

# DETERMINAZIONE DI FUMONISINA B1 IN LATTE MEDIANTE LC-MS/MS

## ***DETERMINATION OF FUMONIS FB1 IN MILK BY LC-MS/MS***

Gazzotti T., Lugoboni B., Zironi E., Barbarossa A., Giacometti F., Serraino A., Pagliuca G.  
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale 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 is a water-soluble mycotoxin produced by *Fusarium* species spoiling corn and derived products. These mycotoxins can reach the human also indirectly through the consumption of food products derived from animals fed with contaminated feed. Fumonisin has 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 identification and quantification of fumonisin B1 (FB1) in milk. FB1 was isolated from milk, by a single step immunoaffinity column and was detected using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry in positive electrospray ionization (ESI+). The analysis was carried out in multiple reaction monitoring (MRM) mode using the two main product ions.

The good performances of the proposed method can assure a correct fumonisin detection in milk even at relatively low concentrations.

### **Key words**

*Fumonisin B1, milk, residues, LC-MS/MS.*

### **INTRODUZIONE**

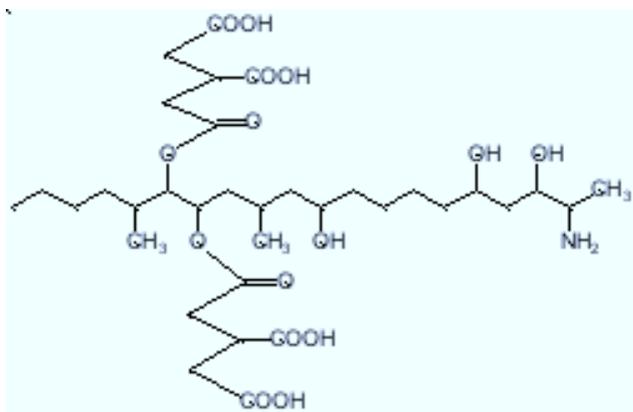
Le fumonisine, un gruppo omogeneo di micotossine di recente scoperta, sono metaboliti secondari prodotti principalmente dai funghi *Fusarium moniliforme* e, in misura minore, da *Fusarium proliferatum*. La fumonisin B1 (FB1) è quella prodotta in quantità maggiore e con una più elevata tossicità. La FB1 è stata correlata all'insorgenza di leucoencefalomalacia nei cavalli, di edema polmonare nei suini e di cancro all'esofago nell'uomo. È stato inoltre dimostrato che svolge un'attività tossica nei confronti del sistema nervoso centrale, fegato, pancreas, rene e polmone in differenti specie di animali. La FB1 è stata classificata dallo IARC come possibile cancerogeno (classe 2B) (12). Il principale meccanismo d'azione associato alla tossicità delle fumonisine sembra essere correlato all'inibizione dell'enzima ceramide sintetasi, provocando squilibri nel metabolismo delle basi

sfingoidi. Infatti il rapporto tra sfinganina e sfingosina libera si è dimostrato il biomarker più indicativo di un'avvenuta esposizione alla tossina. (5, 6, 9).

Numerosi lavori hanno evidenziato un'elevata concentrazione dell'ordine dei ppm di fumonisine nel mais e nei mangimi per uso zootecnico a base di mais. È stato inoltre dimostrato che la FB1 viene scarsamente metabolizzata dalla microflora del ruminante e dai microsomi del fegato e che i ruminanti sono relativamente tolleranti alla FB1, contrariamente ad altre specie animali. In accordo con alcuni studi un passaggio di fumonisine nel latte, anche se basso, sembra possibile (10).

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 determinazione di FB1 in latte vaccino destinato all'alimentazione umana.

Figura 1: Struttura della fumonisina B1



## MATERIALI E METODI

### Estrazione della FB1 dal latte

Dopo aver centrifugato 10 g di latte a 6.000 rpm per 15 min. a 4 °C, 5 mL di latte sgrassato sono stati prelevati e diluiti con 5 mL di acqua. I 10 mL ottenuti sono stati purificati caricandoli su una cartuccia di immunoaffinità Vicam FumoniTest™. Dopo aver lavato la cartuccia con 20 mL di soluzione tampone PBS, la FB1 è stata eluita con 1,5 mL di metanolo e poi con 1,5 mL di acqua. Dopo aver concentrato sotto flusso d'azoto, il volume della soluzione è stato riportato ad 1 mL con acqua. 10 mL dell'estratto sono stati iniettati nel sistema LC – MS/MS.

