

AFLATOSSINA M₁ (AFM₁) NEL LATTE

Metodo per HPLC

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile al latte liquido ed al latte in polvere.

2. Principio del metodo

Il metodo deriva dallo studio collaborativo condotto da Dragacci et al. (2001) (1) ed è stato sottoposto a studio di validazione interna prima del suo utilizzo. L'estrazione e la purificazione sono effettuate mediante colonnine di immunoaffinità contenenti un anticorpo monoclonale specifico per l'AFM₁. La quantificazione finale è ottenuta mediante HPLC in fase inversa con rivelatore a fluorescenza. Il limite di quantificazione è pari a 0.005 µg/l.

3. Reattivi

- 3.1 Acetonitrile
- 3.2 Acqua deionizzata
- 3.3 Colonna di immunoaffinità contenente anticorpi monoclonali specifici per l'AFM₁.
- 3.4 Soluzione fisiologica tamponata (PBS) pH = 7.3.
- 3.5 Fase mobile – acetonitrile (3.1) : acqua (3.2): (75:25).

4. Apparecchiatura

- 4.1 Bagno termostatico regolato a 37.0 °C ± 0.1°C.
- 4.2 Carta da filtro Whatman #4 e/o filtro in microfibra di vetro o equivalente.
- 4.3 Siringhe monouso da 10-50 ml o apparecchiatura da vuoto per estrazione in fase solida.
- 4.4 Pompa per cromatografo liquido ad alta risoluzione
- 4.5 Colonna cromatografica per HPLC - C₁₈ (250x4 mm, 5µ)
- 4.6 Rivelatore spettrofluorimetrico

5. Procedimento

- 5.1 Preparazione del campione. – **Latte liquido:** per evitare la separazione del materiale da saggio in due fasi, lo stesso deve essere scaldato a circa 37°C in bagno termostatico (4.1) per circa 5 minuti, ed agitato con ancorotta magnetica per sciogliere la fase lipidica. Si centrifuga a 3000 rpm (2000g) e, dopo aver eliminato il sottile strato superiore di grasso, si filtra su uno o più filtri (4.2), e si preleva un'aliquota da saggio (50 ml). **Latte in polvere:** si ricostituisce il latte in polvere con acqua calda (3.2) fino ad ottenere una soluzione al 10% (p/v). Dopo opportuna agitazione, si effettua una centrifugazione preliminare a 3000 rpm (2000g) per rimuovere la materia grassa e per facilitare il passaggio in colonnina di immunoaffinità. (3.3). Poi si procede come descritto per il latte liquido.
- 5.2 Preparazione della colonna ed estrazione. Collegare la colonnina (3.3) ad una siringa da 50 ml (4.3)* ed attivarla passando lentamente 10 ml di PBS (3.4). Applicare l'aliquota da saggio (50 ml o altro volume accuratamente misurato) mantenendo una velocità di flusso non superiore a 2-3 ml al minuto. Scartare gli eluati e lavare la colonnina (3.3) con 20 ml di acqua (3.2). Versare lentamente 0.5 – 1.0 ml di acetonitrile (3.1), lasciandolo a contatto con il gel per almeno 60 secondi, avendo cura di non mandare a secco la colonnina (3.3). Eluire l'AFM₁ con 3.0 - 3.5 ml di acetonitrile (3.2). Evaporare l'eluato sotto flusso di azoto e riprendere con 500 µl di fase mobile (3.5).

Nota

* Per non causare il danneggiamento della colonna, evitare di sollevare lo stantuffo con la colonna attaccata alla siringa. Utilizzare come alternativa una apparecchiatura da vuoto per estrazione in fase solida.

