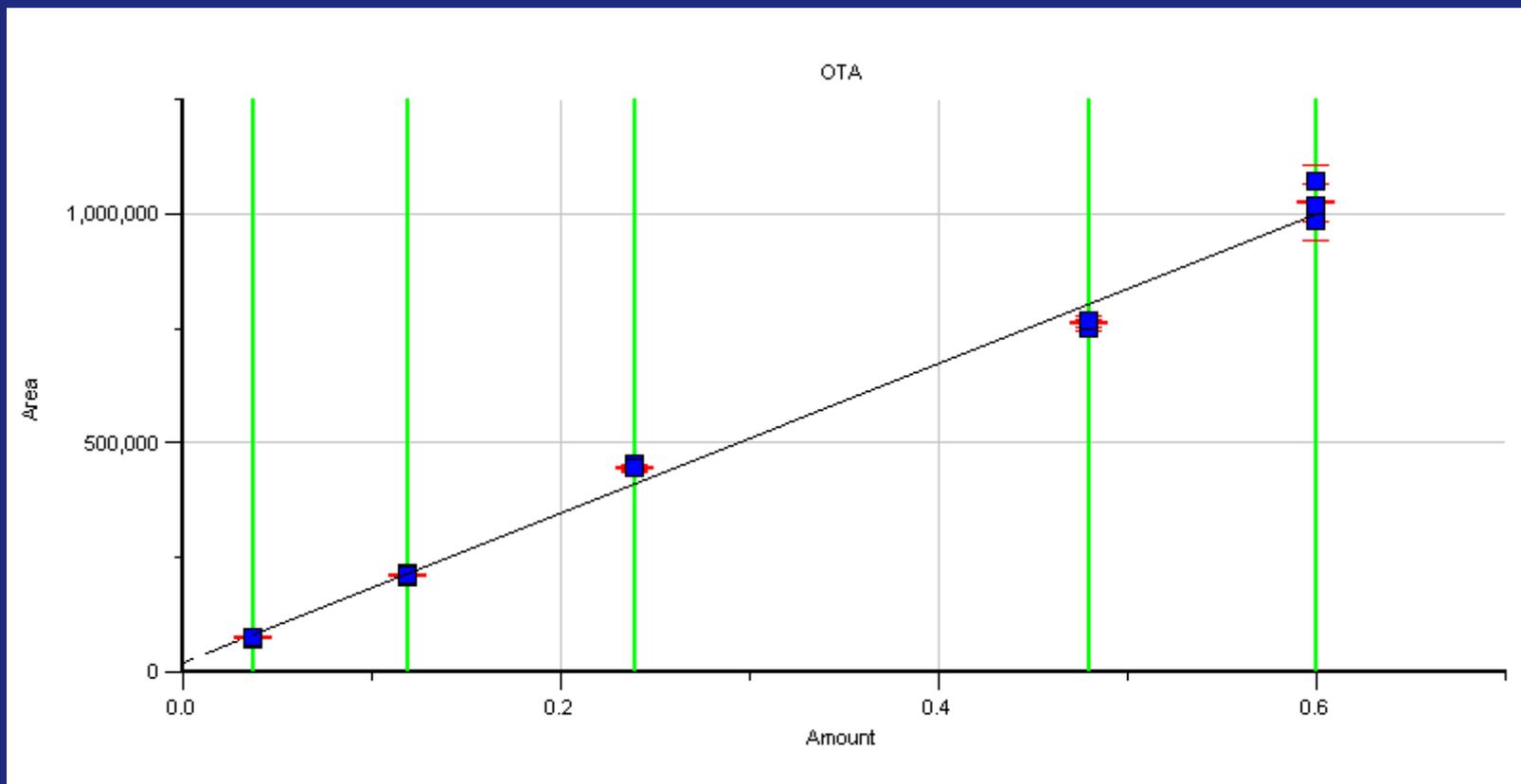
Soluzione standard	Volume di soluzione preparato (mL)	Volume di stock solution prelevato (μL)*	Concentrazione della soluzione (ng/mL)	Corrispondente contaminazione ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	10	25	0.25	0.5
2	10	50	0.50	1.0
3	10	150	1.50	3.0
4	10	200	2.00	4.0
5	10	300	3.00	6.0

*Soluzione standard di ocratossina A 100 ng/mL



CURVA DI CALIBRAZIONE

Coefficiente di correlazione = 0.9970



PROCEDURA DI FORTIFICAZIONE DEL CAMPIONE (SPIKE)

