

MATERIALI DI RIFERIMENTO CERTIFICATI PER L'ANALISI DELLE MICOTOSSINE

Giovanna Zappa

*Divisione Biotecnologie e Agroindustria, Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali,
ENEA Casaccia Roma, Italia*

Introduzione

Da diversi anni la chimica e la biologia sono entrate con pieni diritti nel mondo della metrologia con grandi benefici, per questi settori in termini di affidabilità e comparabilità dei dati e per la scienza delle misure in termini di maggiore apertura e avvicinamento al vasto mondo delle misure, su cui oggi sempre più si fondano sicurezza, sostenibilità e innovazione.

I materiali di riferimento hanno rappresentato l'elemento chiave per applicare i criteri e i principi metrologici alle misure chimiche e biologiche.

Il concetto di materiale di riferimento certificato si è andato via via evolvendo per adeguarsi anche a questi nuovi settori, come si sta evolvendo lo stesso concetto di misurazione, che da prerogativa solo delle grandezze (da sempre definite come proprietà misurabili) sta per trovare applicazione anche alle proprietà classificatorie. I problemi che dovremo affrontare e risolvere in termini di riferibilità, incertezza di misura e realizzazione di materiali di riferimento certificati saranno molto grandi, ma quello che è richiesto oggi è soprattutto vivere in maniera attiva, dinamica e consapevole questo cambiamento.

Si è ritenuto utile – per meglio trattare il tema dei materiali di riferimento e della loro “certificazione” – includere nel presente lavoro una breve panoramica sulle recenti evoluzioni della metrologia e su quella che è stata l'esperienza e il contributo italiano al diffondersi della cultura metrologica nel settore delle analisi chimiche e biologiche e quindi all'impiego dei materiali di riferimento. Dopo aver presentato la disponibilità attuale di materiali di riferimento per l'analisi di micotossine, vengono discussi i risultati di un recente studio di fattibilità per la realizzazione di nuovi RM.

Approccio metrologico alle analisi chimiche e biologiche ed evoluzione del concetto di misurazione

Negli ultimi anni abbiamo assistito a profondi cambiamenti nella Metrologia, tra cui i più significativi sono stati il passaggio da *Error Approach* a *Uncertainty Approach* (1-3) e la progressiva sostituzione dei campioni materiali delle unità di misura (come per esempio il campione del chilogrammo conservato a Sèvres) con definizioni basate su Costanti Universali. In particolare quest'ultimo cambiamento ha aperto una serie di riflessioni che riguardano anche la comunicabilità e comprensibilità sociale del nuovo Sistema Internazionale di unità basato su costanti (4).

Parallelamente, l'allargamento della metrologia ai settori della Chimica e della Biologia ha reso via via necessaria la revisione di alcuni concetti fondamentali, tra cui il concetto stesso di misurazione che si prevede verrà profondamente rivisto nella IV edizione del Vocabolario Internazionale di Metrologia (VIM) di prossima pubblicazione. Nelle prime 2 edizioni del VIM

il termine *measurement* era definito come “2.08 Processo di misurazione - Totalità delle informazioni, strumenti e operazioni relative ad una data misurazione”. Nella terza edizione del VIM (5) viene introdotto il concetto di “proprietà classificatoria (*nominal property*)”, che vengono dichiarate “non misurabili” e il termine *measurement* che viene così definito: “2.1 Misurazione - Processo volto a ottenere sperimentalmente uno o più valori che possono essere ragionevolmente attribuiti a una grandezza”; la nota 1 esplicitamente afferma che “la misurazione non si applica alle proprietà classificatorie”.

Nella prossima edizione del VIM (IV edizione in corso di ultimazione) la definizione di “measurement” si prevede invece che diventerà “measurement process of experimentally obtaining one or more values that can reasonably be attributed to a quantity, an ordinal property or a nominal property”, includendo quindi le proprietà classificatorie nelle proprietà misurabili e allargando l’approccio metrologico ad ogni processo di misurazione delle proprietà di corpi o fenomeni. A riguardo mi preme sottolineare l’importante lavoro portato avanti in ambito internazionale dalla Commissione Metrologia UNI-CEI e in particolare da Luca Mari nell’ambito del WG2 del *Joint Committee for Guides in Metrology* (JCGM) (6).

Materiali di riferimento per le analisi chimiche e biologiche

Se si guarda alla definizione dei materiali di riferimento, ci si accorge che questa evoluzione del concetto di misurazione era già avvenuta da tempo, a dimostrazione del fatto che questo cambiamento è stato determinato principalmente dal processo di inclusione delle misure Chimiche e Biologiche nella Metrologia.