5.3 Determinazione cromatografica - Predisporre la pompa per HPLC (4.4) ad un flusso di 0.75-1.0 ml/min di fase mobile (3.5). Impostare il rivelatore a fluorescenza (4.6) a lunghezza d'onda di eccitazione = 360 nm e lunghezza d'onda di emissione = 440 nm. Iniettare nella colonna cromatografica (4.5), 200 µl delle soluzioni di calibrazione e dell'eluato ricostituito. Effettuare la verifica della linearità della risposta fluorimetrica mediante la costruzione della retta di regressione lineare ($y = ax + b$) ottenuta correlando le quantità (x_i) di soluzione standard di AFM₁ iniettate, espresse in ng, con le aree o le altezze proporzionali all'intensità di fluorescenza (y).

5.4 Preparazione delle soluzioni calibranti della Aflatossina M1

Calcolo della concentrazione della soluzione calibrante (calibrant solution)

Preparare una soluzione calibrante di aflatossina M₁ in cloroformio ad una concentrazione nominale di 10 µg/mL. Determinare la concentrazione della soluzione di calibrazione tramite lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di assorbimento massima calcolata nello spettro compreso tra 300nm e 400nm. Calcolare la concentrazione di massa (C, in µg/mL) usando la seguente equazione:

$$C = A * M / \epsilon * d * 100$$

Dove:

A è il valore della assorbanza a λ_{max}

M è il valore del peso molecolare della aflatossina M₁ (M = 328 g/mol)

ϵ è il valore del coefficiente di estinzione molare della aflatossina M₁ in cloroformio ($\epsilon = 1995 \text{ m}^2/\text{mol}$).

Conservare la soluzione calibrante a -20°C al buio. In queste condizioni, la soluzione è stabile per circa un anno.

Soluzione standard primaria (stock solution)

La soluzione standard primaria deve essere preparata secondo il seguente procedimento:

Trasferire 50 µl della soluzione calibrante in una fiala.

Evaporare la soluzione fino a secchezza usando un moderato flusso di azoto. Sciogliere il residuo in 500 µl di acetonitrile usando un agitatore Vortex o similare. La concentrazione della AFM₁ di questa soluzione sarà all'incirca pari ad 1 µg/mL.

Conservare la soluzione standard primaria in una fiala munita di tappo a chiusura ermetica e proteggere dalla luce, ad una temperatura inferiore ad 8 °C.

In queste condizioni, la soluzione è stabile per circa un mese.

Soluzioni standard di lavoro (working solution)

Preparare le soluzioni standard di lavoro nel giorno dell'uso.

Usare la soluzione standard primaria per preparare una serie di soluzioni standard di lavoro appropriate mediante diluizione in fase mobile. Le concentrazioni delle soluzioni standard di lavoro sono dipendenti dal volume del loop di iniezione. Si consiglia di preparare le soluzioni standard di lavoro in modo tale da iniettare quantità di AFM₁ comprese in un intervallo tra 0.05 ng ed 1 ng.

Espressione dei risultati

Calcolare dalla equazione della retta di regressione, il contenuto di AFM₁ nell'aliquota test e riportare il valore ottenuto al volume iniziale di latte applicato alla colonna di immunoaffinità. Per calcolare la concentrazione si può utilizzare la seguente equazione:

$$Cms = Xng * \left(\frac{Ve}{Vin} \right) * \left(\frac{1}{Vms} \right)$$

dove:

Cms = Concentrazione di AFM₁ nel materiale da saggio (ng/ml)

Xng = quantità espressa in ng corrispondente all'area od all'altezza del picco della AFM₁;

Ve = Volume finale dell'eluato dopo ricostituzione espresso in ml (0.5);

Vin = Volume dell'aliquota test iniettata espresso in ml (0.2);

Vms = Volume del materiale da saggio passato in colonnina, espresso in ml (50).

Usando i valori indicati nel metodo, la formula si riduce a

$$Cms = Xng * 0.05$$

Riferimenti bibliografici

(1) Dragacci, S., Grosso, F., Gilbert, J. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin M1 in liquid milk: collaborative study. Journal of AOAC International, 84, (2):437-443, 2001.