

DATI PRELIMINARI SULLA PRESENZA DI FUMONISINE IN FEGATO SUINO

PRELIMINARY DATA ON FUMONISINS PRESENCE IN PIG LIVER

Lugoboni B.¹, Gazzotti T.¹, Zironi E.¹, Barbarossa A.¹, Piva A.², Pagliuca G.¹

(¹) Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

(²) Dipartimento di Morfofisiologia Veterinaria e Produzioni Animali Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

SUMMARY

Mycotoxins are heterogeneous chemical compounds characterized by a low molecular weight and synthesized by the secondary metabolism of different molds.

Fumonisin are water-soluble mycotoxins produced by *Fusarium* species spoiling corn and derived products. These mycotoxins can enter the food chain also through the consumption of meat of exposed animals. Fumonisin and their metabolites have been associated with several animal and human diseases. They are suspected risk factors for esophageal and liver cancers, neural tube defects and cardiovascular problems.

Improved methods are needed to accurately assess fumonisin concentrations in food from vegetable and animal origin to prevent acute and chronic human exposure.

The aim of the present work was to develop a sensitive and selective method for quantification and unambiguous identification of fumonisin B1 (FB1), fumonisin B2 (FB2) and their complete hydrolyzed products (HFB1 and HFB2), in order to determine their presence in pig liver. Furthermore, the developed method was applied, in order to test its efficacy, on liver samples of weaned piglets fed a diet in compliance with the FB1 and FB2 contamination limits set by EU. All the samples showed the presence of at least one of the analytes. In particular FB1 was found in 5 out of 7 samples and the average level of contamination found was 28 ppb.

Key words

Fumonisin, pig liver, LC-MS/MS.

INTRODUZIONE

Le micotossine sono un gruppo eterogeneo di composti chimici caratterizzati da basso peso molecolare e sono prodotti secondari del metabolismo di differenti funghi. Le fumonisine, micotossine prodotte dai funghi della specie *Fusarium*, sono contaminanti naturali del mais (e dei prodotti da esso derivati) e rappresentano un problema per la sicurezza delle derrate alimentari in molte parti del mondo, tra cui Nord America, Sud Africa e vari Paesi Europei, inclusa l'Italia (1).

La FB1 rappresenta generalmente il 70-80 % delle fumonisine prodotte sui cereali, mentre la FB2 è presente in una percentuale del 15-25 %. Inoltre la FB1 è quella che presenta una maggior tossicità ed è stata correlata all'insorgenza di leucoencefalomacia nei cavalli, di edema polmonare nei suini e di cancro all'esofago nell'uomo. È stato inoltre dimo-

strato che svolge un'attività tossica nei confronti del sistema nervoso centrale, fegato, pancreas, rene e polmone in differenti specie animali. La FB1 è stata classificata dallo IARC come possibile cancerogeno (classe 2B) (2).

L'uomo può assumere fumonisine, oltre che dai cereali, anche consumando prodotti di origine animale, in cui la tossina sia presente a seguito del fenomeno del carry-over.

La possibile contaminazione da parte delle fumonisine di alimenti di origine animale, come latte, prodotti carnei e uova, non è da sottovalutare in virtù dell'enorme diffusione di questi contaminanti e del consumo di tali prodotti (3). Inoltre, sia negli alimenti di origine vegetale che in quelli di origine animale sono stati ritrovati metaboliti di tali molecole, derivanti da processi metabolici e di degradazione. Pochi sono i dati disponibili sulla tossicità dei prodotti idrolizzati, anche se per alcuni di questi è

stata ipotizzata una tossicità simile a quella della FB1 (4).

Numerose ricerche sono state svolte al fine di investigare e quantificare il fenomeno del carry-over nei prodotti carnei, evidenziando l'accumulo di FB1 in fegato, reni, polmoni e milza e di FB2 nel fegato e nel tessuto adiposo, nonché la presenza in tali tessuti, dei metaboliti e di FB1 parzialmente idrolizzata (5, 6, 7, 8).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di mettere a punto un metodo di analisi mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) rapido e sensibile per la contemporanea determinazione di FB1, FB2 e relativi metaboliti idrolizzati (HFB1 e HFB2). L'applicabilità del metodo è stata poi testata su alcuni campioni di fegato suino.

MATERIALI E METODI

Estrazione di FB1, FB2, HFB1 e HFB2 dal fegato

Tutti gli analiti sono stati isolati simultaneamente partendo da 1 g di fegato, in accordo con Paggiuca e collaboratori (2005) (9).

L'estrazione è stata effettuata con una miscela di metanolo:acqua = 80:20, seguita da un passaggio di centrifugazione e da due lavaggi con esano. Il campione è stato quindi purificato mediante un passaggio su cartuccia per estrazione in fase solida (SPE). L'eluato è stato analizzato mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS).