Le nuove definizioni (7) riportate poi nell’ultima edizione della Guida ISO-REMCO (8) evidenziano non solo il ruolo dei materiali di riferimento nell’esame delle proprietà classificatorie, ma anche come il concetto stesso di “valore” possa essere applicato alle proprietà classificatorie ossia ad attributi qualitativi come l’identità o la sequenza e che l’incertezza per questo tipo di attributi possa essere espressa come probabilità o livello di confidenza. I materiali di riferimento rappresentano quindi l’elemento chiave per applicare i criteri e i principi metrologici alle misure chimiche e biologiche.

L’Italia ha svolto negli anni 1980-1990 un’attività pionieristica in questo settore, grazie all’attività dell’Istituto Nazionale di Ricerca Metrologica (INRIM) e al grande impegno di ENEA (Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l’energia e lo sviluppo economico sostenibile) e del Centro Sviluppo Materiali (CSM) (9) che dettero vita al Centro Nazionale Materiali di Riferimento (CNMR), intorno al quale si aggregarono gli attori del Sistema Qualità Italia e i più importanti gruppi di ricerca tra cui quelli afferenti gli Istituti Metrologici Nazionali poi confluiti in INRIM, l’Istituto Superiore di Sanità (ISS) e l’Università Sapienza di Roma.

Il CNMR grazie all’impegno congiunto di ENEA e CSM divenne anche per 5 anni distributore autorizzato dei Materiali di Riferimento del *Bureau Communautaire de Reference* (BCR), rafforzando sempre più la rete internazionale e svolgendo nel contempo una grande e importante azione di sensibilizzazione, diffusione e formazione sul territorio nazionale. Fin dall’inizio uno dei focus principali fu l’agroalimentare (10), ed ENEA dopo aver per tanti anni partecipato ai circuiti internazionali per la certificazione di materiali di riferimento, rese operativi, a cavallo del nuovo millennio, impianti dedicati alla preparazione di materiali di riferimento per il settore agroalimentare, che, grazie alle tecnologie adottate, hanno consentito di ideare e sperimentare nuove vie progettuali e soluzioni pratiche per la riferibilità metrologica (11-14).

Il lavoro di cooperazione di questi ultimi anni ha permesso di dare il via al progetto internazionale METROFOOD per la realizzazione della prima infrastruttura europea di ricerca dedicata alla produzione di materiali di riferimento e al rafforzamento della metrologia per gli alimenti e la nutrizione (per approfondimenti: <https://cordis.europa.eu/project/id/739568/results>) (15), iniziativa che si spera consentirà di valorizzare ulteriormente l'importante ruolo della ricerca italiana e l'impegno di quanti hanno contribuito al successo di questa percorso.

Certificazione dei materiali e accreditamento dei produttori

Nei primi anni abbiamo assistito ad una certa confusione terminologica, in particolare per quanto riguarda i materiali di riferimento certificati, sia perché si diffuse l'errata interpretazione dei due termini Materiali di Riferimento (*Reference Material*, RM) e Materiali di Riferimento Certificati (*Certified Reference Material*, CRM) come in "antitesi" (insiemi disgiunti) e sia perché erano gli anni in cui stavano esplodendo le norme per i Sistemi di Gestione per la Qualità dove il termine certificazione era di fatto (ed è tuttora) utilizzato per indicare la *certificazione di conformità* a requisiti prestabiliti, condotta da una terza parte (Organismo di Certificazione). Lo sforzo di chiarimento riguardo la terminologia, le procedure di realizzazione e l'impiego di RM e CRM (7, 8, 16) ha dato senz'altro i suoi frutti.

Rimane una certa disarmonia per quanto riguarda l'uso del termine "certificazione": si è deciso infatti di non impiegare il termine quando riferito al processo di misura, ma di mantenere l'aggettivo qualificativo e il sostantivo "certificato" ad indicare rispettivamente il tipo di RM (o il tipo di valori) e il documento di accompagnamento. La guida 35 ISO-REMCO è stata quindi modificata da "guida per la certificazione" a "guida per la caratterizzazione e valutazione dell'omogeneità e stabilità" (17) e a fine 2016 è stata pubblicata la norma internazionale ISO 17034:2016 (18) sulla quale si basa oggi in tutti i Paesi l'accreditamento dei produttori di Materiali di Riferimento.

In Tabella 1 sono riportati i requisiti previsti da tale norma per la produzione di RM e CRM, dai quali si evince che la differenza fondamentale tra CRM e RM risiede nella riferibilità metrologica dei valori certificati e nella disponibilità di un certificato che espliciti come questa sia stata ottenuta.

