

VI Congresso Nazionale Micotossine e Tossine Vegetali nella filiera agro-alimentare



*Nobile Collegio Chimico Farmaceutico
Aula Pocchiari Istituto Superiore di Sanità
Roma 10-12 giugno 2019*



CERTIFICAZIONE DI MATERIALI DI RIFERIMENTO NELL'ANALISI DELLE MICOTOSSINE



***Giovanna Zappa
ENEA SSPT-BIOAG***

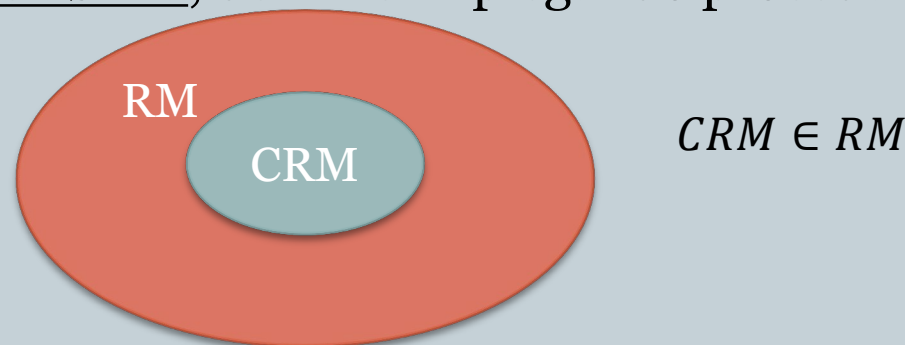
Materiale di riferimento (RM) e Materiale di riferimento certificato (CRM)

5.13 Materiale di riferimento (Reference Material, RM)

materiale sufficientemente omogeneo e stabile rispetto a proprietà specificate, che si è stabilito essere idoneo per l'utilizzo previsto in una **misurazione** o nell'esame di **proprietà classificatorie**

5.14 materiale di riferimento certificato (Certified reference material, CRM)

materiale di riferimento accompagnato da un documento rilasciato da un organismo di confacente autorità, nel quale sono riportati i valori di una o più proprietà specificate, con le corrispondenti incertezze, riferibilità e rintracciabilità, definite impiegando procedure valide



Proprietà e valori delle proprietà

Proprietà MISURABILI

GRANDEZZE

Valore espresso da un **numero** accompagnato da un **riferimento**

unità di misura

massa di un corpo
125 kg

procedura

durezza Rockwell C
43.5 HRC (150 kg)

materiale di riferimento

quantità di insulina somministrata 8 UI

MATERIALI di RIFERIMENTO Certificati

Proprietà NON MISURABILI

PROPRIETÀ CLASSIFICATORIE

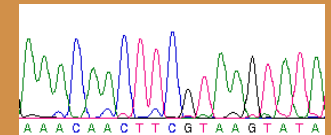
Valore espresso con parole o codici alfanumerici



sex



identity



genetic sequence

MATERIALI di RIFERIMENTO

Misurazione e Metrologia



2.1 Misurazione

processo volto a ottenere sperimentalmente uno o più **valori** che possono essere ragionevolmente attribuiti a una **grandezza**

NOTA 1 La **misurazione** non si applica a **proprietà classificatorie**

2.2 Metrologia

scienza della **misurazione** e delle sue applicazioni

NOTA La **metrologia** comprende tutti gli aspetti teorici e pratici della **misurazione**, qualunque sia l'**incertezza di misura** e il campo d'applicazione.

In discussione (JCGM WG2) per la prossima edizione del **VIM**:

measurement

process of experimentally obtaining one or more values that can reasonably be attributed to a **quantity**, **an ordinal property** or a **nominal property**

metrology

science of **measurement** and its application



Il concetto di CRM nelle diverse definizioni



3.6 campione materiale (campione di misura materiale)

Fonte: UNI-CEI 70099 (VIM)

strumento di misura che riproduce o fornisce, in modo permanente durante il suo impiego, **grandezze** di una o più **specie**, ciascuna con un **valore** assegnato
ESEMPI Massa campione, campione di volume (che fornisce uno o più **valori**, con o senza una **scala di misura**), resistore elettrico campione, riga graduata, blocchetto pian parallelo, generatore di segnali campione, **materiale di riferimento certificato**.

