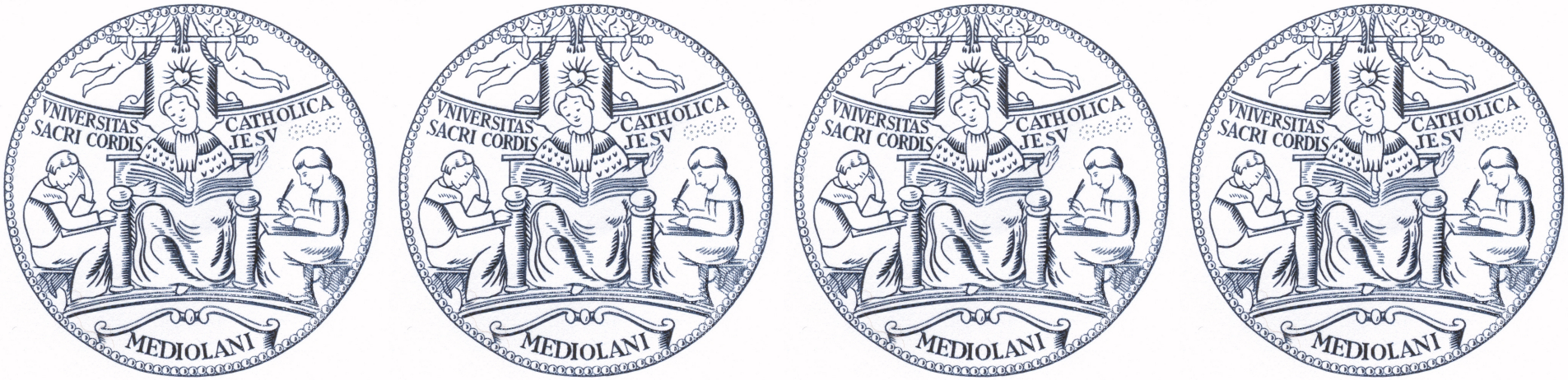
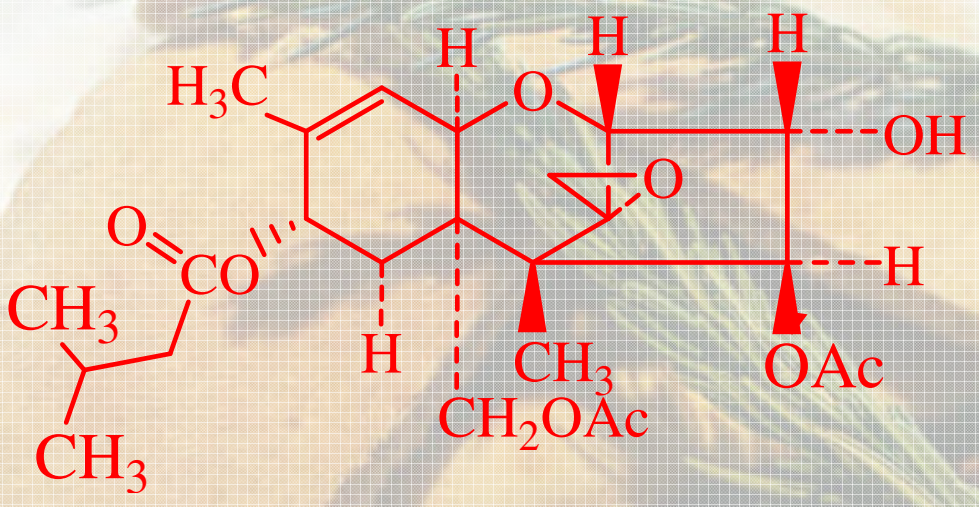
# ANALISI DEI TRICOTECENI E INCERTEZZA DEI DATI