Tabella 1. Requisiti per la produzione di RM e CRM (ISO 17034:2016)

Requisiti	RM	CRM
Valutazione dell'omogeneità	x	x
Valutazione della stabilità	x	x
Caratterizzazione del materiale	<i>se appropriato</i>	x
Dichiarazione di Commutabilità	<i>se appropriato</i>	<i>se appropriato</i>
Assegnazione dei valori e delle loro incertezze	<i>se appropriato</i>	x
Riferibilità metrologica dei valori certificati		x
Certificato con informazioni sulla stabilità, riferibilità metrologica e grado di omogeneità		x

Materiali di riferimento per le analisi delle micotossine: disponibilità attuale di CRM, caratteristiche e problematiche di produzione

La storia dei Materiali di Riferimento per le micotossine va di pari passo con l'evoluzione del quadro normativo per la sicurezza alimentare e fin dall'inizio si è capito che nella produzione di questi RM si dovevano avere attenzioni particolari (19). EU-Joint Research Centre (EU-JRC) ha tenuto egregiamente il passo nella produzione di RM per rispondere alle necessità che l'applicazione della normativa via via richiedeva ed ha a catalogo oggi sotto diversi marchi (BCR®, IRMM ed ERM®25) 25 CRM di cui 17 *matrix* CRM e 8 soluzioni di sostanze pure. Il Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) ha recentemente lanciato il progetto *Mycotoxin Metrology* all'interno del programma *Capacity Building & Knowledge Transfer* (CBKT). Si tratta di un progetto finalizzato a rafforzare l'infrastruttura di metrologia delle micotossine e consentire agli Istituti Metrologici Nazionali (NMI) di caratterizzare materiali, fornire sostanze di taratura e *matrix*-RM per supportare i laboratori che effettuano analisi delle micotossine nei diversi Paesi. Oltre a EU-JRC, producono CRM per le micotossine: il Laboratory of the Government Chemist inglese (www.lgc.uk), il tedesco MUVA Kempten GmbH (www.muva.de) e il tedesco Dr. Ehrenstorfer Reference Materials; recentemente anche il *National Institute of Standards and Technology* statunitense (NIST, www.nist.gov) ha inserito a catalogo un *matrix*-CRM di Mais certificato per il contenuto di Ocratossina A e con valori informativi per diverse altre micotossine. Complessivamente, risultano disponibili 32 *matrix*-CRM e 15 *calibrant solution*. In Tabella 2 è riportato un quadro sintetico della copertura in termini di *matrix*-CRM.

Tabella 2. Produzione di *matrix*-CRM per l'analisi delle micotossine

Produttore	Matrice	Micotossine
EU-JRC	Mais	ZON, DON, NIV
	Mangimi	AFB ₁ , AFG ₁ , AFB ₂ , AFG ₂
	Latte	AFM ₁
	Grano e derivati	OTA, DON
	Arachidi e derivati	AFB ₁ , AFG ₁ , AFB ₂ , AFG ₂
	Pistacchi	AFB ₁ , AFB ₂
	Paprika	AFB ₁ , AFG ₁ , OTA
	Orzo	OTA
LGC	Mais	ZON
	Mangimi	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂
	Latte	AFM ₁
MUVA	Latte	AFM ₁
	Succo di mela	PAT
NIST	Mais	OTA

EU-JRC: European Union-Joint Research Center; LGC: Laboratory of the Government Chemist; MUVA: ; NIST: National Institute of Standards and Technology
 ZON: Zearalenone; DON: Deossinivalenolo; NIV: Nivalenolo; AFB₁: Aflatossina B₁; AFB₂: Aflatossina B₂; AFG₁: Aflatossina G₁; AFG₂: Aflatossina G₂; AFM₁: Aflatossina M₁; PAT: Patulina; OTA: Ocratossina A.

Le principali problematiche nella produzione di *matrix*-CRM riguardano la stabilità e l'incertezza dei valori certificati. Per quanto riguarda la stabilità ci sono da considerare diversi aspetti. Per rendere stabile il contenuto di micotossina è necessario da un lato eliminare qualsiasi ulteriore potenziale fonte (microrganismi tossigeni) attraverso idonei processi di sterilizzazione e dall'altro lato conservare i materiali in condizioni tali (temperatura, illuminazione, atmosfera) da impedire la degradazione o comunque la trasformazione chimica delle molecole di interesse. Inoltre, come per la gran parte dei prodotti alimentari, va considerata la stabilità delle matrici, che richiede già di per sé, in molti casi, la deidratazione e la conservazione in idonee condizioni. La validità dei valori certificati prodotte da EU-JRC è di 1 anno dall'acquisto se il prodotto viene conservato a -20°C, sia per i *matrix*-CRM che per le soluzioni di taratura. L'incertezza è invece generalmente molto diversa a seconda che si tratti di soluzioni pure o *matrix*-CRM. Quando l'attribuzione di valori avviene attraverso uno studio interlaboratorio, l'incertezza finale è calcolata come segue:

