

INDICE

	PREMESSA	1
	INTRODUZIONE	2
1	SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE	2
2	RIFERIMENTI NORMATIVI	3
3	TERMINI E DEFINIZIONI	3
4	PRINCIPIO	3
5	REAGENTI	3
prospetto 1	Preparazione delle soluzioni di taratura.....	7
6	APPARECCHIATURE ED ATTREZZATURE	7
7	PROCEDIMENTO	8
8	CALCOLI	12
9	PRECISIONE	12
prospetto 2	Dati di validazione per TEA, ALT e AOH.....	13
prospetto 3	Dati di validazione per TEN e AME.....	14
prospetto 4	Relazione funzionale tra r e R , e il Valore medio.....	14
10	RAPPORTO DI PROVA	15
APPENDICE A (informativa)	ESEMPIO DI CROMATOGRAMMI	16
figura A.1	Cromatogramma ionico totale (TIC) di una soluzione di riferimento di tossine dell' <i>Alternaria</i> e dei rispettivi standard interni etichettati isotopicamente, tutti alla concentrazione di 50 ng/ml.....	16
figura A.2	Cromatogramma ionico di una soluzione di riferimento di tossine dell' <i>Alternaria</i> e dei rispettivi standard interni etichettati isotopicamente, tutti alla concentrazione di 50 ng/ml TIC, ottenuti usando una colonna Waters® Acquity HSS T3.....	17
figura A.3	Cromatogramma ionico di una soluzione di riferimento di tossine dell' <i>Alternaria</i> e dei rispettivi standard interni etichettati isotopicamente, tutti alla concentrazione di 50 ng/ml TIC, ottenuti usando una colonna Phenomenex® Gemini NX C18.....	18
APPENDICE B (informativa)	ESEMPIO DI CONDIZIONI PER SISTEMI IDONEI HPLC-MS/MS	19
prospetto B.1	Gradiente.....	19
prospetto B.2	Transizioni MRM impostate su Waters Micromass® Ultima PT.....	20
prospetto B.3	Transizioni MRM impostate su Thermo® TSQ Quantum Ultra.....	21
prospetto B.4	Transizioni MRM impostate su Sciex® QTrap 6500.....	22
APPENDICE C (informativa)	DATI DI PRECISIONE	23
prospetto C.1	Dati di precisione per il TEA nel pomodoro e nel frumento.....	24
prospetto C.2	Dati di precisione per il TEA nei semi di girasole.....	25
prospetto C.3	Dati di precisione per ALT nel pomodoro e nel frumento.....	26
prospetto C.4	Dati di precisione per ALT nei semi di girasole.....	27
prospetto C.5	Dati di precisione per AOH nel pomodoro e nel frumento.....	28

prospetto C.6	Dati di precisione per AOH nei semi di girasole	29
prospetto C.7	Dati di precisione per TEN nel pomodoro e nel frumento.....	30
prospetto C.8	Dati di precisione per TEN nei semi di girasole	31
prospetto C.9	Dati di precisione per AME nel pomodoro e nel frumento.....	32
prospetto C.10	Dati di precisione per AME nei semi di girasole	33

BIBLIOGRAFIA		34
---------------------	--	-----------

QUESTO DOCUMENTO È UNA PREVIEW. RIPRODUZIONE VIETATA

PREMESSA

Il presente documento (EN 17521:2021) è stato elaborato dal Comitato Tecnico CEN/TC 275 "Food analysis - Horizontal methods", la cui segreteria è affidata al DIN.

Alla presente norma europea deve essere attribuito lo status di norma nazionale, o mediante pubblicazione di un testo identico o mediante notifica di adozione, al più tardi entro febbraio 2022, e le norme nazionali in contrasto devono essere ritirate al più tardi entro febbraio 2022.

Si richiama l'attenzione sulla possibilità che alcuni degli elementi del presente documento possano essere oggetto di diritti di brevetto. Il CEN non deve essere ritenuto responsabile dell'identificazione di alcuni o di tutti questi diritti di brevetto.

Il presente documento è stato elaborato nell'ambito di una Richiesta di Normazione conferita al CEN dalla Commissione Europea e dall'Associazione Europea di Libero Scambio.

Qualsiasi commento o richiesta sul presente documento dovrebbe essere rivolta al proprio Ente di normazione nazionale. Una lista completa di tali enti è disponibile nel sito web del CEN.