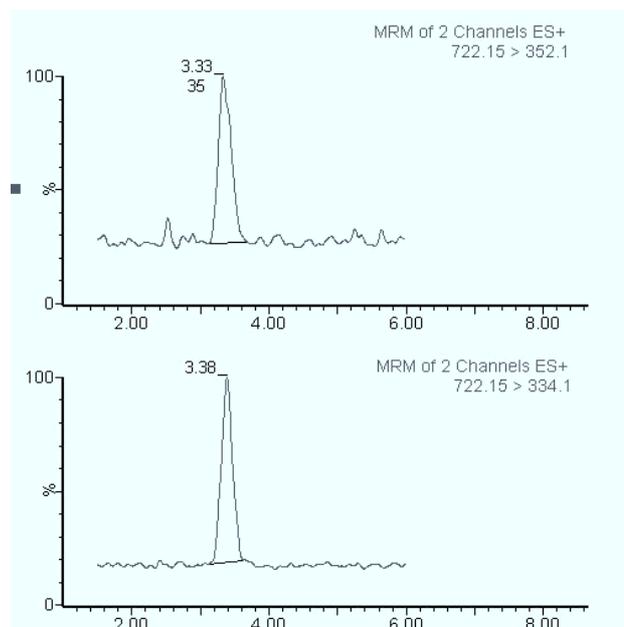
### Analisi LC – MS/MS

Il sistema utilizzato per l'analisi LC- MS/MS era costituito da una pompa ternaria Waters Alliance 2695 abbinata ad uno spettrometro di massa triplo-quadrupolo 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 C<sub>18</sub> (5µm - 2,1 x 150 mm) con un flusso di 300 mL/min, termostata a 35°C. L'analisi è stata ottenuta in condizioni isocratiche (75% A e 25% B) per i primi 5,50 min., mentre per eluire eventuali analiti rimasti in colonna, la fase mobile è stata portata a 20% A e 80% B per 2 min.

La modalità di ionizzazione era elettrospray (ESI) positivo. I parametri per lo spettrometro di massa utilizzati erano: voltaggio del capillare 3,25 V, voltaggio del cono 50 V, temperatura della sorgente 140 °C, temperatura di desolvatazione 400 °C ed energia di collisione 40 V.

La modalità di analisi utilizzata era MRM (multiple reaction monitoring) utilizzando le seguenti transizioni precursore > prodotto: 722,15 > 334,10 m/z e 722,15 > 352,10 m/z.

Figura 2: Cromatogramma LC-ESI-MS/MS di un latte fortificato a 0,1 ppb.



### Validazione del metodo

Per validare il metodo messo a punto sono stati analizzati campioni di latte fortificati a cinque concentrazioni (0 - 0,1 - 0,5 - 1 - 10 ppb) in quattro repliche eseguite in giorni diversi per valutare l'accuratezza, la precisione e la sensibilità.

## RISULTATI

Il metodo messo a punto ha mostrato una buona linearità della risposta strumentale ( $r^2 = 0,99$ ) ed un recupero medio del 85% con una deviazione standard relativa media del 7 %. Il limite di quantificazione (LOQ) ed il limite di rilevazione (LOD) del metodo sono stati rispettivamente di 0,1 ppb e 0,003 ppb.

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Nell'ultimo decennio di studi è emerso che l'importanza delle fumonisine è secondaria solo a quella

delle aflatossine. Nonostante ciò l'interesse della comunità scientifica nei riguardi della contaminazione da fumonisine negli alimenti di origine animale è piuttosto limitato. Per quanto riguarda il latte solo l'aflatossina M1 (AFM1) è regolamentata con un limite di 50 ppt. Non esistono invece limiti di legge per la FB1, nonostante sia stata classificata dalla IARC nella stessa classe di cancerogenicità.