- ✓ Pesare, direttamente in blender, 50.0 g di campione (slurry) non contaminato corrispondente a 25.0 g di matrice secca
- ✓ Pipettare un volume noto di soluzione standard di OTA
- ✓ Lasciare il campione fortificato sotto cappa per almeno 2 ore

CALCOLO DEL FATTORE DI RECUPERO

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

C_t = concentrazione ottenuta dal campione fortificato

C_s = concentrazione ottenuta dal campione bianco

C_a = concentrazione di analita aggiunta



CALCOLI METODO

$$m_A = \frac{\text{area} - a}{b}$$

m_A = ng di ocratossina A nella soluzione test analizzata (m_a)

Area = area del picco cromatografico

a = intercetta curva di calibrazione

B = pendenza della curva di calibrazione

Valore fornito dal software di gestione dell'HPLC

$$W_{OTA} = \frac{m_a \cdot (V_5/V_6) \cdot (V_3/V_4) \cdot (V_1/V_2)}{m_s}$$

m_a = massa dell'OTA nell'aliquota di soluzione test campione iniettata; ng

V_6 = volume di iniezione; mL (0.1)

V_5 = volume della soluzione test di campione dopo l'eluizione; mL (2)

V_4 = volume dell'aliquota di soluzione test passata in IAC; mL (48)

V_3 = volume di diluizione; mL (55)

V_2 = volume di campione filtrato prelevato per l'analisi; mL (5)

V_1 = volume del solvente di estrazione, mL (75+25*)

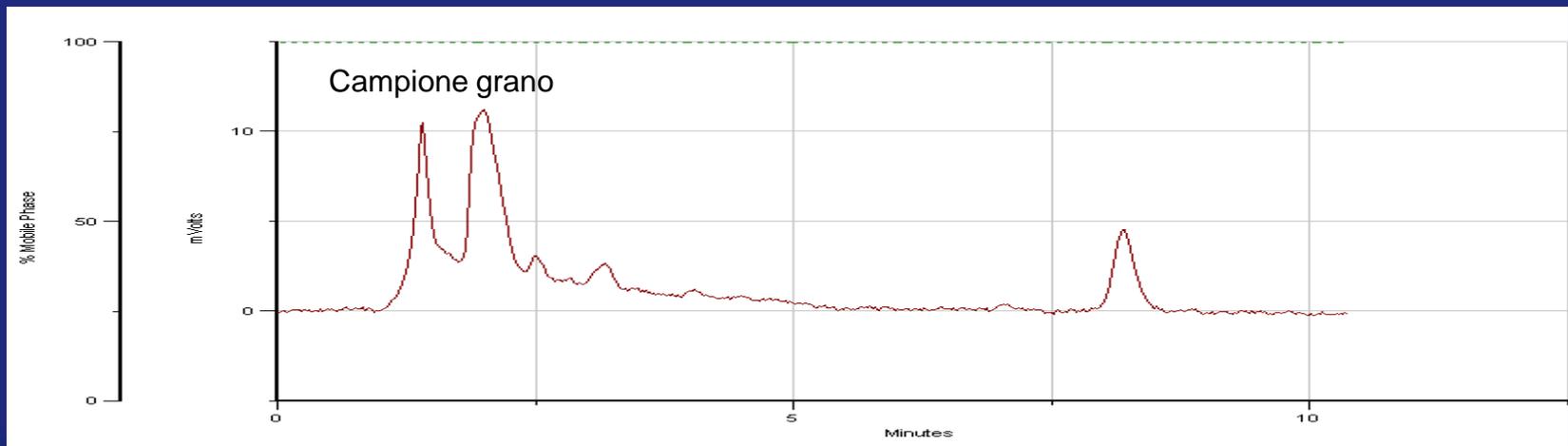
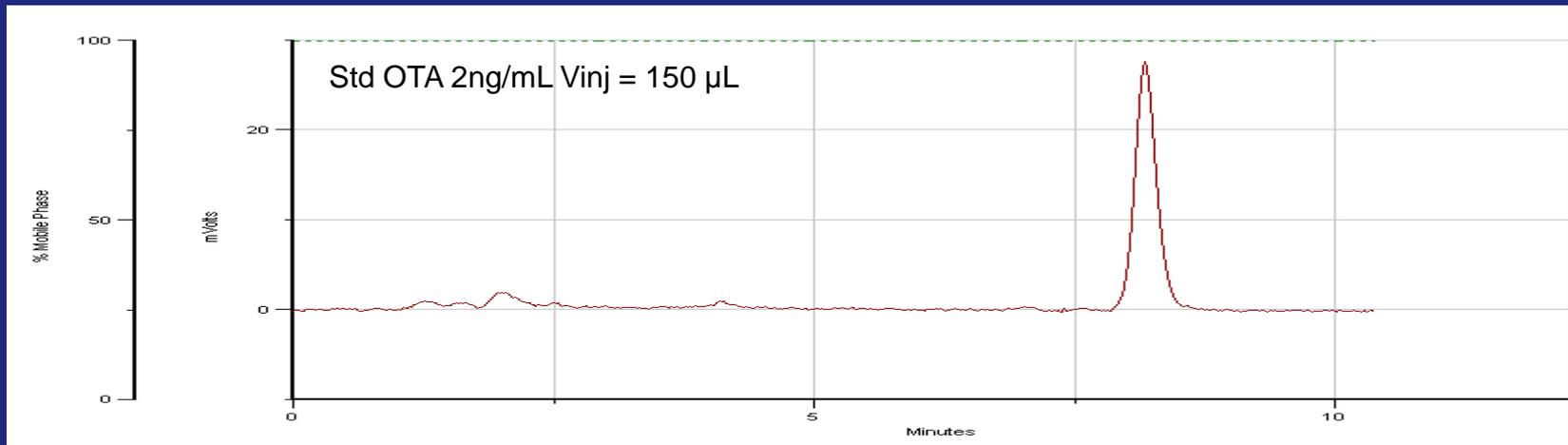
m_s = massa del campione, g (25)**

