

L'INFORMATORE AGRARIO

www.informatoreagrario.it



Edizioni L'Informatore Agrario

Tutti i diritti riservati, a norma della Legge sul Diritto d'Autore e le sue successive modificazioni. Ogni utilizzo di quest'opera per usi diversi da quello personale e privato è tassativamente vietato. Edizioni L'Informatore Agrario S.p.A. non potrà comunque essere ritenuta responsabile per eventuali malfunzionamenti e/o danni di qualsiasi natura connessi all'uso dell'opera.

• ERRORI DA EVITARE NEL POST-RACCOLTA

Micotossine: il campione giusto permette analisi precise

Le micotossine sono distribuite in modo estremamente eterogeneo in una derrata alimentare, quindi è fondamentale prelevare il campione in modo rappresentativo. Il procedimento richiede molta attenzione, in quanto errate procedure di campionamento hanno un forte effetto sull'attendibilità della presenza di micotossine nei prodotti alimentari

di Carlo Brera,
Barbara De Santis

La contaminazione da micotossine negli alimenti e mangimi è riconosciuta sia in ambito scientifico sia legislativo come prioritaria in termini di sicurezza alimentare. Ai fini della tutela della salute pubblica, il tenore dei contaminanti negli alimenti è mantenuto a livelli tollerabili sul piano tossicologico dai limiti massimi che vengono definiti dalla Commissione europea.

Le autorità competenti, nell'ambito delle attività ufficiali di controllo in materia di alimenti, garantiscono l'at-

tendibilità dei controlli delle conformità ai tenori massimi, adottando regolamenti specifici riguardanti le modalità di campionamento anche per assicurare che in tutta la Comunità siano adottati gli stessi criteri.

È di fondamentale importanza rilevare che senza l'applicazione di opportuni piani di campionamento è altamente probabile incorrere in errate valutazioni non solo nell'ambito del controllo ufficia-

FONTI DI ERRORE NELLA PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

- Scarsa omogeneizzazione al momento della formazione dei sottocampioni
- Scarsa omogeneità nella granulometria
- Dimensioni delle parti granulari
- Livello di contaminazione

le, dove le ricadute hanno implicazioni di ordine legale-amministrativo, ma anche nell'ambito della sorveglianza sanitaria, dove i dati devono riflettere il livello di protezione della salute umana, animale e dell'ambiente.

L'importanza dei piani di campionamento

La necessità di adottare piani di campionamento *ad hoc* nasce dalla natura estremamente eterogenea della contaminazione delle micotossine in una derrata alimentare, che obbliga a osservare, all'atto del prelievo del campione, una serie di procedure tese a garantire la rappresentatività dell'intero lotto, caratteristica principale e indispensabile che un campione globale, prelevato da una massa, deve possedere.

La rappresentatività è necessaria per assicurare che le informazioni relative alla distribuzione delle micotossine, e ai livelli di contaminazione delle stesse nei lotti sia di piccole sia di grandi dimensioni, siano mantenute in modo accurato nel campione globale prelevato.



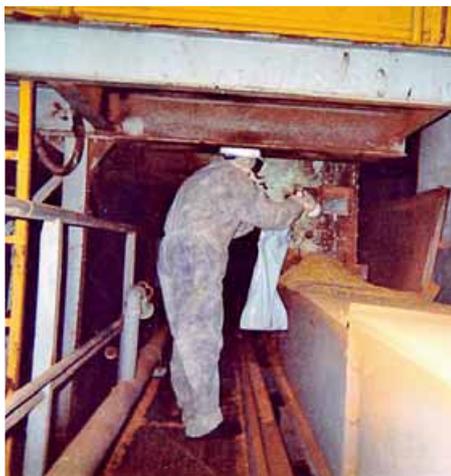


Foto 1 - Raccolta dei campioni incrementali durante un campionamento dinamico

Tipologie di campionamento

Esistono diverse tipologie di campionamento: di tipo **casuale, sistematico, a grappolo e stratificato**, di carattere **probabilistico e non probabilistico**.

Con il presupposto che ogni campione elementare debba avere la stessa probabilità di essere scelto, per le micotossine la tipologia di campionamento più idonea è quella di tipo casuale.

Inoltre in funzione della natura del materiale e delle modalità di stoccaggio si possono avere campionamenti statici o dinamici (foto 1 e 2).

Campionamento statico. Il campionamento statico prevede prelievi in punti diversi di una massa, costituente il lotto/partita, stoccata in sacchi o container con l'ausilio di opportune sonde (foto 3).

Campionamento dinamico. Il campionamento dinamico, invece, prevede prelievi a tempi diversi di una massa in movimento (prelievo manuale o con campionatori automatici dei campioni elementari dalla massa che scorre su nastri trasportatori (foto 4).