2.2

certified reference material

CRM

reference material (RM) characterized by a metrologically valid procedure for one or more specified properties, accompanied by an RM certificate that provides the value of the specified property, its associated uncertainty, and a statement of metrological traceability

Fonte: ISO-REMCO Guide 30:2015

Note 1 to entry: The concept of value includes a nominal property or a qualitative attribute such as identity or sequence. Uncertainties for such attributes may be expressed as probabilities or levels of confidence

ISO_REMCO: COMMITTEE on Reference Materials



PUBLISHED STANDARD

ISO Guide 30:2015	Reference materials -- Selected terms and definitions
ISO Guide 31:2015	Reference materials -- Contents of certificates, labels and accompanying documentation
ISO Guide 33:2015	Reference materials -- Good practice in using reference materials
ISO Guide 35:2017	Reference materials -- Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability
ISO/TR 79:2015	Reference materials - Examples of reference materials for qualitative properties
ISO/TR 80:2014	Guidance for the in-house preparation of quality control materials (QCMs)
ISO/TR 10989:2009	Reference materials -- Guidance on, and keywords used for, RM categorization
ISO/TR 11773:2013	Global distribution of reference materials
ISO/TR 16476:2016	Reference materials -- Establishing and expressing metrological traceability of quantity values assigned to reference materials

STANDARDS UNDER DEVELOPMENT

ISO Guide 30:2015/NP Amd 1	Revisions of definitions for reference material and certified reference material
ISO/WD Guide 85	Guidance for the production of reference materials having one or more assigned qualitative property values
ISO/WD Guide 86	Guidance for pure reference materials for small organic

ISO GUIDE 34



ISO 17034: 2016 General requirements for the competence of reference material producers



ISO 17034

ISO Guide 34 (ISO 17034)
covering the required "competence of RM producers"

ISO Guide 31
on accompanying
documentation for RMs
(content of certificates /
RM labels / statements /
transport docs etc.)

ISO Guide 35
on "characterisation and
certification of RMs"

ISO Guide 30
on definitions and
terminology related
to RMs (incl. a
thesaurus)

Guides

ISO Guide 33
on uses of RMs
(incl. calibration, method
validation & verification, control
charts, value transfer, PTs...)

ISO Guide 80
guidance for the in-
house preparation of
quality control
materials (QCMs)

TR 79
Reference Materials for qualitative analysis – Examples of reference materials
certified for nominal properties

TR 10989
Reference materials – Guidance on, and keywords used for, RM
categorization

TR 11773
Global distribution of reference materials

TR 16476
Reference materials – Current status of establishing and expressing metrological
traceability of quantity values assigned to reference materials

General Requirements (7.1)



	RM	CRM
assessment of homogeneity	x	x
assessment of stability	x	x
characterization of the material	if appropriate	x
establishment of commutability	if appropriate	if appropriate
assignment of property values and for certified values their uncertainties	if appropriate	x
establishment metrological traceability of certified values		x
availability of a certificate, including information on stability, metrological traceability and the degree of homogeneity		x

Produzione attuale di CRM per l'analisi delle micotossine e tossine vegetali



- EU-Joint Research Centre (BCR, IRMM, ERM): 25 CRM di cui 17 matrix CRM e 8 Calibrant solution + 3 nuovi matrix CRM in preparazione
- LGC: 6 matrix CRM + 5 Calibrant solution
- Dr Ehrenstorfer Reference Materials: 2 Calibrant solution
- MUVA: 5 matrix CRM

	Mais	Mangimi	Latte	Succo di mela	Grano e derivati	arachidi e derivati	Pistacchi	Paprika	Orzo
EU-JRC	ZON, DON, NIV	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2	AFM1		OTA, DON	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2	AFB1, AFB2	AFB1, AFG1, OTA	OTA
LGC	ZON	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2	AFM1						
MUVA			AFM1	Patulina					

Database ENEA: (C)RM per il settore agroalimentare (in aggiornamento)

Materiali di Riferimento certificati per l'analisi delle micotossine



- Sostanze pure
- Soluzioni certificate

- Matrix RM

Spiked matrix RM

Materiali certificati attraverso il processo di produzione

Materiali certificati attraverso la misura dei valori delle proprietà

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

Joint Research Centre

Certified reference materials for testing of mycotoxins



Trichothecenes

Code	Material	Certified value
IRMM-315	4-deoxynivalenol (DON) in acetonitrile, 4 mL	25.1 ± 1.2 µg/g
IRMM-316	Nivalenol (NIV) in acetonitrile, 4 mL	24.0 ± 1.1 µg/g
BCR-377	4-deoxynivalenol (DON) in maize flour, 150 g	< 0.05 mg/kg
BCR-396	4-deoxynivalenol (DON) in wheat flour, 150 g	< 0.05 mg/kg
ERM-BC717	deoxynivalenol (DON) nivalenol (NIV) in maize, 60 g	673 ± 87 µg/kg 53 ± 10 µg/kg

Zearalenone, Ochratoxin A

Code	Material	Certified value
ERM-AC699	zearalenone (ZON) in acetonitrile, 4 mL	9.95 ± 0.30 µg/ml
ERM-BC716	zearalenone (ZON) in maize, 60 g	< 5 µg/kg
ERM-BC717	zearalenone (ZON) in maize, 60 g	83 ± 9 µg/kg
BCR-471	ochratoxin A (OTA) in wheat, 55 g	< 0.6 µg/kg

Aflatoxin M₁

Code	Material	Certified value
BCR-423	aflatoxin M ₁ in chloroform, 2.5 mL	9.93 µg/ml (not certified)
ERM-BD282	whole milk powder (zero level), 30 g	< 0.02 µg/kg
ERM-BD283	whole milk powder (low level), 30 g	0.111 ± 0.018 µg/kg
ERM-BD284	whole milk powder (high level), 30 g	0.44 ± 0.06 µg/kg

The JRC currently provides nearly 800 different reference materials under the BCR, IRMM and ERM brands in the fields of food and feed analysis, environmental analysis, engineering and health applications.