**Amedeo Pietri**
**Istituto di Scienze degli alimenti e della nutrizione**
**Facoltà di Agraria UCSC - Piacenza**



# *TRICOTECENI*



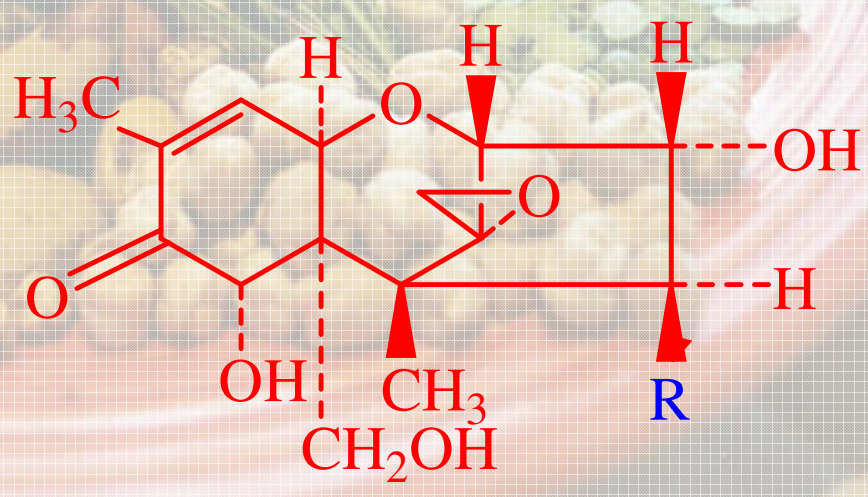

***TIPO A***

***TOSSINA T-2***

***TIPO B***

***R=OH NIVALENOLO***

***R=H DEOSSINIVALENOLO***



# METODI PER L'ANALISI DELLE MICOTOSSINE

**Chimico-fisici**

- **metodi cromatografici (TLC, HPLC, HPLC-MS, GLC, GLC-MS)**

**Immunoenzimatici**

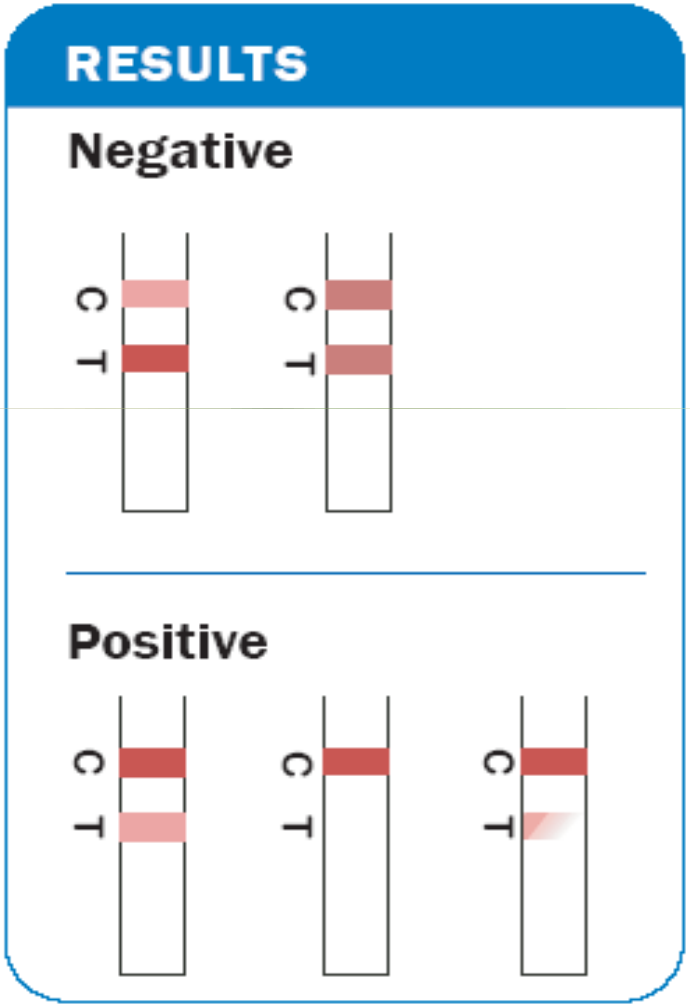
- **ELISA**
- **STRIPS**
- **Col. di immunoaffinità (IAC)**

# MICOTOSSINE
# RIVELAZIONE/QUANTIFICAZIONE

**Che tipo di risultato vuoi?**

- Immediato (5-20 min)
- Rapido (30-120 min)
- Non-urgente (entro 24 h o alcuni giorni)

# STRIP TEST

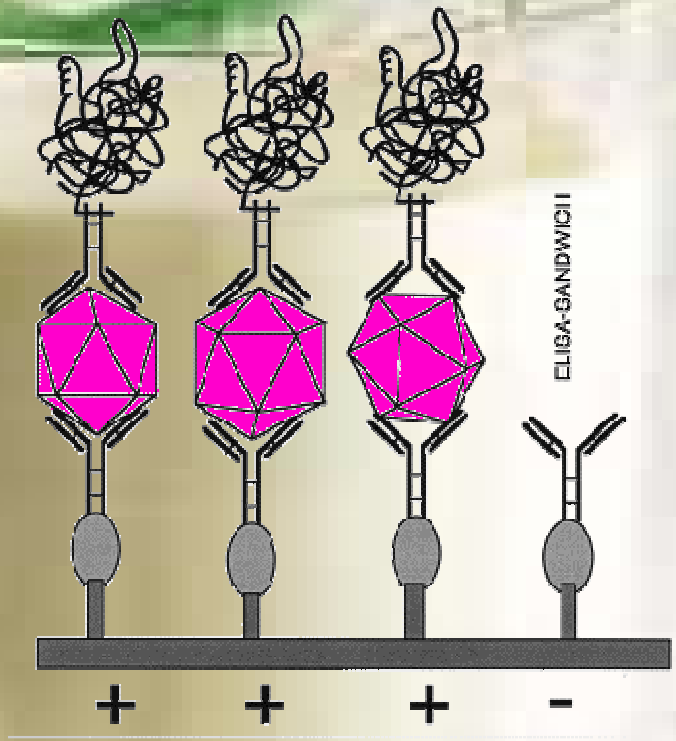


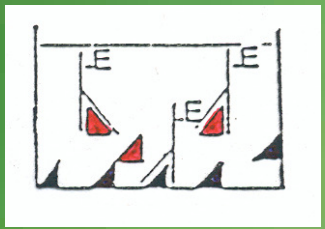
**The developed test strip can be read in a Reader**

