

# L'ANALISI DELLA CITRININA IN INTEGRATORI ALIMENTARI

LA CITRININA È UNA MICOTOSSINA CHE PUÒ SVILUPParsi IN INTEGRATORI ALIMENTARI A BASE DI RISO ROSSO FERMENTATO. UNA METODICA ANALITICA UPLC-MS/MS PER LA DETERMINAZIONE DELLA CITRININA È STATA SVILUPPATA E VALIDATA DA ARPA PUGLIA AL FINE DI RISPONDERE AI PIANI DI CONTROLLO UFFICIALI PREVISTI DAL MINISTERO DELLA SALUTE.

**L'**ipercolesterolemia risulta essere molto diffusa tra la popolazione europea e le statine sono il trattamento terapeutico più comune per tale patologia. Tuttavia le statine sono responsabili di diversi effetti indesiderati. Un'alternativa comune alla terapia nel trattamento del colesterolo alto è rappresentata dall'uso di integratori alimentari a base di riso rosso fermentato. Questo riso è prodotto dalla fermentazione del riso bianco per opera del lievito *Monascus Purpureus* e il processo di fermentazione produce la *monacolina K*, che ha azione ipolipidizzante.

Storicamente il riso rosso fermentato è usato sia nella cucina cinese, come colorante e conservante alimentare, sia nella medicina tradizionale cinese, come aiuto per ridurre i livelli di colesterolo. Integratori alimentari contenenti riso rosso fermentato sono disponibili in varie formulazioni quali capsule o compresse (figura 1). Tuttavia, il riso rosso fermentato è facilmente esposto alla contaminazione di una micotossina: la citrinina (CIT) (figura 2). La CIT è una molecola con struttura planare coniugata che le conferisce una naturale capacità di fluorescenza. È una sostanza nefrotossica e cancerogena e, a causa dei rischi per la salute umana provocati dall'assunzione di tale micotossina, l'Unione europea ha stabilito un limite massimo (ML) di 2000 µg/kg di CIT negli integratori alimentari a base di riso rosso fermentato.

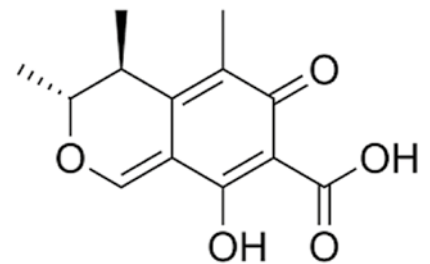


1

Dal 2014 la ricerca della CIT è prevista, per questo tipo di integratori, nei piani di controllo dei contaminanti a tutela della salute dei consumatori.

## Metodo analitico e validazione

Il Laboratorio chimico del Polo di specializzazione Alimenti dell'Arpa Puglia di Bari è la struttura di riferimento regionale per il controllo ufficiale degli alimenti di origine non animale. Nell'ambito del controllo dei residui di prodotti fitosanitari il laboratorio ha maturato una specifica esperienza analitica e si avvale, da diversi anni, di strumentazione di elevato livello tecnologico come la spettrometria di massa ad alta risoluzione. Utilizzando tale tecnica di analisi è stato recentemente sviluppato, validato e accreditato un metodo analitico per determinare la CIT negli integratori alimentari a base di riso rosso fermentato.



2

La fase preparativa del metodo prevede l'estrazione del campione con metanolo mediante agitazione, la centrifugazione e il congelamento alla temperatura di -20°C per una notte. Successivamente si preleva un'aliquota dell'estratto che viene filtrata e diluita con acqua tamponata a pH~ 3. La soluzione così ottenuta viene analizzata mediante un sistema ad alta risoluzione di cromatografia liquida con rivelatore a spettrometria di massa. (UPLC-MS/MS, Thermo Scientific Accela 1250 + Thermo Q-Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ con ionizzazione ElectroSpray (ESI) (figura 3).

- 1 Integratori alimentari contenenti riso rosso fermentato sono disponibili in varie formulazioni quali capsule o compresse.
- 2 La molecola della citrinina, una micotossina che può contaminare il riso rosso fermentato.
- 3 Sistema ad alta risoluzione di cromatografia liquida con rivelatore a spettrometria di massa.
- 4 Cromatogrammi di uno standard di citrinina a 250 µg/kg (in alto) e di un campione fortificato a 1000 µg/kg (al centro), con il relativo spettro di massa della molecola (in basso).



3

Le migliori condizioni di separazione cromatografica prevedono l'impiego di una colonna Accucore aQC18 (100 mm x 2,1 mm, 2,6 µm) termostata a 35 °C e di un flusso di 0,3 ml/min. Come fase mobile si utilizza un gradiente lineare dei seguenti eluenti:

- una soluzione di ammonio formiato 4 mM e acido formico allo 0,1% in acqua
- una soluzione di ammonio formiato 4 mM e acido formico allo 0,1% in metanolo

Il volume di iniezione è pari a 10 µl.