Analisi LC – MS/MS

Il sistema utilizzato per l'analisi LC-MS/MS era costituito da una pompa ternaria Waters Alliance 2695 abbinata ad uno spettrometro di massa triploquadrupolo Waters Quattro Premier XE. La separazione cromatografica è stata ottenuta utilizzando

come fase mobile acqua:acetonitrile = 90:10 con 0,3 % di acido formico (A) e acetonitrile con 0,3 % di acido formico (B) utilizzando una colonna Waters XTerra MS C₁₈ (5µm - 2,1 x 150 mm) con un flusso di 300 L/min, termostata a 35°C. L'eluizione degli analiti è stata ottenuta mediante un gradiente in cui, dopo i primi 4 min. di condizioni isocratiche (75 % A e 25 % B), la fase mobile veniva portata in 4 min. a 60 % A e 40 % B e mantenuta per altri 4 min. in queste concentrazioni. La modalità di ionizzazione utilizzata è stata elettrospray (ESI+) positivo. I parametri utilizzati per lo spettrometro di massa sono stati: voltaggio del capillare: 3,25 V; temperatura della sorgente: 140 °C; temperatura di desolvatazione: 400 °C.

È stata utilizzata la modalità di analisi MRM (multiple reaction monitoring) monitorando le transizioni riportate in Tabella 1.

La quantificazione degli analiti è stata ottenuta mediante l'utilizzo di standard interno (FB1 ¹³C₃₄) addizionato ai campioni prima dell'estrazione.

Validazione del metodo

Per validare il metodo messo a punto sono stati analizzati campioni di fegato bianco fortificati a tre concentrazioni (10-30-50 ppb) in 12 repliche eseguite in giorni diversi per valutare la linearità, l'accuratezza, la precisione e la sensibilità.

Campioni di fegato di maiale

La messa a punto e validazione della metodica è stata effettuata utilizzando il fegato di suini di razza mora romagnola provenienti da un'azienda agraria impostata e condotta secondo i principi dell'agricoltura biodinamica.

La metodica è stata quindi applicata all'analisi di 7 campioni di fegato di maiali allevati all'interno degli stabulari del Dipartimento di Morfofisiologia

Tabella 1: Transizioni e parametri MS/MS utilizzati per ciascun analita.

ANALITA	IONE PRECURSORE (m/z)	IONI PRODOTTO (m/z)		VOLTAGGIO DEL CONO (V)	ENERGIA DI COLLISIONE (V)
		Primario	Secondario		
FB ₁	722,15	334,10	352,10	50	40
FB ₁ ¹³ C ₃₄	756,45	356,34	374,28	50	40
HFB ₁	406,10	370,12	388,12	31	20
FB ₂	706,32	336,33	318,34	50	40
HFB ₂	390,15	372,24	354,24	29	20

Veterinaria e Produzioni Animali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna ed alimentati per 3 settimane con un mangime la cui concentrazione di fumonisine (espressa come somma di FB1 e FB2) era pari a 0,91 ppm e per le 4 settimane successive con uno contaminato con 2,34 ppm. Tali valori erano ampiamente al di sotto del limite di 5 ppm riportato nella Raccomandazione CE n.576/2006 (10).

RISULTATI

Il metodo messo a punto ha mostrato per tutti gli analiti in matrice una buona linearità della risposta strumentale ($0,95 < r^2 < 0,99$), un'ottima accuratezza (da -0,9 % a +0,2 %) e valori di deviazione standard relativa compresi tra 8 e 13 %. Il limite di quantificazione (LOQ) ed il limite di rilevazione (LOD) del metodo sono stati rispettivamente di 10 ppb e 0,05 ppb.

L'efficienza della metodica messa a punto è stata testata analizzando sette campioni di fegato di maiale. In tutti i campioni analizzati è stato possibile evidenziare la presenza, in tracce o in concentrazioni quantificabili, di almeno uno degli analiti presi in considerazione (vedi Tabella 2).

In particolare, la fumonisina B1 è stata quantificata in 5 dei 7 campioni analizzati in un range di concentrazioni comprese tra 15,76 e 42,52 ppb, mentre negli altri 2 è stata rilevata solo in tracce (concentrazioni inferiori al LOQ). La fumonisina B2 è stata invece rilevata in tracce in 5 dei 7 campioni analizzati.

Per quanto riguarda i prodotti di idrolisi, in un solo caso si sono riscontrati livelli quantificabili di HFB1, mentre in nessun altro campione è stato possibile evidenziare la presenza di HFB1 e HFB2 nemmeno in tracce.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

La procedura di preparazione del campione è risultata efficace anche con una matrice animale piuttosto complessa quale il fegato, consentendo il contemporaneo isolamento dei 4 analiti in esame. L'impiego della spettrometria di massa nell'analisi di fumonisine, oltre a fornire prestazioni eccellenti sia in termini di sensibilità che selettività, permette di ottenere una valida conferma dell'identificazione dell'analita, senza richiedere i delicati passaggi di derivatizzazione necessari per le analisi condotte con detector fluorimetrico (9).