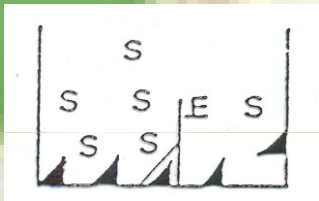
DETERMINAZIONE

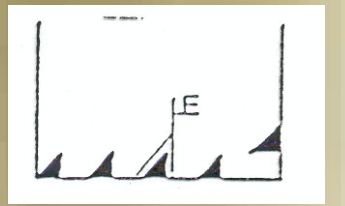
# ELISA

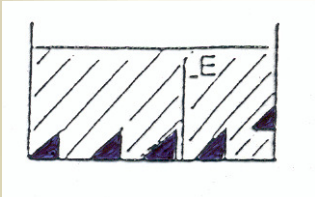
- ✓ Non richiedono la purificazione del campione
  - Veloce
  - Possibili interferenze
- ✓ Antigene - Anticorpo

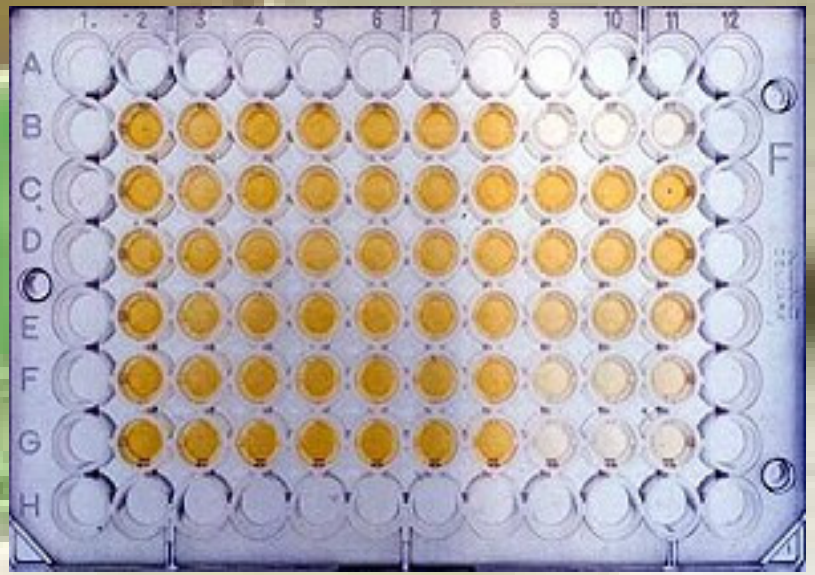



E
E
E


S
S
S
E
S
S
S


E

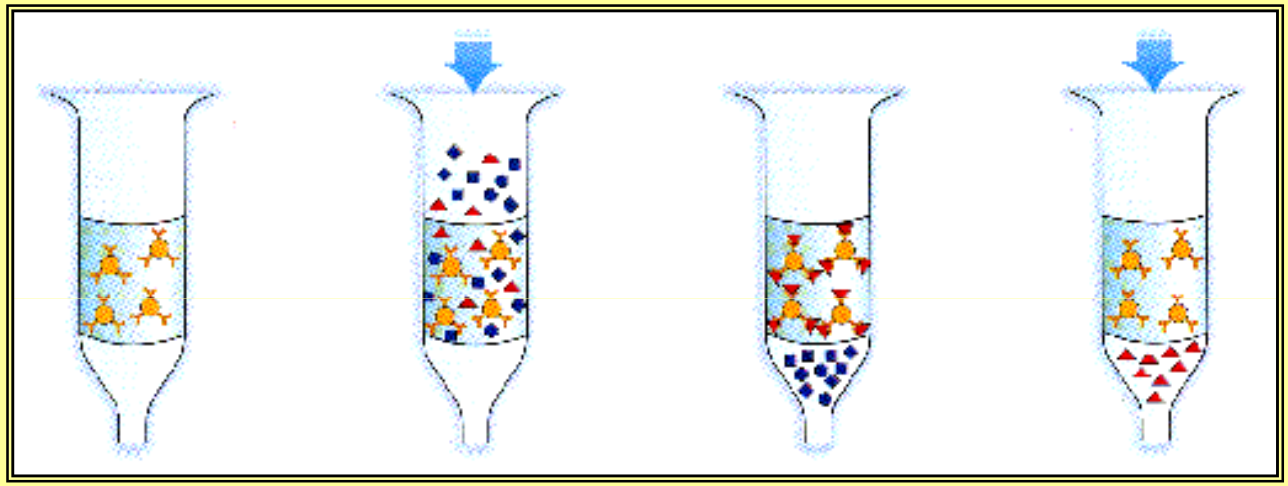

E


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
A
B
C
D
E
F
G
H
F

PURIFICAZIONE

# COLONNE IMMUNOAFFINITÀ

## Principio di azione



Anticorpo

Micotossina

Altri composti / Matrice

DETERMINAZIONE

# CROMATOGRAFIA LIQUIDA

## CON RIVELAZIONE FLUORIMETRICA

**MOLECOLE FLUORESCENTI**

Ocratossina, Zearalenone, Aflatossina M1

**MOLECOLE DERIVATIZZABILI**

Aflatossine, Fumonisine (OPA), Tricoteceni (?)