Per le micotossine, il campionamento dinamico è senz'altro quello che offre le maggiori garanzie di praticabilità, assicurando che le operazioni di campionamento siano sempre condotte in condizioni idonee per la sicurezza degli operatori e tengano anche conto della protezione del campione da contaminazioni esterne.

Per una corretta applicazione della procedura di campionamento di una partita, deve essere effettuato il prelievo di un numero di campioni elementari diversificato a seconda della dimensione del lotto. Tali campioni elementari,

prelevati casualmente in punti diversi del lotto, devono successivamente essere riuniti per formare un campione globale, la cui analisi fornirà le informazioni relative allo stato di contaminazione dell'intero lotto.

In questo processo di trasferimento delle informazioni è insito un errore che deve essere ridotto al minimo non solo attraverso la corretta applicazione delle procedure di campionamento, ma anche attraverso il coinvolgimento e l'addestramento del personale preposto.

L'errore totale, associato a tutte le varie fasi della «filiera analitica» corrisponde alla somma dei singoli contributi di ciascuna fase (campionamento, preparazione del campione e analisi).

Studi effettuati su basi statistiche (Whitaker, 2003) hanno evidenziato che per una sostanza o materiale eterogeneamente distribuiti in una derrata alimentare, come nel caso

delle micotossine, l'errore attribuibile al campionamento, misurato come varianza, dà, nella stima dell'errore totale, un contributo di gran lunga superiore a quello riferibile agli altri stadi della filiera analitica, vale a dire la preparazione del campione e l'analisi. Nella *tabella 1* viene riportato il contributo percentuale alla varianza totale associata alla misura della contaminazione da aflatoxina B1 nelle arachidi sgusciate (Whitaker, 2003).

Si può notare che il contributo maggiore alla varianza totale è dato comun-

que dalla fase di campionamento (5 kg contro 20 kg) e che, in valore assoluto, la varianza che deriva dal campione di dimensioni più piccole è maggiore di quella che deriva dal campione di dimensioni più grandi (20 kg), confermando quanto indicato in precedenza, vale a dire che maggiore è il grado di rappresentatività del campione globale, minore è l'errore associato alla misura.

Come preparare il campione

Nella preparazione del campione, questo, dopo macinazione, è ridotto in piccole parti granulari per unità di massa in funzione della tipologia di mulino impiegato.

Dal momento che la concentrazione delle micotossine è disomogenea anche tra le varie parti molite, analisi replicate sullo stesso campione possono variare



Foto 2 - Raccolta dei campioni incrementali con sonda, nel corso di un campionamento statico

TABELLA 1 - Confronto fra le variabilità associate nelle varie fasi di campionamento, preparazione del campione e analisi, in due diversi casi di analisi di aflatoxine in arachidi sgusciate

Fase analitica	Varianza	Contributo alla varianza totale (%)
A) Campionamento: 5 kg	521,4	82
B) Preparazione del campione: macinazione di 250 g con AMS	59,2	9,4
C) Analisi in TLC	50,1	7,9
Totale (A + B + C)	630,7	100
A) Campionamento: 20 kg	130,4	74
B) Preparazione del campione: macinazione di 100 g con VCM	25,5	15
C) Analisi HPLC	20,1	11
Totale (A + B + C)	176,0	100

AMS: Agricultural Marketing Service, servizio di campionamento dell'Usda Subsampling Mill. VCM: Vertical Cutter Mixer.

Le principali fonti di errore in questa fase vanno attribuite a una scarsa omogeneità della parte macinata e a una disomogeneità delle dimensioni delle parti granulari della parte stessa da sottoporre all'analisi, oltre a un errato prelievo.

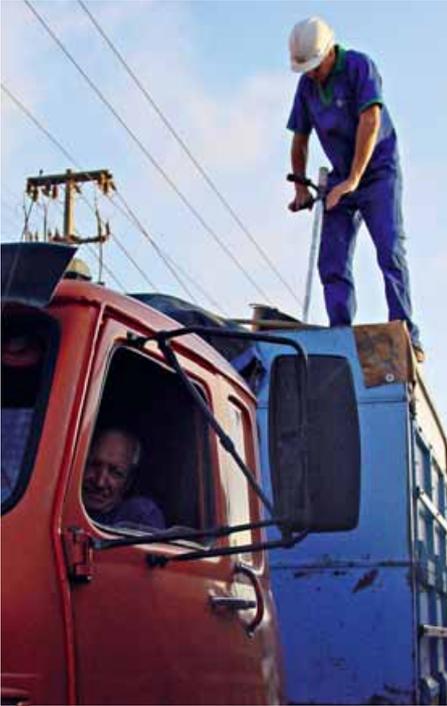


Foto 3 - Operatore al campionamento su un camion con l'ausilio di una sonda

significativamente nei valori di contaminazione evidenziando una scarsa precisione nell'analisi quantitativa. La variabilità derivante dalla macinazione del campione è, in assoluto, inferiore quando il campione è macinato con strumenti che producono particelle più piccole (VCM, Vertical Cutter Mixer contro AMS, Agricultural Marketing Service, *tabella 1*) anche quando l'aliquota macinata ha peso inferiore (100 g rispetto a 250 g).