I dati emersi dal presente studio evidenziano una contaminazione non trascurabile di FB1 in quasi tutti i campioni e risultano ancor più interessanti se confrontati con quelli ottenuti da precedenti lavori analoghi. Le concentrazioni medie di FB1 rilevate nel fegato di maiale da Meyer K. e collaboratori (2003) (8), si aggiravano attorno ai $231,0 \pm 163,0$ ppb e quelle riportate da Fodor J. e colleghi (2006) (5) erano in media di $99,4 \pm 37,5$ ppb. In questi due lavori gli animali sono stati tuttavia nutriti con diete contenenti un elevato livello di contaminazione da fumonisine: nel primo caso gli animali hanno assunto 100 mg di FB1 al giorno per 10 giorni, mentre nel secondo 50 mg di FB1 e 20 mg di FB2 per 20 giorni.

Nel presente lavoro, invece, gli animali sono stati alimentati con mangimi a bassa concentrazione di fumonisine e, considerando il consumo medio giornaliero di mangime (0,71 Kg al giorno), hanno sicuramente assunto dosi inferiori di fumonisine rispetto alle ricerche condotte precedentemente.

I dati presentati sono da considerarsi preliminari e non essendo statisticamente significativi, necessitano di conferma con analisi di un più cospicuo

Tabella 2: Dati ottenuti dall'analisi dei campioni di fegato di maiale.

CAMPIONE	CONCENTRAZIONE ANALITI (ppb)			
	FB ₁	HFB ₁	FB ₂	HFB ₂
Fegato 1	22,05	-	-	-
Fegato 2	15,76	-	Tracce	-
Fegato 3	42,52	-	Tracce	-
Fegato 4	35,61	-	Tracce	-
Fegato 5	Tracce	-	Tracce	-
Fegato 6	24,15	-	Tracce	-
Fegato 7	Tracce	17,36	-	-

numero di campioni. Tali dati, tuttavia, mettono in luce una possibile persistenza di fumonisine e derivati nei prodotti carnei suini, anche se provenienti da animali alimentati con mangimi il cui livello di contaminazione da fumonisine risulta inferiore al limite di 5 ppm imposto dalla legge (10).

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la Fondazione Cassa di Risparmio in Bologna per il contributo economico concesso per l'acquisto dello spettrometro di massa.

BIBLIOGRAFIA

- 1) SCF (Scientific Committee on Food) (2000): "Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins part 3: fumonisin B₁ (FB₁)". SCF/CS/CNTM/MYC/ 24 FINAL. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out73_en.pdf Last access: 14 aprile 2009.
- 2) World Health Organization - International Agency For Research On Cancer (IARC) Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 56: Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Summary of data reported and evaluation. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/volume56.pdf> Last access: 14 aprile 2009.
- 3) Yiannikouris A., Jouany J. P. (2002): "Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review". *Animal Research*, 51: 81-99.
- 4) Caloni F., Spotti M., Pompa G., Zucco F., Stammati A., De Angelis I. (2002): "Evaluation of Fumonisin B(1) and its metabolites absorption and toxicity on intestinal cells line Caco-2". *Toxico: official journal of the International Society on Toxinology*, 40 (8): 1181-1188.
- 5) Fodor J., Meyer K., Riedlberger M., Bauer J., Horn P., Kovacs F., Kovacs M. (2006): "Distribution and elimination of fumonisin analogues in weaned piglets after oral administration of *Fusarium verticillioides* fungal culture". *Food Additives and Contaminants*, 23 (5): 492-501.
- 6) Fodor J., Balogh K., Weber M., Mezes M., Kametler L., Posa R., Mamet R., Bauer J., Horn P., Kovacs F., Kovacs M. (2008): "Absorption, distribution and elimination of fumonisin B₁ metabolites in weaned piglets". *Food Additives and Contaminants*, 25 (1): 88-96.
- 7) Fodor J., Bauer J., Horn P., Kovacs F., Kovacs M. (2008): "Effects of different dietary fumonisin B₁ exposure on the toxin content of porcine tissues". *Italian Journal of Animal Science*, 4 (3): 73-78.
- 8) Meyer K., Mohor K., Bauer J., Horn P., Kovacs M. (2003): "Residue formation of fumonisin B1 in porcine tissues". *Food Additives and Contaminants*, 20 (7): 639-647.
- 9) Pagliuca G., Zironi E., Ceccolini A., Matera R., Serazanetti G. P., Piva A. (2005): "Simple method for the simultaneous isolation and determination of fumonisin B₁ and its metabolite aminopentol-1 in swine liver by liquid chromatography-fluorescence detection". *Journal of Chromatography B*, 819 (1): 97-103.
- 10) Raccomandazione CE n. 576/2006 della Commissione del 17 agosto 2006 sulla presenza di deossinivalenolo, zearalenone, ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 23 agosto 2006, L 229/7.