* 75 mL del solvente di estrazione + 25 mL di H₂O aggiunti per la preparazione dello slurry

** 50.0 g di slurry pesato equivalgono a 25.0 g di matrice secca

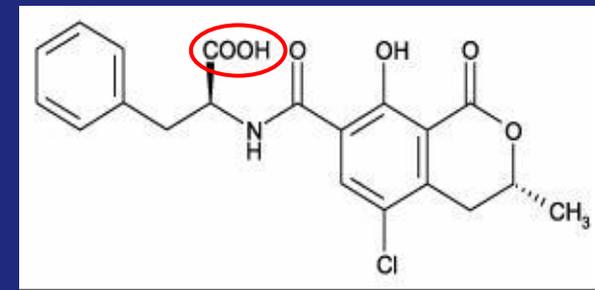


CROMATOGRAMMI



METODO DI CONFERMA PER L'OCRATOSSINA A

Formazione dell'estere metilico



Un'aliquota del campione estratto e purificato viene addizionata con 1 mL di trifluoruro di boro (BF₃) in metanolo, agitata e lasciata a reagire per 10 minuti ad una temperatura di 80°C

Addizionare 2 mL di n-esano e 2 mL di acqua, agitare e si aspettare che le due fasi si separino completamente, recuperare il surnatante

Ripetere l'estrazione della fase acquosa altre due volte

Riunire gli estratti di n-esano e portarli a secco sotto corrente di azoto

Riprendere il residuo con 2 mL di fase mobile e iniettarlo in HPLC

La conferma si basa sulla scomparsa del picco dell'ochratoxina A e la comparsa del picco caratteristico dell'estere con *shift* del tempo di ritenzione.

La conferma viene solitamente eseguita per la conferma dell'identità del picco o su campioni che presentino anomalie nel profilo cromatografico (picchi scodati o doppi).

DETERMINAZIONE DELL'OTA IN CAMPIONI DI ORZO E CAFFE' TOSTATO

Metodo validato CEN-EN 14132:2003 "Determination of ochratoxin A in barley and roasted coffee – HPLC method with immunoaffinity column clean-up"



PARAMETRI DEL METODO



Intervallo di concentrazione orzo $0.1 \div 4.5 \mu\text{g}/\text{kg}$

$\text{RSD}_r = 14\%$

$\text{RSD}_R = 15\%$

Recupero = 93%

caffé tostato $0.2 \div 5.5 \mu\text{g}/\text{kg}$

$\text{RSD}_r = 2\%$

$\text{RSD}_R = 14\%$

Recupero = 88%

*

$\mu\text{g}/\text{kg}$	$\text{RSD}_r \%$	$\text{RSD}_R \%$	Recupero %
<1	≤ 40	≤ 60	50-120
1-10	≤ 20	≤ 30	70-110