## CON RIVELAZIONE UV

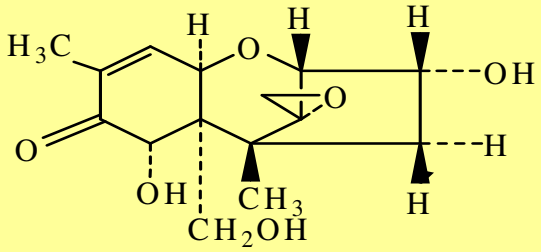
Deossinivalenolo

DETERMINAZIONE

# CROMATOGRAFIA (GLC o HPLC) ABBINATA ALLA SPETTOMETRIA DI MASSA (GLC/MS o HPLC/MS)

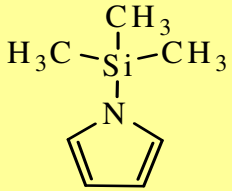
**MOLECOLE**

- Fumonisine (HPLC/MS)
- Ocratossina (HPLC/MS)
- Tricoteceni (GLC/MS o HPLC/MS)

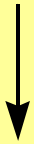


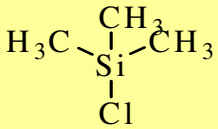
DEOSSI-NIVALENOLO

+

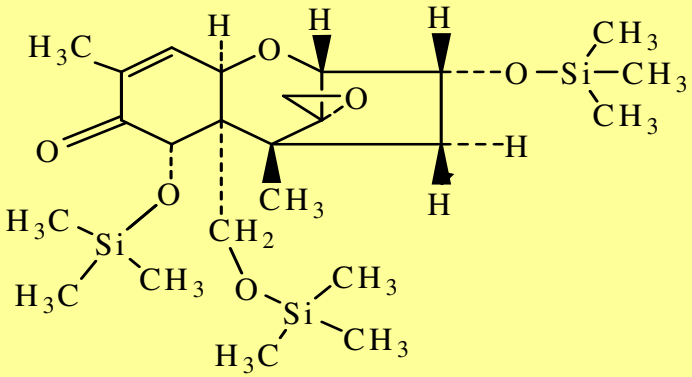


TRIMETILSILILIMIDAZOLO



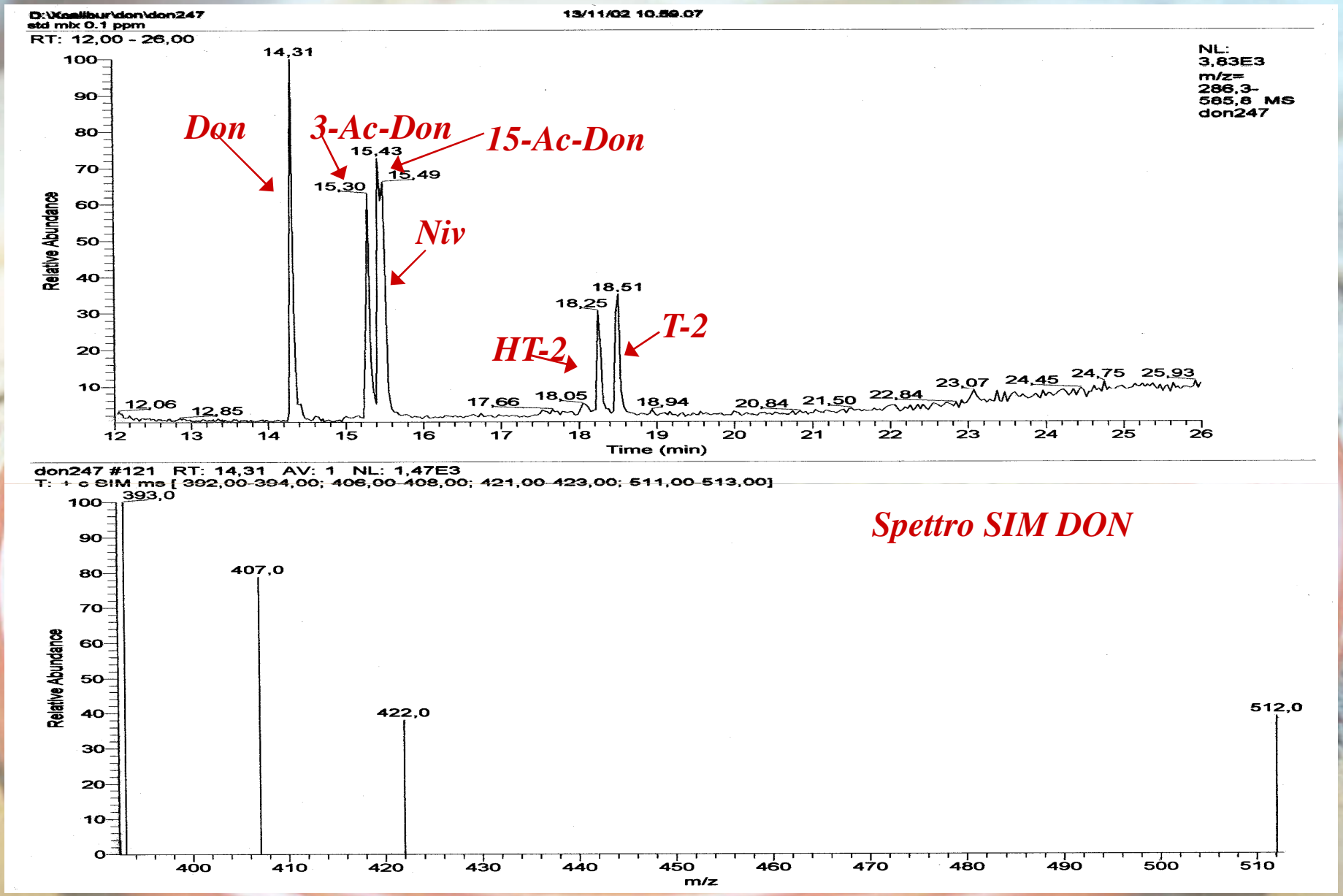


TRIMETILCLOROSILANO

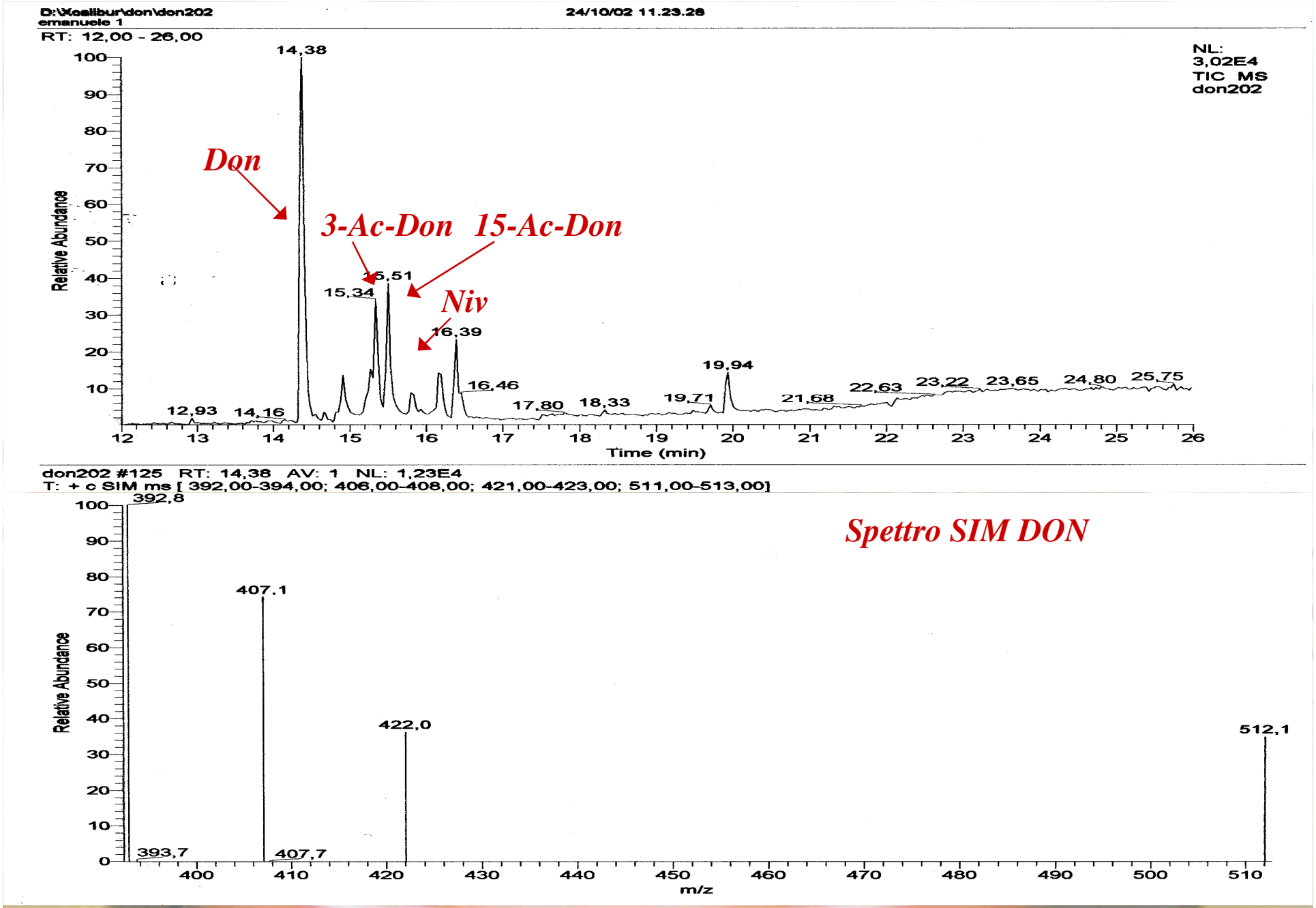


TRIMETILSILILETERI-DON

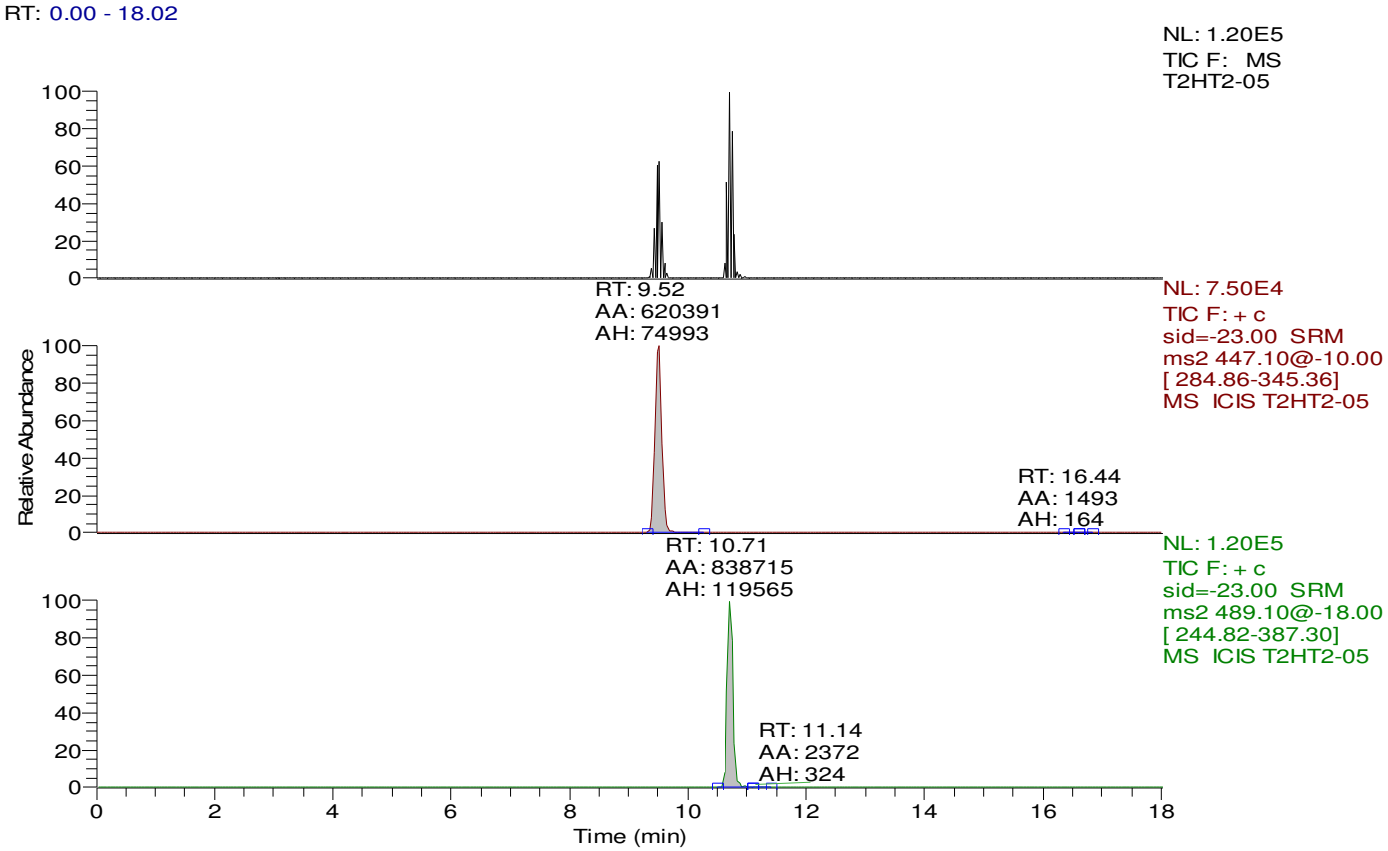
# Derivatizzazione DON con N-trimetisililimidazolo

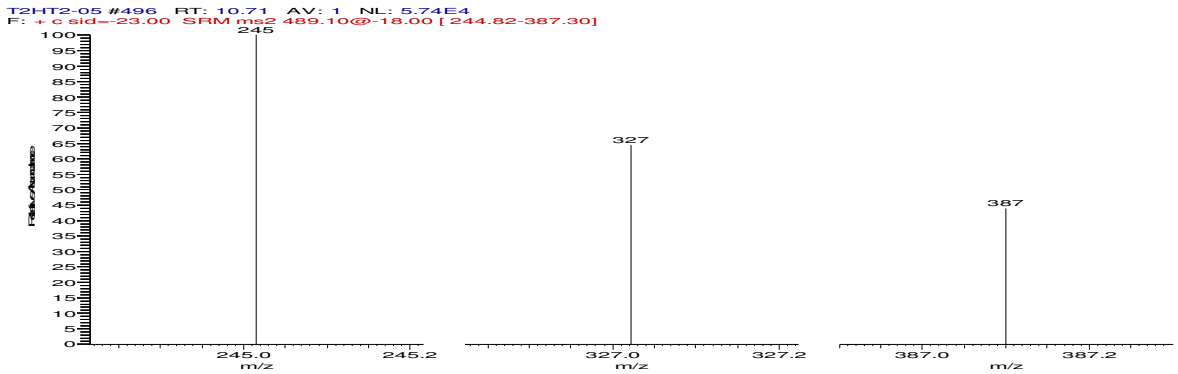



# Analisi GLC-MS - Standard tricoteceni




# Analisi tricoteceni (GLC-MS) - Campione mais




# *Analisi HPLC-MS/MS di tossina T-2 e HT-2*

# REGOLAMENTO CE N. 401/2006

**Se a livello comunitario non è previsto alcun metodo specifico… i laboratori sono liberi di applicare un metodo di loro scelta, a condizione che esso rispetti i criteri seguenti:**