Inoltre non è da sottovalutare la possibilità di interazioni tossicologiche con effetti sinergici tra le diverse micotossine contemporaneamente presenti in un alimento (1).

I pochi lavori che hanno valutato la presenza di FB1 nel latte non sono molto recenti; alcuni riportano la possibilità del passaggio di tale sostanza e quindi una possibile contaminazione nel latte (2, 3, 11), altri non hanno evidenziato alcun campione positivo (4, 8). È da sottolineare che tutti i metodi impiegati in questi studi avevano un LOQ tra 1 e 50 ppb (2, 3, 4, 7, 8, 11), l'unico lavoro recente (10), con un livello di quantificazione decisamente più basso (0,2 ppb), non riporta dati statisticamente significativi sulla possibile presenza di FB1 nel latte.

Il metodo proposto, grazie alla semplicità della fase di preparazione del campione, abbinata alla sensibilità e alla specificità della spettrometria di massa, consente in breve tempo di dosare la FB1 nel latte anche in piccole concentrazioni (0,1 ppb), fornendo inoltre la possibilità di identificare in maniera non ambigua la tossina.

Questo metodo è attualmente in uso per l'analisi di campioni commerciali di latte: i primi dati ottenuti, anche se preliminari e non significativi dal punto di vista statistico, hanno evidenziato una presenza di FB1 in alcuni campioni.

## RINGRAZIAMENTI

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

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Gelderblom W.C.A., Marasas W.F.O., Lebepe-Mazur S., Swanevelder S., Vessey C.J., de la M Hall P. (2002). Interaction of fumonisin B1 and aflatoxin B1 in a short-term carcinogenesis model in rat liver. *Toxicology*, 171, 161-173
- 2) Hammer P., Blüthgen A., Walte H.G. (1996). Carry over of fumonisin B<sub>1</sub> into the milk of lactating cows. *Milchwissenschaft*, 51 (12), 691-695.
- 3) Maragos C.H., Richard J.L. (1994). Quantitation and stability of fumonisin B1 and B2 in milk. *Journal of AOAC International*, 77 (5), 1162-1167
- 4) Richard J.L., Meerdink G., Maragos C.M., Tumbleson M., Bordson G., Rice L.G. Ross P.F. (1996). Absence of detectable fumonisins in the milk of cows fed *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg culture material". *Mycopathologia*, 133, pag.123-126.
- 5) Riley R.T., An N.H., Showker J.L., Yoo H.S., Norred W.P., Chamberlain W.J., Wang E., Merrill A.H. Jr., Motelin G., Beasley V.R., Haschek W.M. (1993). Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: an early biomarker of exposure to fumonisin-containing feeds in pigs. *Toxicology Applications in Pharmacology*, 118, 105-112.
- 6) Riley R.T., Wang E., Schroeder J.J., Smith E.R., Platner R.D., Abbas H., Yoo H.S., Merrill A.H. Jr. (1996). Evidence for disruption of sphingolipid metabolism as a contributing factor in the toxicity and carcinogenicity of fumonisins. *Natural Toxins*, 4, 3-15.
- 7) Scarano G., Grasso L., Arace O., Oliviero G., Serpe L. (2001) Rivelazione della fumonisin B1 nel latte con strumenti semiautomatici. *Industria alimentare*, XL (marzo), 257-260.
- 8) Scott P.M., Delgado T., Prelusky D.B., Trenholm H.L., Miller J.D. (1994). Determination of fumonisins in milk. *Journal of Environmental Science and Health*, 29 (5), pag.989-998.
- 9) Solfrizzo M., Avantaggiato G., Visconti A. (1997). Rapid method to determine sphinganine/sphingosine in human and animal urine as a biomarker for fumonisin exposure. *Journal of Chromatographic Biomedical Applications*, 692, 87-93.
- 10) Sørensen L.K., Elbæk T.H. (2005) Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B*, 820, 183-196.
- 11) Spotti M., Caloni F., Fracchiolla L., Pompa G., Vigo D., Maffeo G. (2001). Fumonisin B<sub>1</sub> carry-over into milk in the isolated perfused bovine udder. *Veterinary and Human Toxicology*, 43 (2), 109-111.
- 12) 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 food.  
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/volume56.pdf> 02/22/08