*Regolamento CE N° 401/2006

PROCEDURA ANALITICA- ESTRAZIONE - ORZO



- ❖ Pesare 25.0 g di campione direttamente in blender
- ❖ Aggiungere 100 mL di solvente di estrazione (AcCN:H₂O 60:40 v/v)
- ❖ Estrarre in blender ad alta velocità per 3 minuti
- ❖ Filtrare l'estratto su filtro di carta
- ❖ Diluire 5 mL di filtrato con 55 mL di PBS

PROCEDURA ANALITICA- PURIFICAZIONE - ORZO



- o Passare nella colonna di immunoaffinità (IAC) 48 mL di estratto diluito ad una velocità di circa 5 mL/min (1-2 gocce/sec)
 - o Lavare la IAC con 10 mL di H₂O
 - o Asciugare la IAC passando almeno 2 volumi di aria
-
- Eluire l'OTA con 1 mL di metanolo (500+500 µL)
 - Portare a secco sotto corrente di azoto
 - Riprendere con 1 mL di MeOH:H₂O:Acido acetico glaciale 30:70:1 v/v/v

PROCEDURA ANALITICA – ESTRAZIONE – CAFFE' TOSTATO

- ❖ Pesare 15.0 g di campione direttamente in blender
- ❖ Aggiungere 150 mL di solvente di estrazione (MeOH:soluzione 30 g/L di NaHCO_3 50:50 v/v)
- ❖ Estrarre in blender ad alta velocità per 3 minuti
- ❖ Filtrare l'estratto su filtro di carta
- ❖ Centrifugare il filtrato per 15 min a 1300 rpm
- ❖ Diluire 10 mL di campione centrifugato con 10 mL di soluzione 30 g/L di NaHCO_3



PROCEDURA ANALITICA- PURIFICAZIONE – CAFFE' TOSTATO

SPE

- o Lavare la SPE con 15.0 mL di MeOH e 5 mL di soluzione 30 g/L di NaHCO_3
- o Passare nella SPE il campione diluito ad una velocità di circa 5 mL/min (1-2 gocce/sec)
- o Lavare la SPE con 10 mL di MeOH:soluzione 30 g/L di NaHCO_3 20:80 v/v
- o Asciugare la IAC passando almeno 2 volumi di aria

- Eluire l'OTA con 10 di mL di soluzione 10 g/L di NaHCO_3
- Diluire l'eluato con 30 mL di PBS

IAC

- o Passare nella colonna di immunoaffinità (IAC) il campione diluito (40 mL) ad una velocità di circa 5 mL/min (1-2 gocce/sec)
- o Lavare la IAC con 10 mL di H_2O
- o Asciugare la IAC passando almeno 2 volumi di aria

- Eluire l'OTA con 1 mL di metanolo (500+500 μL) direttamente in una vial (o con solvente indicato dal produttore)
- Portare a secco sotto corrente di azoto
- Riprendere con 1 mL di fase mobile



ANALISI IN HPLC – Condizioni operative del sistema HPLC

- Flusso
1 mL/min
- Composizione della fase mobile
AcCN:H₂O acidulata al 2% con acido acetico glaciale 50:50 v/v
- Temperatura fornetto colonna
45°C
- Rivelazione spettrofluorimetrica
 $\lambda_{\text{eccitazione}}=333 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{emissione}}=460 \text{ nm}$
- Volume di iniezione
100 μL
- Colonna cromatografica
C18 4.6x150 mm, 5 μm



CALCOLI METODO



$$m_A = \frac{\text{area} - a}{b}$$

m_A = ng di ocratossina A nella soluzione test analizzata (m_a)

Area = area del picco cromatografico

a = intercetta curva di calibrazione

B = pendenza della curva di calibrazione

Valore fornito dal software di gestione dell'HPLC

$$W_{ota} = \frac{m_a \cdot (V_3 / V_4) \cdot (V_1 / V_4)}{m_s}$$

m_a = massa dell'OTA nell'aliquota di soluzione test campione iniettata; ng

V_4 = volume di iniezione; mL (0.1)

V_3 = volume della soluzione test di campione dopo l'eluizione; mL (1)

V_2 = volume di campione filtrato prelevato per l'analisi; mL (orzo: 4; caffè tostato 10)

V_1 = volume del solvente di estrazione, mL (orzo: 100; caffè tostato: 150)

m_s = massa del campione, g (orzo:25; caffè tostato: 15)

DETERMINAZIONE DELL'OTA IN CAMPIONI DI VINO E BIRRA

Metodo validato CEN 14133:2003/AC:2006 “Determination of ochratoxin A in wine and beer – HPLC method with immunoaffinity column clean-up”