$$U_{CRM} = k \cdot \sqrt{u_{char}^2 + u_{bb}^2 + u_{lts}^2 + u_{sts}^2}$$

dove k è il fattore di copertura (generalmente $k=2$), u_{char} è l'incertezza dello studio interlaboratorio di caratterizzazione, u_{bb} è l'incertezza dovuta a disomogeneità tra unità, u_{lts} è l'incertezza di stabilità a lungo termine (storage) e u_{sts} è l'incertezza della stabilità a breve termine (trasporto e utilizzo). Le soluzioni, in linea generale, avranno una u_{bb} trascurabile e anche la u_{char} risulterà inferiore per via della minore complessità e maggiore riproducibilità del metodo analitico. Quando i valori di concentrazione sono attribuiti in base ai dati di preparazione (misura di volumi e masse, purezza dei reattivi), che è tipicamente quanto avviene per le sostanze pure, l'incertezza può risultare ulteriormente più bassa (Tabella 3) (20).

Tabella 3. Calcolo incertezza CRM certificati per il contenuto di zearalenone (ZON) in acetonitrile e in matrice di mais (sigle: BCR 699 e BCR 717)

Parametri	ZON in acetonitrile BCR 699	Maize (ZON livello basso) BCR 717
u_{char} (%)	0,4	1,01
u_{bb} (%)	0,92	0,81
u_{lts} (%)	1,1	4,9
Incetezza combinata (%)	1,49	5,1
Valore certificato ($\mu\text{g/mL}$)	9,95	83,32
Incetezza combinata ($\mu\text{g/mL}$)	0,148	4,22
Incetezza estesa ($k=2$) ($\mu\text{g/mL}$)	0,296	8,45
Incetezza estesa (%)	3,0	10,2

Fonte: Report EUR20782EN (20)

Le sostanze pure sono molto utili per l'identificazione dei picchi e per le verifiche iniziali e periodiche, ma la disponibilità di un *matrix*-CRM, possibilmente con lo stesso livello e combinazione di analiti, rappresenta l'unica possibilità per ottenere la reale riferibilità dei risultati, validare un metodo ed evidenziare come eventuali effetti matrice interferiscano sul risultato finale. La via intermedia – ossia l'aggiunta di quantità note di analita ad una matrice reale (*spiked-RM*) – non è consigliabile nel caso delle micotossine, per la scarsa rappresentatività rispetto ad un materiale naturalmente contaminato, mentre una buona soluzione, adottata per altro da EU-JRC nella preparazione dei 3 CRM di latte in polvere con diversi valori di Aflatossina M₁ (AFM₁),

è quella di partire da 2 materiali di partenza omogenei a diverso contenuto di micotossine (di cui una possibilmente a livello inferiore al limite rivelabilità) e preparare i materiali intermedi al livello voluto, per miscelazione. Nel caso dei CRM di latte in polvere certificati per AFM₁ preparati da EU-JRC, i due materiali di partenza contenevano rispettivamente <0,02 µg/kg e 87 µg/kg di AFM₁ e per opportuna miscelazione sono stati ottenuti i 2 CRM intermedi, contenenti rispettivamente 0,111 µg/kg AFM₁ (ERM-BD283) e 0,44 µg/kg AFM₁ (ERM-BD284). Le incertezze finali e i contributi delle diverse fonti per questi CRM sono riportati in Tabella 4 (21). Come si può vedere anche in questo caso il maggior contributo deriva dall'instabilità a breve termine.

Tabella 4. Incertezza nei CRM certificati per il contenuto di Aflatossina M₁ (AFM₁) nel latte in polvere a due diversi livelli (ERM-BD283 e ERM-BD284)

Parametri	AFM ₁ nel latte in polvere	
	ERM-BD283 (livello basso)	ERM-BD284 (livello alto)
U _{char} (%)	2,2	1,7
U _{bb} (%)	0,89	0,77
U _{lts} (%)	7,4	6,3
Incetezza combinata (%)	7,8	6,6
Valore certificato (µg/kg)	0,111	0,442
Incetezza combinata (µg/kg)	0,0086	0,0291
Incetezza estesa (k=2) (µg/kg)	0,018	0,059
Incetezza estesa (%)	15,6	13,2

Fonte: Report EUR21202EN (21)

Per la produzione di sostanze pure sono state sviluppate diverse strategie, tra cui la biosintesi tramite inoculo e raffinate sintesi biotecnologiche che consentono la preparazione di metaboliti secondari, oltre che di CRM marcati (22).