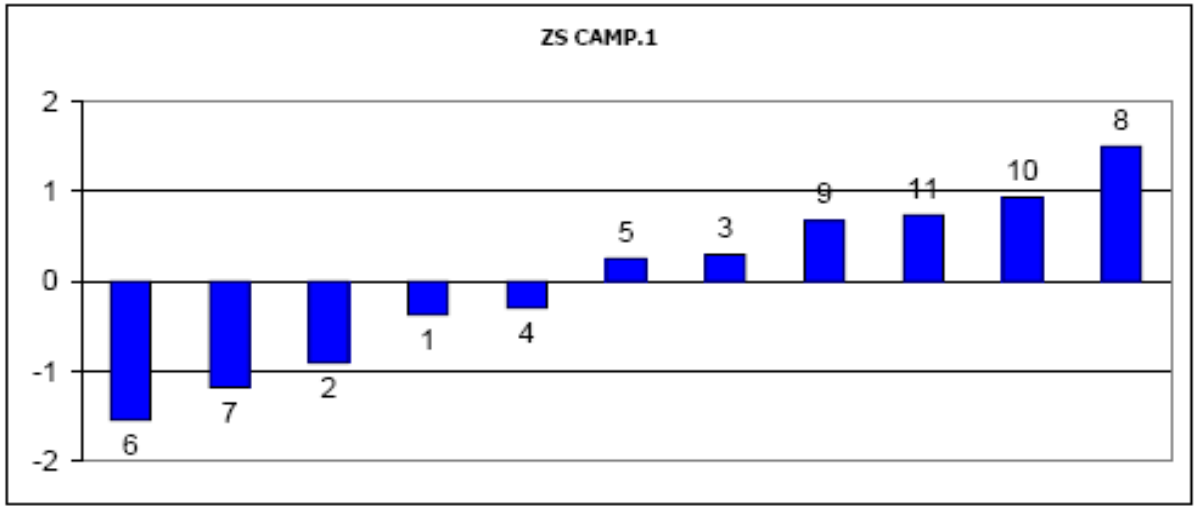
- **d) Criteri di rendimento per il DON**

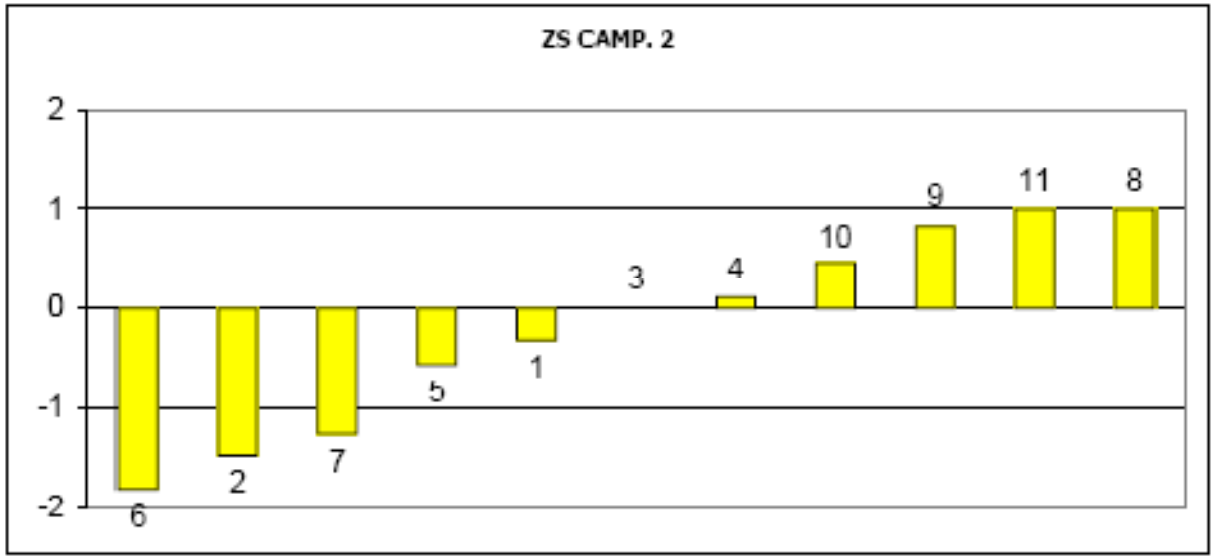
| Tenore(µg/kg) | $RSD_r$% | $RSD_R$% | Recupero % |
|---|---|---|---|
| >100- ≤500 | ≤20 | ≤40 | 60-110 |
| > 500 | ≤20 | ≤40 | 70-120 |

# CONFRONTO TRA RISULTATI HPLC E ELISA (Circuito AIA)

## Analisi del DON (µg/kg) su 2 campioni

| Camp. | Media | Intervallo | $RSD_R$ % |
|---|---|---|---|
| 1 HPLC (11) | 758 | 365-1147 | 34,01 |
| 1 ELISA (7) | 1467 | 890-1875 | 29,07 |
| 2 HPLC (11) | 1153 | 404-1700 | 40,22 |
| 2 ELISA (7) | 2285 | 946-3240 | 37,58 |


ZS CAMP.1
2
1
0
-1
-2
6
7
2
1
4
5
3
9
11
10
8


ZS CAMP. 2
2
1
0
-1
-2
6
2
7
5
1
3
4
10
9
11
8

# REGOLAMENTO CE N. 401/2006

- **B.6. Accettazione di una partita o sottopartita**
- Accettazione, se il campione di laboratorio non supera il limite massimo, tenendo conto dell'incertezza della misura e della correzione per il recupero.
- Rifiuto, se il campione di laboratorio supera il limite massimo oltre ogni ragionevole dubbio, tenendo conto dell'incertezza della misura e della correzione per il recupero.