PARAMETRI DEL METODO



Intervallo di concentrazione vino 0.1÷3.0 µg/kg (**2.5 µg/kg**) birra 0.1÷3.0 µg/kg (**1.4 µg/kg**)
 RSD_r = 8.9% RSD_r = 4.7%
 RSD_R = 13.6% RSD_R = 15.2%
 Recupero = 84.3% Recupero = 93.6%

*

µg/kg	RSD _r %	RSD _R %	Recupero %
<1	≤40	≤60	50-120
1-10	≤ 20	≤ 30	70-110

*Regolamento CE N° 401/2006

PROCEDURA ANALITICA – PREPARAZIONE DEL CAMPIONE



- ❖ Degassare i campioni di vino frizzante o di birra
Raffreddare il campione a 4°C e sonificarlo per circa 1h
- ❖ Prelevare 10.0 mL di campione e diluirlo con una soluzione 50.0 g/L di NaH_2CO_3 e 10 g/L di polietilenglicole (PEG). Agitare
- ❖ Filtrare su filtro a microfibra di vetro i campioni che presentassero un intorbidamento in seguito alla diluizione

PROCEDURA ANALITICA- PURIFICAZIONE



- o Passare nella colonna di immunoaffinità 10 mL di campione diluito ad una velocità di circa 5 mL/min (1-2 gocce/sec)
 - o Lavare la IAC con 5 mL di una soluzione 25.0 g/L di NaCl e 5.0 g/L di NaH_2CO_3 e con 5 mL di H_2O
 - o Asciugare la IAC passando almeno 2 volumi di aria
-
- Eluire l'OTA con 2 mL di metanolo direttamente in una vial
 - Portare a secco sotto corrente di azoto
 - Riprendere con 250 μL di fase mobile

ANALISI IN HPLC – Condizioni operative del sistema HPLC

- Flusso
1 mL/min
- Composizione della fase mobile
AcCN:H₂O acidulata al 2% con acido acetico glaciale 50:50 v/v
- Temperatura fornello colonna
40°C
- Rivelazione spettrofluorimetrica
 $\lambda_{\text{eccitazione}}=333 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{emissione}}=460 \text{ nm}$
- Volume di iniezione
100 μL
- Colonna cromatografica
C18 4.6x150 mm, 5 μm



CALCOLI METODO

$$m_A = \frac{\text{area} - a}{b}$$

m_A = ng di ocratossina A nella soluzione test analizzata (m_a)

Area = area del picco cromatografico

a = intercetta curva di calibrazione

B = pendenza della curva di calibrazione



Valore fornito dal software di gestione dell'HPLC

$$W_{ota} = \frac{m_a \cdot 2 \cdot V_3}{V_1 \cdot V_2}$$

m_a = massa dell'OTA nell'aliquota di soluzione test campione iniettata; ng

2 = fattore di diluizione

V_3 = volume di fase mobile usata per riprendere il campione; μL (250)

V_2 = volume di iniezione; μL (100)

V_1 = volume di campione da analizzare, mL (10)

DETERMINAZIONE DELL'OTA IN CAMPIONI DI CACAO E CIOCCOLATA

Metodo interno validato*

PARAMETRI DEL METODO

$$RSD_r = 20\%$$

$$RSD_R = 30\%$$

$$\text{Recupero} = 80\%$$



**

$\mu\text{g}/\text{kg}$	$RSD_r \%$	$RSD_R \%$	Recupero %
<1	≤ 40	≤ 60	50-120
1-10	≤ 20	≤ 30	70-110

**Regolamento CE N° 401/2006

*Brera, Grossi, De Santis, Miraglia. "High Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Ochratoxin A in Cocoa Powder". Journal of liquid chromatography & related technologies, vol 26(4), 585-598, 2003.



La problematica delle micotossine nella filiera agro-alimentare: stato dell'arte e prospettive
Istituto Superiore di Sanità, 14-15 novembre 2007



PROCEDURA ANALITICA - ESTRAZIONE



- ❖ Pesare 5.0 g di campione direttamente in blender
- ❖ Aggiungere 100 mL di soluzione 0.1% di NaH_2CO_3 e 0.3% di polietilenglicole (PEG). Portare il pH a 7.8 con HCl 0.1M
Nel caso della cioccolata aggiungere circa 100 mL di n-esano
- ❖ Estrarre in blender ad alta velocità per 2 minuti
- ❖ Filtrare l'estratto su filtro di carta
- ❖ Diluire 20 mL di campione filtrato con 20 mL di PBS