L'inoculo (sia in campo che sul raccolto) può essere utilizzato anche per realizzare CRM mirati (*driven*), ossia una sorta di *matrix*-RM "personalizzati", particolarmente utili, quando non ci sia disponibilità di materiali naturalmente contaminati o per ottenere – attraverso opportuna miscelazione di un materiale fortemente contaminato con un materiale non contaminato – una serie di CRM della stessa matrice, ma a diversa concentrazione di analita (23).

Per quanto riguarda gli analiti le necessità più impellenti in termini di nuovi CRM sono legate alle micotossine emergenti e ai materiali certificati per più micotossine. Per quanto riguarda le matrici sarebbe altresì utile disporre di CRM per caratterizzare non solo il prodotto finito ma tutta la filiera produttiva. Disporre di questi CRM consentirebbe di effettuare studi pre-normativi più efficaci, rapidi e completi, fornendo nel contempo alle aziende virtuose gli strumenti di controllo più idonei per mettere in atto le opportune azioni di mitigazione (24).

Studio di fattibilità per la realizzazione di un nuovo RM per l'analisi di DON e Ac-DON nella farina

Nell'ambito del progetto Safe&Smart (<https://www.clusteragrifood.it/it/attivita/progetti/safe-smart.html>) è stato recentemente condotto, in collaborazione tra ENEA, ISS, Barilla G. e R. Fratelli SpA (nel seguito Barilla) e UCSC Piacenza, uno studio di fattibilità per la realizzazione

di nuovi RM per l'analisi di DON e Ac-DON nella farina (23). Le novità di questo studio riguardano principalmente il processo di preparazione. Vista la non disponibilità di farine naturalmente contaminate da DON, i materiali sono stati preparati per diluizione di un materiale artificialmente contaminato, attraverso inoculo di fungo *Fusarium*. Lo studio ha preso in considerazione diverse possibilità partendo da farina o da granelle, sia per di grano duro che di grano tenero e sono stati testati diverse specie e ceppi di *Fusarium*. Tutte le prove sono state condotte su batch forniti da Barilla, preventivamente omogeneizzati e ripartiti in lotti mediante gli impianti ENEA del Centro Ricerche Trisaia (Figura 1).



Figura 1. Impianti ENEA Centro Ricerche Trisaia per l'omogeneizzazione dei materiali in batch e la preparazione di lotti omogenei

USCS ha condotto gli studi di inoculo sui lotti omogenei preparati da ENEA e le verifiche iniziali del livello di contaminazione raggiunto. Partendo da grano duro, inoculato con *Fusarium culmorum* è stato possibile preparare lotti di 100-200 g di granella contaminati da tricoteceni nel range 100-200 ppm. I lotti così contaminati, dopo sterilizzazione, sono stati impiegati insieme con i lotti del materiale di partenza per preparare 3 RM (L0=livello 0; L1=livello basso; L2=livello alto) seguendo un complesso schema di omogeneizzazione messo a punto da ENEA, basato su step successivi di miscelazione, ripartizione e macinazione (Figura 2). Per ciascun livello si sono ottenute 64 aliquote da 50g. Sono state preparate sia aliquote in vetro che in plastica, conservate a -80°C e utilizzate per la caratterizzazione e per gli studi di omogeneità e stabilità.

L'ISS ha effettuato gli studi di omogeneità e di caratterizzazione dei materiali mediante LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*). L'indagine è stata allargata anche agli acetilati del DON, in particolare il 3 e 15 acetildeossinivalenolo (3AcDON e 15AcDON) in conformità con la recente posizione EFSA di considerare la soglia tossicologica di riferimento (*grouped Tolerable Daily Intake*) riferendola alla somma del DON e dei suoi acetilati. ISS ha inoltre verificato la stabilità del materiale conservato a -80°C.

I risultati (Figura 3 e Tabella 5) mostrano che il Livello 0 ha effettivamente una concentrazione di DON e AcDON inferiore al limite di quantificazione; i livelli 1 e 2 risultano omogenei per il contenuto di DON e 3AcDON e si conferma la stabilità con una conservazione a -80°C (23).