### Lo spettro di massa

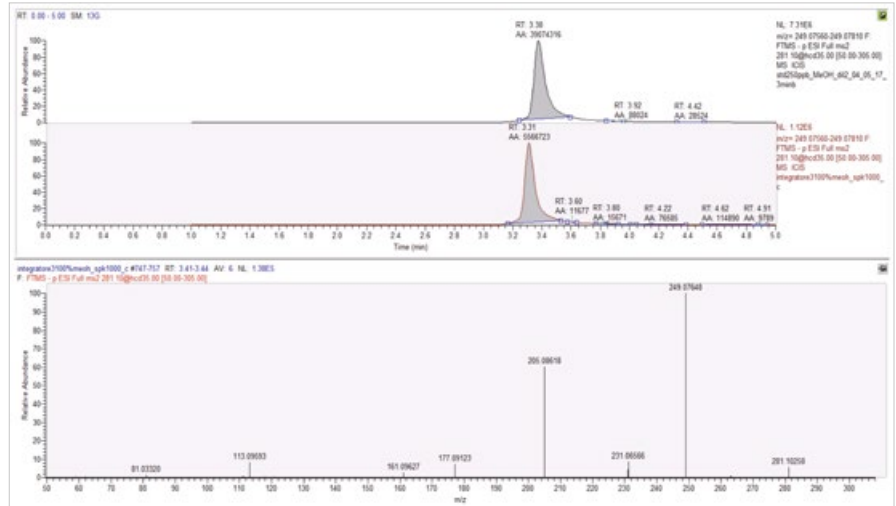
Lo spettro di massa della citrinina presenta una ione parente alla massa di 281.10306 m/z e due frammenti. Lo ione diagnostico per la determinazione della micotossina è rappresentato dal primo frammento e ha un rapporto m/z uguale a 249.07685 (Mmolecolare - H), con risoluzione 70000.

L'ESI si usa in modalità negativa nell'intervallo di scansione 80-300 m/z. Si riportano i cromatogrammi di uno standard di CIT e di un campione fortificato con il relativo spettro di massa della molecola (figura 4).

Il metodo proposto è stato sottoposto a un processo di validazione conforme alle prescrizioni generali previste dal regolamento CE 882/2004, alle prescrizioni specifiche riportate nel regolamento UE 519/2014 e in accordo alle linee guida UNI CEN/TR 16059:2010.

Sono state valutate le prestazioni in termini di: *specificità/selettività, linearità, limite di quantificazione, giustezza, precisione, robustezza, incertezza di misura.*

La retta di taratura è stata costruita su quattro livelli di concentrazione ed è stato verificato il coefficiente R2 > 0,995. Per ogni livello è stato stimato anche il contributo dell'incertezza di taratura che è risultato essere inferiore al valore del CV% di Horwitz. È stato raggiunto un *limite di quantificazione (LOQ)* pari a 400 µg/kg, valore che rispetta la norma UNI CEN/TR 16059: 2010 (1/5 del ML).



4

Non essendo disponibili in commercio *materiali di riferimento certificati (CRM)* né materiali di riferimento in matrice per il riso rosso fermentato, si è fatto ricorso alla preparazione di campioni artificialmente fortificati a diverse concentrazioni, compreso il LOQ e il limite di legge previsto dal regolamento (UE) N. 212/2014, ossia 2000 µg/kg. Per tutti i livelli di concentrazione indagati i risultati della validazione hanno soddisfatto pienamente i requisiti indicati nel regolamento UE 519/2014, infatti la precisione, espressa come *coefficiente di variazione (RSD%)* è rientrata nel limite del 22% e il recupero nel range 70-120%. Il metodo, sulla base di prove di robustezza, può essere esteso alle diverse forme farmaceutiche presenti sul mercato, quali pillole e capsule dal contenuto in polvere o gelatinoso. Per la stima dell'incertezza di misura è

stato utilizzato l'approccio di Horwitz avendo il laboratorio verificato il rapporto di Horrat per tutti i livelli indagati. Il metodo sviluppato si è dimostrato selettivo e vantaggioso nella sua applicabilità, grazie all'utilizzo di una tecnica analitica che, nonostante preveda l'utilizzo di una strumentazione sofisticata che richiede personale tecnico altamente formato e specializzato, viene utilizzata quotidianamente nell'attività di routine del laboratorio.

**Antonio Armentano<sup>1</sup>, Nunzia Diaferia<sup>1</sup>, Egidio Leonetti<sup>1</sup>, Francesco Lo Greco<sup>1</sup>, Mariangela Palma<sup>1</sup>, Simona Noviello<sup>2</sup>, Francesca Ferrieri<sup>1</sup>**

1. Polo di specializzazione Alimenti Dipartimento di Bari, Arpa Puglia

2. Dipartimento di Chimica, Università degli studi di Bari "Aldo Moro"

### RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

European Union Reference Laboratory for Mycotoxins, *Determination of citrinin in red yeast rice by liquid chromatography tandem mass spectrometry.*

Regolamento (CE) N. 1881/2006 della Commissione, 19 Dicembre 2006, definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 364/5.

Regolamento (CE) N. 401/2006 della Commissione, 23 febbraio 2006, relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 70/12.

Regolamento (UE) N. 212/2014 della Commissione, 6 marzo 2014, modifica il Reg. (CE) n. 1881/2006 per quanto riguarda i tenori massimi del contaminante citrinina negli integratori alimentari a base di riso fermentato con lievito rosso *Monascus purpureus*.

Regolamento (UE) N. 519/2014 della Commissione, 16 maggio 2014, modifica il Reg. (CE) n. 401/2006 per quanto riguarda i metodi di campionamento per le grandi partite, per le spezie e gli integratori alimentari, i criteri di rendimento per le tossine T-2 e HT-2 e per la citrinina, nonché i metodi di analisi di *screening*.

Relazione *Report on the relationship between analytical results, measurement uncertainty, recovery factors and the provisions in EU food and feed legislation.*

UNI CEN/TR 16059: 2010, *Analisi di alimenti. Criteri di prestazione di metodi di analisi validati da un singolo laboratorio per la determinazione di micotossine.*