Le principali fonti di errore in questa fase sono essenzialmente da attribuire a una scarsa omogeneità della massa macinata e a una disomogeneità delle dimensioni



Foto 4 - Lo slurry, miscela di acqua e campione macinato, garantisce un elevato grado di omogeneità e minima probabilità di errore analitico

delle parti granulari della massa stessa da sottoporre all'analisi e a un errato prelievo dell'aliquota corrispondente.

Per ridurre la varianza associata alla scarsa omogeneità delle parti granulari dell'aliquota si può effettuare una macinazione più fine sia a secco mediante aggiunta di acqua (tecnica di preparazione dello *slurry*) (*foto 4*).

Lo slurry garantisce un elevato grado di omogeneità e una consistente diminuzione della variabilità nella fase di preparazione del campione come dimostrato dagli studi condotti da Spanjer *et al.* (2006). L'errore associato alla fase di analisi quantitativa è dato dalla sommatoria di tutti i contributi associati a ogni singolo passaggio analitico (estrazione dalla matrice, filtrazione, diluizione, purificazione e quantificazione).

La variabilità analitica può essere ridotta aumentando il numero di aliquote replicate analizzate, utilizzando strumentazione tecnologicamente avanzata (in termini di varianza HPLC < TLC, come indicato in *tabella 1*) e impiegando personale qualificato.

Aspetti normativi

La Commissione europea riconoscendo il ruolo cruciale del campionamento nella valutazione della conformità delle derrate alimentari alle micotossine, ha recentemente emanato due regolamenti quadro relativi al campionamento delle micotossine negli alimenti e nei mangimi: il regolamento CE n. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006, relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari, e il recentissimo regolamento CE n. 152/2009 della Commissione del 27 gennaio 2009, che fissa i

metodi di campionamento e di analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali, regolamento che riprende integralmente il dm del 20 aprile 1978.

Le disposizioni generali di entrambi i regolamenti prevedono l'applicazione delle procedure in conformità con le disposizioni del regolamento 882/2004 sul controllo ufficiale, per cui solo i campioni ottenuti seguendo le indicazioni dei citati regolamenti si considerano rappresentativi delle partite oggetto di controllo. Bisogna altresì considerare che nel regolamento 401/2006 laddove sussistano difficoltà oggettive tali da non consentire l'effettuazione delle procedure descritte è previsto il ricorso ad altre tipologie di campionamento, purché garantiscano la massima rappresentatività.

Il campionamento ideale

Alla luce di quanto detto, si può delineare uno scenario ideale per il miglior campionamento finalizzato all'analisi delle micotossine.

Tale campionamento ideale dovrebbe essere predisposto sulla matrice non trasformata, possibilmente nella fase del raccolto, dovrebbe prediligere, quando possibile, una modalità di campionamento dinamico con prelievi di campioni elementari in automatico, predisporre la raccolta di un elevato numero di campioni elementari calcolato in funzione della grandezza del lotto-partita e prevedere la macinazione del sottocampione con mulini che garantiscano un particolato fine (20 mesh o 0,75 mm) e l'omogeneizzazione per mezzo della formazione dello slurry. A ogni modo, ogni standardizzazione di procedura di campionamento dovrebbe mirare a ridurre la variabilità tenendo conto delle esigenze in termini di costi e fattibilità.

Poiché ogni fase ha costi differenziati, è importante pertanto ottimizzare gli sforzi e le risorse per effettuare una corretta valutazione del contenuto di micotossine secondo piani di campionamento rappresentativi.

Carlo Brera
Barbara De Santis

Istituto superiore di sanità
Dipartimento di sanità pubblica veterinaria
e sicurezza alimentare
Reparto ogm e micotossine
carlo.brera@iss.it



Per consultare la bibliografia:
www.informatoreagrario.it/rdLia/09ia32_4457_web

Micotossine: il campione giusto permette analisi precise

BIBLIOGRAFIA

Whitaker T.B. (2003) - *Standardisation of mycotoxin sampling procedures: an urgent necessity*. Food Control, 14: 233-237.

Spanjer M.C., Scholten J.M., Kastrup S., Jorissen U., Schatzki T.F., Toyofuku N. (2006) - *Sample comminution for mycotoxin analysis: Dry milling or slurry mixing?* Food Additives and Contaminants, January, 23 (1): 73-83.

Regolamento CE n. 401/2006 della Commissione del 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 del 9-3-2006.

Regolamento CE N. 152/2009 della Commissione del 27 gennaio 2009 - Fissa i metodi di campionamento e di analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali. *Gazzetta Ufficiale* dell'Unione Europea l. 54/1 del 26-2-2009.