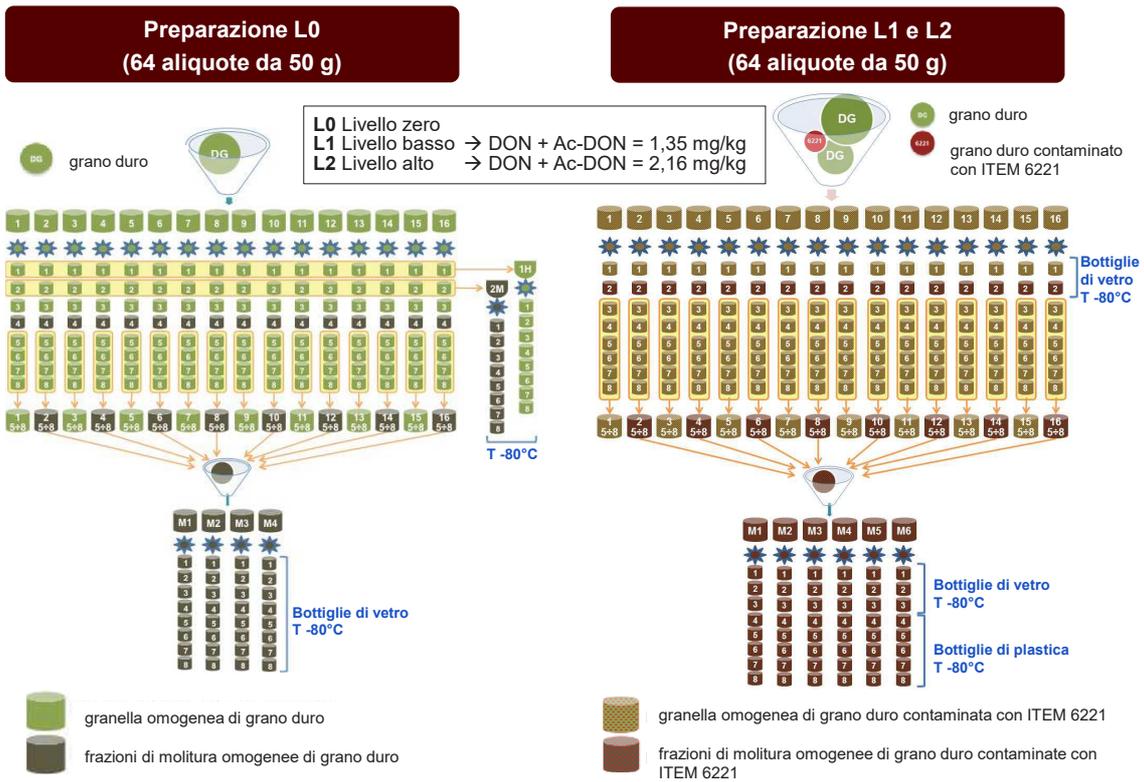


Figura 2. Schema di ripartizione, re-miscelazione e macinazione adottato per la preparazione dei RM di grano duro (Impianti ENEA Centro Ricerche Casaccia)

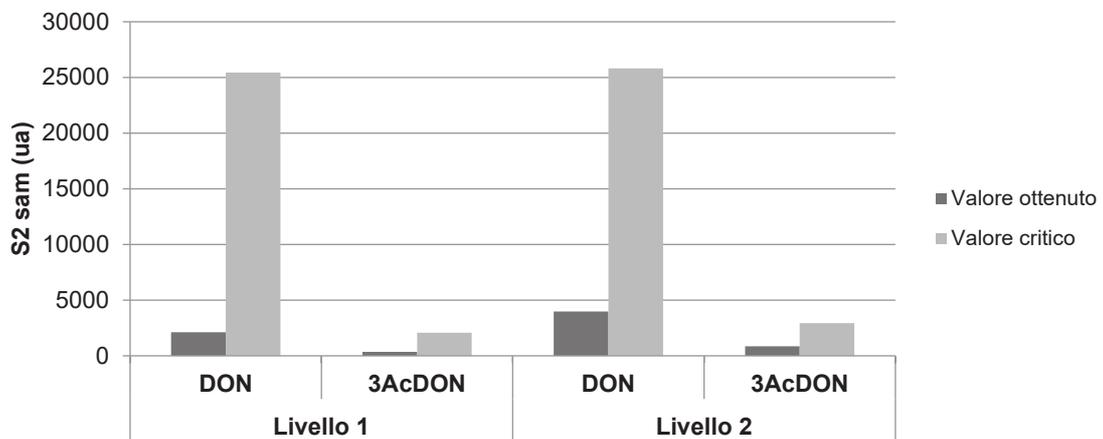


Figura 3. Risultati test ANOVA per valutazione omogeneità inter e intra aliquota (S_{sam} = estimated sampling standard deviation)

Tabella 5. Quadro complessivo dei risultati ottenuti da ISS e confronto dei risultati a distanza di tempo

Parametri di prestazione del metodo	Risultati 2015 (ISS)			Risultati 2019 (ISS)			
	DON	3AcDON	15AcDON	DON	3Ac DON	15Ac DON	DON 3G
RA (%)	108	69	64				
SSE (%)	118	71	70				
RE (%)	88	97	121				
LOQ (µg/kg)	50	25	25	40	40	100	76
LOD				10	10	25	19
Recupero (%)				106	96	104	71
Livello 0	media (µg/kg)	< LOQ	< LOQ	< LOQ			
Livello 1	media (µg/kg)	741	207	< LOQ	722	147	< LOQ
	SD (µg/kg)	146	37				
	RSD (%)	20	18				
	U (µg/kg)				159	40	
Livello 2	media (µg/kg)	918	233	< LOQ	1129	201	< LOQ
	SD (µg/kg)	131	41				
	RSD (%)	14	18				
	U (µg/kg)				248	40	