In conformità alle Regole Comuni CEN/CENELEC, gli enti nazionali di normazione dei seguenti paesi sono tenuti a recepire la presente norma europea: Austria, Belgio, Bulgaria, Cipro, Croazia, Danimarca, Estonia, Finlandia, Francia, Germania, Grecia, Irlanda, Islanda, Italia, Lettonia, Lituania, Lussemburgo, Malta, Norvegia, Paesi Bassi, Polonia, Portogallo, Regno Unito, Repubblica Ceca, Repubblica della Macedonia del Nord, Romania, Serbia, Slovacchia, Slovenia, Spagna, Svezia, Svizzera, Turchia e Ungheria.

INTRODUZIONE

Le specie di *Alternaria*, di cui la *A. alternata* è la più diffusa, producono più di 70 metaboliti secondari, solo pochi dei quali sono stati strutturalmente identificati e registrati come micotossine [1]. I funghi dell'*Alternaria* sono parassiti comuni dei vegetali, dai cereali ai semi oleosi alla frutta ed alla verdura, tra gli altri alimenti, e la presenza di tossine dell'*Alternaria* in questi prodotti è stata ampiamente registrata [1]. Queste tossine non solo contaminano i raccolti, ma possono anche avariare gli alimenti conservati in frigorifero.

Tra queste le tossine dell'*Alternaria* le più perniciose sono l'altenuene (ALT), l'alternariolo (AOH) ed il suo etere monometilico (AME), la tentossina (TEN) e l'acido tenuazonico (TEA). L'ALT, L'AOH e l'AME sono dibenzo- α -pironi, la TEN è un tetrapeptide ciclico e il TEA è un derivato dell'acido tetramico. L'ALT e il TEA hanno mostrato un'elevata tossicità acuta, sia *in vitro* che negli esperimenti su animali. Sebbene la tossicità dell'AME e dell'AOH non sia molto acuta, ne sono stati segnalati gli effetti genotossici e mutageni [1 - 3].

Queste tossine sono l'argomento principale del presente documento, perché generalmente sono presenti nei derivati del pomodoro, nei cereali e nei semi oleosi (per es. nei semi di girasole).

AVVERTENZA 1 - Quando si attuano fasi operative con sostanze chimiche nocive è necessario adottare le opportune misure di precauzione e protezione. Si dovrebbe prendere in considerazione l'edizione più recente del regolamento sulle sostanze pericolose, cioè il Regolamento (CE) n. 1907/2006 [4], nonché le disposizioni nazionali in materia.

AVVERTENZA 2 - L'uso del presente documento può comportare l'impiego di materiali, operazioni e attrezzature pericolose. Il presente documento non ha la pretesa di trattare tutti i problemi di sicurezza associati al suo utilizzo. È responsabilità dell'utilizzatore del presente documento stabilire le pratiche di sicurezza e salute appropriate e determinare la compatibilità delle limitazioni legislative prima dell'uso.

AVVERTENZA 3 - Alcune tossine dell'*Alternaria* mostrano effetti genotossici e mutageni.

1

SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Nel presente documento si specifica una procedura per la determinazione di cinque tossine dell'*Alternaria* nel frumento, nella passata di pomodoro e nei semi di girasole, mediante una cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) abbinata ad una spettrometria di massa tandem (MS/MS).

Questo metodo è stato validato su campioni di frumento, passata di pomodoro e semi di girasole, contaminati in modo naturale e addizionati.

Per l'altenuene (ALT) sono stati usati livelli di validazione variabili da 2,18 µg/kg a 13,8 µg/kg.

Per l'alternariolo (AOH) sono stati usati livelli di validazione variabili da 1,82 µg/kg a 46,7 µg/kg.

Per l'etere monometilico di alternariolo (AME) sono stati usati livelli di validazione variabili da 1,29 µg/kg a 47,2 µg/kg.

Per la tentossina (TEN) sono stati usati livelli di validazione variabili da 5,29 µg/kg a 218 µg/kg.

Per l'acido tenuazonico (TEA) sono stati usati livelli di validazione variabili da 41,8 µg/kg a 1 618 µg/kg.

Limiti di quantificazione di 1 µg/kg per l'ALT (tranne nei semi di frumento e di girasole - rispettivamente - 1,4 µg/kg e 1,2 µg/kg), l'AOH e l'AME; con questo metodo sono ottenibili 5 µg/kg per la TEN e 10 µg/kg per il TEA, o quantità minori.