ELUIZIONE OTA E pH

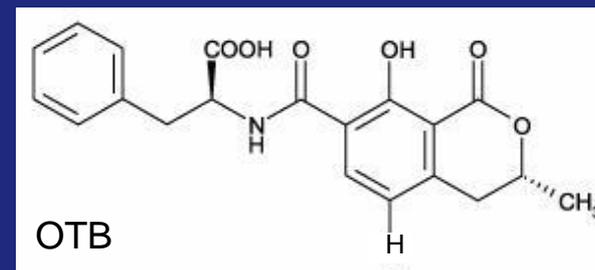
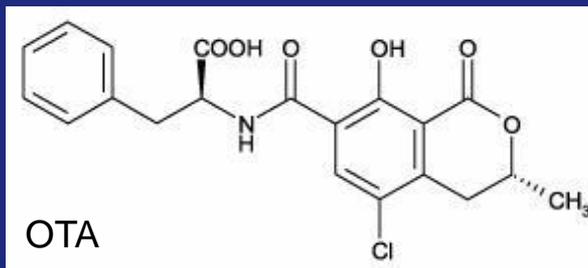


Durante la fase di estrazione il pH aumenta a causa della co-estrazione di sostanze alcaline dalla matrice

Se il pH della soluzione di estrazione non viene corretto sull'estratto si possono riscontrare anche valori di pH=9.0

A pH alcalino si ha $OTA \longrightarrow OTB$

Di conseguenza diminuisce la concentrazione di OTA, inoltre l'OTB compete con l'OTA per il legame antigene-anticorpo diminuendo i valori di recupero in IAC



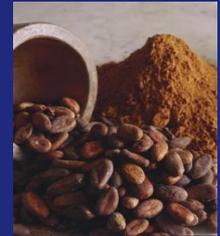
PROCEDURA ANALITICA- PURIFICAZIONE



- o Passare nella colonna di immunoaffinità (IAC) 30 mL di estratto diluito ad una velocità di circa 5 mL/min (1-2 gocce/sec)
 - o Lavare la IAC con 10 mL di PBS e 10 mL di H₂O
 - o Asciugare la IAC passando almeno 2 volumi di aria
-
- Eluire l'OTA con 1.250 mL di metanolo (500+750 µL) direttamente in una vial da 4 mL
 - Aggiungere 1 mL di H₂O
 - Agitare al vortex
 - Conservare il campione a 4°C fino al momento dell'analisi

ANALISI IN HPLC – Condizioni operative del sistema HPLC

- Flusso
1.2 mL/min
- Composizione della fase mobile
AcCN:H₂O acidulata al 2% con acido acetico glaciale 50:50 v/v
- Temperatura fornetto colonna
40°C
- Rivelazione spettrofluorimetrica
 $\lambda_{\text{eccitazione}}=333 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{emissione}}=460 \text{ nm}$
- Volume di iniezione
200 μL
- Colonna cromatografica
C18 4.6x250 mm, 5 μm



CALCOLI METODO

$$m_A = \frac{\text{area} - a}{b}$$

m_A = ng di ocratossina A nella soluzione test analizzata (m_a)