# REGOLAMENTO CE N. 401/2006

- **Note relative ai criteri di rendimento per le micotossine**

- **I valori di precisione sono calcolati dall'equazione di Horwitz**

$$RSD_R = 2^{(1-0.5\log C)}$$

**$RSD_R$ è la dev. std relativa**

**C è il tasso di concentrazione (0.001 = 1000 mg/kg)**

# COME ESPRIMERE UN RISULTATO DI ANALISI

- **Un risultato va espresso nella forma:**

$$a \pm 2u \qquad \text{oppure} \qquad a \pm U$$

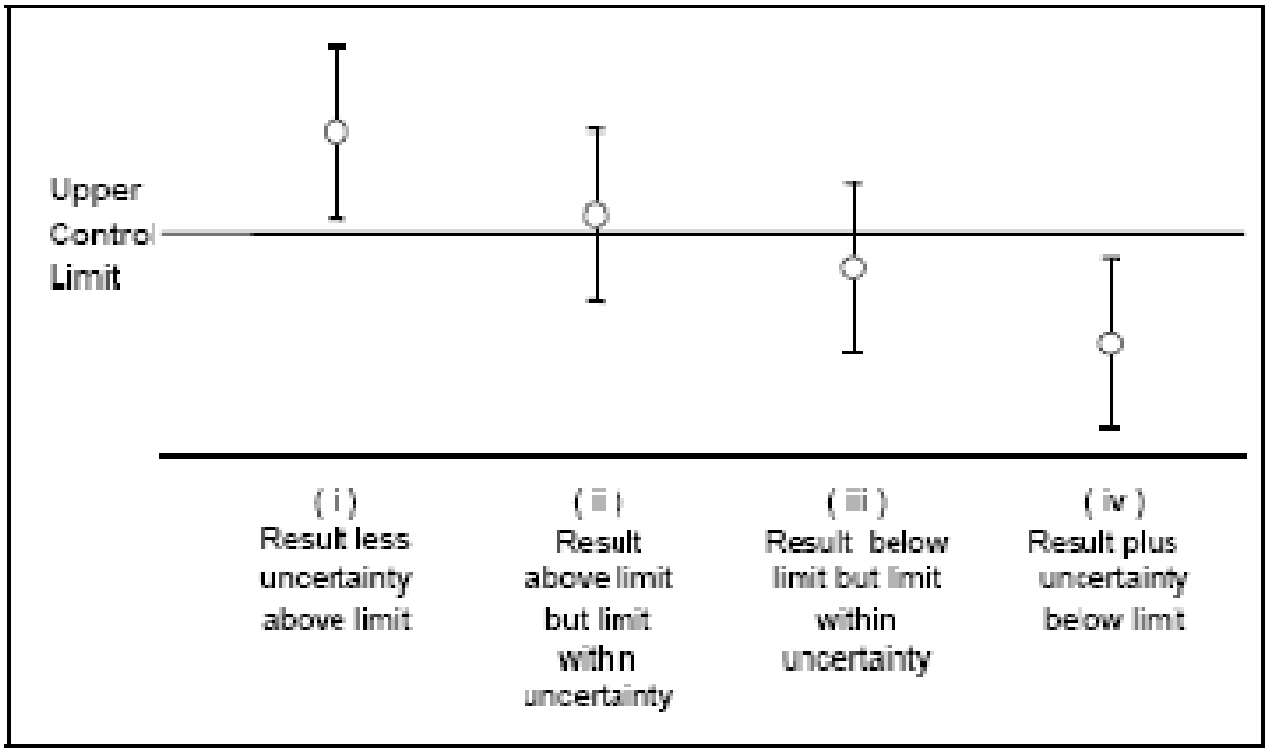
**Dove:**

**a = è la miglior stima del valore vero (risultato dell'analisi corretto per il recupero)**

**u = è l'incertezza standard ($RSD_R$ dell'equaz. di Horwitz)**

**U = è l'incertezza espansa**

# ESEMPIO
# Analisi DON (µg/kg)

| Risultato±incertezza | Intervallo |
|---|---|
| 1000±320 | 680 - 1320 |
| 1200±384 | 816 - 1584 |
| 1400±448 | 952 - 1848 |
| 1600±477 | 1123 - 2077 |
| 1750±515 | 1235 - 2265 |
| 2000±577 | 1423 - 2577 |
| 2500±697 | 1803 - 3197 |

# ACCETTAZIONE O RIFIUTO DI UNA PARTITA IN BASE AL RISULTATO DELL'ANALISI, TENENDO CONTO DELL'INCERTEZZA DELLA MISURA