Nell'ambito degli studi di stabilità è stata inoltre messa a punto una procedura per la radiosterilizzazione ed effettuate alcune prove preliminari impiegando l'impianto per la sterilizzazione γ Calliope di ENEA equipaggiato con una sorgente di ^{60}Co . Sono state eseguite prove irraggiando a 10 kGy e a 25 kGy, ossia impiegando rispettivamente, la massima dose di radiazione consentita per gli alimenti e la dose di radiazione comunemente necessaria per il raggiungimento della sterilità. Dai risultati ottenuti da Barilla (Tabella 6) si può affermare che l'irraggiamento (sia a 10 kGy che a 25 kGy) non sembra determinare alcun effetto di riduzione del contenuto della tossina DON nella matrice, mentre un certo effetto, in termini di riduzione dopo irraggiamento, si nota sull'AcetilDON, la cui entità non sembra però correlata alla dose. Ciò potrebbe far pensare ad una degradazione o comunque modifica della molecola dovuta all'irraggiamento, per cui questo aspetto dovrà essere ulteriormente indagato in uno studio specifico.

Tabella 6. Confronto tra i contenuti di DON e 3AcDON in campioni di RM livello 2 non irraggiati e irraggiati a 10 kGy e 25 kGy (Risultati Barilla normalizzati)

Prova	DON (µg/kg)	3AcDON (µg/kg)
L2 bottle A2.8	1149	212
L2_bottle B4.8	1109	190
L2_IRR-A 10kGray L2_IRR-B	1129	133
25kGray	1112	156

Conclusioni

Sebbene la disponibilità di RM per l'analisi delle micotossine sia ampia e sufficiente per coprire le principali necessità connesse ai controlli normativi, è auspicabile un maggiore sviluppo di questo settore per consentire un più rapido progredire delle conoscenze sui meccanismi di formazione e interazione delle micotossine, per effettuare accurati studi pre-normativi, per monitorare in maniera più affidabile tutte le fasi di produzione e per valutare l'efficacia delle azioni di mitigazione. È indispensabile rafforzare l'azione formativa e informativa riguardo i benefici la scelta e l'utilizzo dei RM, tenendo il passo con l'evoluzione della Scienza delle Misure, considerando sia l'innovazione tecnologica che l'innovazione culturale.

Bibliografia

1. Bureau International des Poids et Mesures. Evaluation of measurement data — *Guide to the expression of uncertainty in measurement JCGM 100:2008 (GUM 1995 with minor corrections)*. Sèvres: BIPM; 2008. Disponibile all'indirizzo: <https://www.bipm.org/en/publications/guides/>; ultima consultazione 15/05/2020.
2. Joint Committee for Guides in Metrology. *International Vocabulary of Metrology (IVM) – Basic and General Concepts and Associated Terms (VIM 3rd edition) JCGM 200:2012 (JCGM 200:2008 with minor corrections)*. Sèvres: BIPM; 2012. Disponibile all'indirizzo: <https://www.bipm.org/en/publications/guides/>; ultima consultazione 15/05/2020.
3. Mari L. Evolution of 30 years of the International Vocabulary of Metrology (VIM). *Metrologia* 2015;52:R1-R10.
4. Bureau International des Poids et Mesures. *The International System of Units – 9th edition*. Sèvres: BIPM; 2019. Disponibile all'indirizzo: <https://www.bipm.org/en/publications/si-brochure/>; ultima consultazione 15/05/2020.
5. UNI CEI 70099:2008. *Vocabolario Internazionale di Metrologia. Concetti fondamentali e generali e termini correlati (VIM)*. Milano: UNI-CEI; 2008. Disponibile all'indirizzo: <https://www.ceinorme.it/it/normazione-it/vim/vim-content-it.html?>; ultima consultazione 15/05/2020
6. Mari L, Narduzzi C. Verso un'incertezza di classificazione – La cultura metrologica nella valutazione delle proprietà classificatorie. *Tutto Misure* 2019;21;2
7. Emons H, Fajgel A, Van der Vee AMH, Watters R. New definitions on reference materials. *Accred Qual Assur* 2006;10: 576–78.
8. ISO GUIDE 30. *Reference materials — Selected terms and definitions*. Geneva: International Organization for Standardization; 2015.
9. Biancifiori MA, Del Monte MG, Zappa G. Standardization and Reference Materials: Some Words on the Italian Situation. IV Simposio Italo-Ungherese, Pisa, settembre 1991. *Micr. Journal* 1992; 45
10. Zappa G, Del Monte MG, Troisi L. *Materiali di riferimento per il settore agroalimentare: stato attuale e necessità*. Roma: ENEA; 2000. (ENEA RT/2000/7)
11. Zappa G, Carconi P, Gatti R, Palazzo S, Portaro N, Troisi L. Preparazione di materiali di riferimento per il settore agroalimentare presentato al Convegno Nazionale “Terzo Millennio: Il futuro della Chimica Analitica nel controllo alimentare e ambientale” Università “La Sapienza” Roma 22-24 febbraio 2001
12. Zappa G, Carconi P, Gatti R, Zoani C, Costantini S, Senofonte O. ENEA resources for Reference Materials production to support Food Quality and Safety. Co-operation with the Community Reference Laboratory for Chemical Elements in Food of Animal Origin (CRL-ISS) - Scientific Symposium EFSA