Area = area del picco cromatografico

a = intercetta curva di calibrazione

B = pendenza della curva di calibrazione

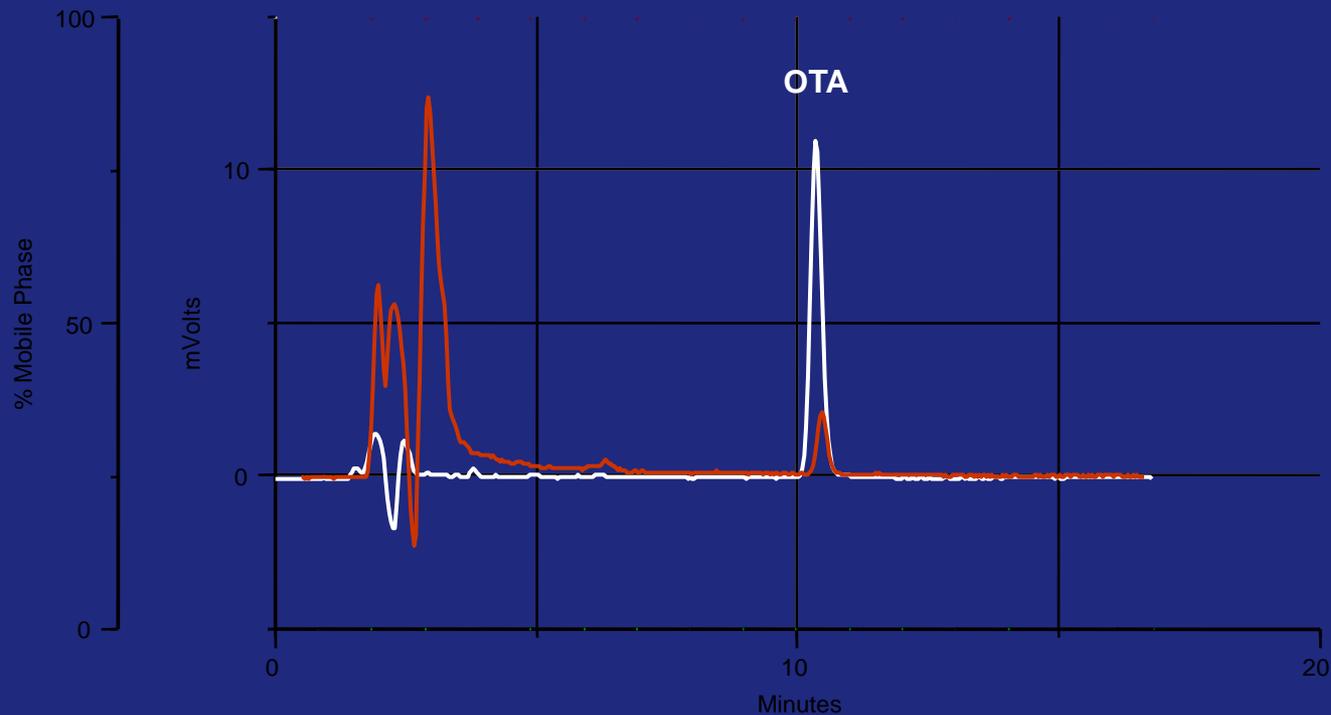


Valore fornito dal software di gestione dell'HPLC

$$W_{ota} = m_a \cdot 0.086$$

m_a = massa dell'OTA nell'aliquota di soluzione test campione iniettata; ng
0.086 = grammi equivalenti iniettati in colonna; g

CROMATOGRAMMI



Standard OTA 10 ng/mL

Campione naturalmente contaminato (~0.14 ng/mL)

DETERMINAZIONE DELL'OTA IN CAMPIONI DI LIQUIRIZIA IN POLVERE E IN PASTA

Metodo in corso di validazione



PROCEDURA ANALITICA- ESTRAZIONE



- ❖ Pesare 5.0 g di campione direttamente in blender
- ❖ Aggiungere 100 mL di solvente di estrazione (NaHCO_3 1%)
- ❖ Estrarre in blender ad alta velocità per 3 minuti
- ❖ Filtrare l'estratto su filtro di carta
- ❖ Diluire 15 mL di filtrato con 45 mL di PBS

PROCEDURA ANALITICA- PURIFICAZIONE



- o Passare nella colonna di immunoaffinità (IAC) 40 mL di estratto diluito ad una velocità di circa 5 mL/min (1-2 gocce/sec)
 - o Lavare la IAC con 20 mL di PBS
 - o Asciugare la IAC passando almeno 2 volumi di aria
-
- Eluire l'OTA con 1.5 mL di MeOH:Acido acetico glaciale 98:2 v/v (500+500+500 μ L) e 1.5 mL di H₂O
 - Agitare al vortex
 - Conservare il campione a 4°C fino al momento dell'analisi

ANALISI IN HPLC – Condizioni operative del sistema HPLC

- Flusso
1 mL/min
- Composizione della fase mobile
AcCN:MeOH:H₂O acidulata al 2% con acido acetico glaciale
35:25:40 v/v/v
- Temperatura fornetto colonna
40°C
- Rivelazione spettrofluorimetrica
 $\lambda_{\text{eccitazione}}=333 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{emissione}}=460 \text{ nm}$
- Volume di iniezione
100 μL
- Colonna cromatografica
C18 4.6x250 mm, 5 μm



CALCOLI METODO

$$m_A = \frac{\text{area} - a}{b}$$

m_A = ng di ocratossina A nella soluzione test analizzata (m_a)