- University of Parma Food Safety and Quality, Nutrition and Nano-Technology - Parma 4 ottobre 2007.
13. Zappa G, Gatti R, Zoani C, Diletti G, Scortichini G. Double-Phase Reference Materials. “The Future of Reference Materials – Science and Innovation”. November 23-25 2010, Geel, Belgium.
 14. Zappa G, Gatti R, Zoani C. *Reference Materials for Food Flavour Analysis*. IMEKO TC-8, TC-23, TC-24 Three-day Conference “Metrological traceability in the globalization age” Paris, 6-8 April 2011
 15. Zappa G. METROFOOD-RI: a new reality to develop Reference Materials for the agri-food sector. *J Phys Conf Ser* 2018;1065 23.
 16. Zappa G, Gatti R, Sangiorgio P, Zoani C. Scelta e utilizzo dei materiali di riferimento per la qualità delle misure chimiche. In: VI° Congresso “Metrologia & Qualità”; Torino 7-9 aprile 2009.
 17. ISO GUIDE 35. *Reference materials - Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability*. Geneva: International Organization for Standardization; 2017.
 18. ISO 17034:2016. *General requirements for the competence of reference material producers*. Geneva: International Organization for Standardization; 2016.
 19. Josephs RD, Koeber R, Bernreuther A, Linsinger TPJ, Schimmel H. *Development of certified reference materials for mycotoxins*. Wageningen: Academic Publishers; 2004. Disponibile all’indirizzo: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC24139>.
 20. Krska R, Josephs RD, MacDonald S, Petterson H. *The certification of the mass concentration of Zearalenone in Acetonitrile (BCR 699) and mass fraction of Zearalenone in Maize – very low level (BCR 716) Zearalenone in Maize – low level (BCR 717)*. Geel (BE): Institute for Reference Materials and Measurements; 2003. (Report EUR 20782 EN 2003).
 21. Josephs RD, Koeber R, Bernreuther A, Schimmel H, Ulbert F. *The certification of the mass fraction of aflatoxin M1 whole milk powder Certified Reference Material ERM®-BD282 (zero level), ERM®-BD283 (low level), ERM®-BD284 (high level)*. Geel (BE): Institute for Reference Materials and Measurements; 2005. (Report EUR 21202 EN 2005).
 22. Kuster L, Berthiller F, Michlmayr H, Malachova A, Fiby I, Adam G. Biotechnological Synthesis Of Deoxynivalenol-3-Glucoside and Its Fully Labeled 13c Analogue with Heterologously Expressed Enzymes and Their Analytical Application in a Stable Isotope Dilution Assay. In: De Saeger S, Logrieco A (Ed.). Report from the 1st MYCOKEY International Conference Global Mycotoxin Reduction in the Food and Feed Chain Held in Ghent, Belgium, 11–14 September 2017. *Toxins* 2017;9(9): 276.
 23. Zappa G, Gatti R, Zoani C, Sangiorgio P, Rebecchi A, Brera C, De Santis B, Debegnach F, Silvestri M, Suman M. Feasibility study for the development of new Reference Materials for mycotoxin analysis in cereals. In: 21st IMEKO World Congress on Measurement in Research and Industry, Prague, Czech 2015. p. 2134-6
 24. Pinton P, Suman M, Buck N, Dellafiora L, De Meester J, Stadler D, Rito E. *Practical guidance to mitigation of mycotoxins during food processing*. Brussels: ILSI Europe; 2019. Disponibile all’indirizzo: http://ilsi.eu/wp-content/uploads/sites/3/2020/01/Mitigation-of-Mycotoxins_report_FIN_digital-3.pdf; ultima consultazione giugno 2020