Area = area del picco cromatografico

a = intercetta curva di calibrazione

B = pendenza della curva di calibrazione



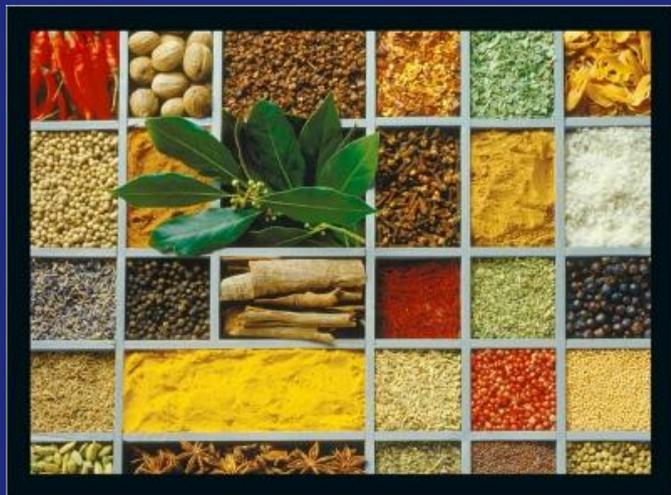
Valore fornito dal software di gestione dell'HPLC

$$W_{ota} = m_a \cdot 0.017$$

m_a = massa dell'OTA nell'aliquota di soluzione test campione iniettata; ng
0.017 = grammi equivalenti iniettati in colonna; g

DETERMINAZIONE DELL'OTA IN CAMPIONI DI PAPRICA

Metodo in corso di validazione (CRL)

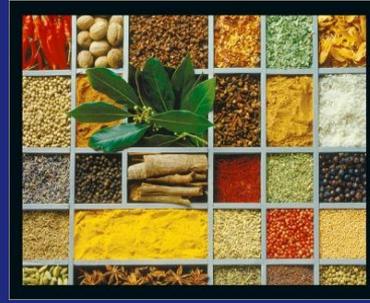


PROCEDURA ANALITICA- ESTRAZIONE



- ❖ Pesare 10.0 g di campione direttamente in blender
- ❖ Aggiungere 100 mL di solvente di estrazione (MeOH:soluzione 3% NaHCO₃ 50:50 v/v)
- ❖ Estrarre in blender ad alta velocità per 3 minuti
- ❖ Filtrare l'estratto su filtro di carta
- ❖ Centrifugare il filtrato per 10 min a 7500 rpm
- ❖ Diluire 12 mL di campione filtrato con 48 mL di PBS

PROCEDURA ANALITICA- PURIFICAZIONE



- o Passare nella colonna di immunoaffinità (IAC) 50 mL di estratto diluito ad una velocità di circa 5 mL/min (1-2 gocce/sec)
 - o Lavare la IAC con 15 mL di H₂O
 - o Asciugare la IAC passando almeno 2 volumi di aria
-
- Eluire l'OTA con 1.5 mL di metanolo (750+750 µL) direttamente in un matraccio da 5 mL
 - Portare a volume con H₂O
 - Agitare al vortex
 - Conservare il campione a 4°C fino al momento dell'analisi

ANALISI IN HPLC – Condizioni operative del sistema HPLC

- Flusso
0.8 mL/min
- Composizione della fase mobile
AcCN:MeOH:H₂O acidulata al 2% con acido acetico glaciale 25:45:30
- Temperatura fornetto colonna
40°C
- Rivelazione spettrofluorimetrica
 $\lambda_{\text{eccitazione}}=333 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{emissione}}=460 \text{ nm}$
- Volume di iniezione
150 μL
- Colonna cromatografica
C18 4.6x150 mm, 5 μm



CALCOLI METODO

$$m_A = \frac{\text{area} - a}{b}$$

m_A = ng di ocratossina A nella soluzione test analizzata (m_a)

Area = area del picco cromatografico

a = intercetta curva di calibrazione

B = pendenza della curva di calibrazione



Valore fornito dal software di gestione dell'HPLC

$$W_{ota} = m_a \cdot 0.03$$

m_a = massa dell'OTA nell'aliquota di soluzione test campione iniettata; ng

0.03 = grammi equivalenti iniettati in colonna; g

KIT ELISA COMMERCIALMENTE DISPONIBILI

FORNITORE	TEST KIT	RANGE DI QUANTIFICAZIONE	LR	TEMPO DI INCUBAZIONE
 	Ridascreen OTA	25-2025 ng/kg	625 ng/kg cereali e mangimi 25 birra	150 min
	Ridascreen OTA 30/15	50-1800 ng/kg	25 ng/kg cereali 50 ng/kg birra	45 min
	Ridascreen Fast OTA	5-40 µg/kg	5 µg/kg	15 min
	OTA wine kit	qualitativo	2 µg/kg vino, birra e liquori	15 min
	OTA grain kit	2-40 µg/kg	2 µg/kg	-
	AgraQuant OTA	2-40 µg/kg	2 µg/kg	15 min