Aflatoxins B₁, G₁, B₂ and G₂

Code	Material	Certified value
ERM-AC057	aflatoxin B ₁ in acetonitrile, 4 mL	Aflatoxin B ₁ 3.79 ± 0.11 µg/g
ERM-AC058	aflatoxin B ₂ in acetonitrile, 4 mL	Aflatoxin B ₂ 3.80 ± 0.08 µg/g
ERM-AC059	aflatoxin G ₁ in acetonitrile, 4 mL	Aflatoxin G ₁ 3.78 ± 0.13 µg/g
ERM-AC060	aflatoxin G ₂ in acetonitrile, 4 mL	Aflatoxin G ₂ 3.80 ± 0.07 µg/g
BCR-401R	peanut butter, 100 g	Aflatoxin B ₁ < 0.2 µg/kg Aflatoxin B ₂ < 0.2 µg/kg Aflatoxin G ₁ < 0.2 µg/kg Aflatoxin G ₂ < 0.2 µg/kg
BCR-305R	peanut butter, 100 g	Aflatoxin B ₁ 1.77 ± 0.30 µg/kg Aflatoxin B ₂ 0.48 ± 0.08 µg/kg Aflatoxin G ₁ 0.9 ± 0.4 µg/kg Aflatoxin G ₂ 0.30 ± 0.12 µg/kg Sum aflatoxins B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂ 3.5 ± 0.5 µg/kg
BCR-264	peanut butter, 150 g	Aflatoxin B ₁ 206 ± 13 µg/kg
BCR-262R	defatted peanut meal, 100 g	Aflatoxin B ₁ < 3 µg/kg
BCR-263R	defatted peanut meal, 100 g	Aflatoxin B ₁ 17.1 ± 2.4 µg/kg Aflatoxin B ₂ 3.0 ± 0.4 µg/kg Aflatoxin G ₁ 3.0 ± 0.5 µg/kg Aflatoxin G ₂ 0.62 ± 0.21 µg/kg (not certified) Sum aflatoxins B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂ 23.7 ± 2.5 µg/kg (not certified)
BCR-375	compound feed, 50 g	Aflatoxin B ₁ < 1 µg/kg
ERM-BE375	compound feed, 150 g	Aflatoxin B ₁ 2.6 ± 0.4 µg/kg Aflatoxin B ₂ 0.20 ± 0.04 µg/kg Aflatoxin G ₁ 0.40 ± 0.10 µg/kg Aflatoxin G ₂ < 0.2 µg/kg
ERM-BE376	compound feed, 150 g	Aflatoxin B ₁ 12.9 ± 1.8 µg/kg Aflatoxin B ₂ 0.60 ± 0.10 µg/kg Aflatoxin G ₁ 5.2 ± 0.8 µg/kg

Zearalenone (ZON) in Acetonitrile e in Mais (low e very low level)*

Table 6.3: Certified ZON content of BCR-699 presented as mass concentration ($\mu\text{g/mL}$)

BCR No.	Certified value	Uncertainty	No. of accepted sets of results (p)
699	9.95 $\mu\text{g/mL}$ ¹⁾	0.30 $\mu\text{g/mL}$ ²⁾	- ³⁾

- 1) This value is the concentration based on weighed amount, purity and dilution steps.
- 2) The uncertainty is the expanded uncertainty ($k = 2$) of the value defined in 1).
- 3) The values are based on preparation data and confirmed experimentally by 3 laboratories.

Table 6.4: Certified ZON contents of BCR-716 and -717 presented as mass fraction ($\mu\text{g/kg}$)

BCR No.	Certified value	Uncertainty	No. of accepted sets of results (p)
716	< 5 $\mu\text{g/kg}$	-	20
717	83 $\mu\text{g/kg}$ ⁴⁾	9 $\mu\text{g/kg}$ ⁵⁾	18

- 4) This value is the unweighted mean of p accepted mean values, independently obtained by p laboratories.
- 5) The uncertainty is the expanded uncertainty ($k = 2$) of the value defined in 4).

Fonti d'incertezza nella preparazione del CRM BCR-699 (ZON in Acetonitrile)

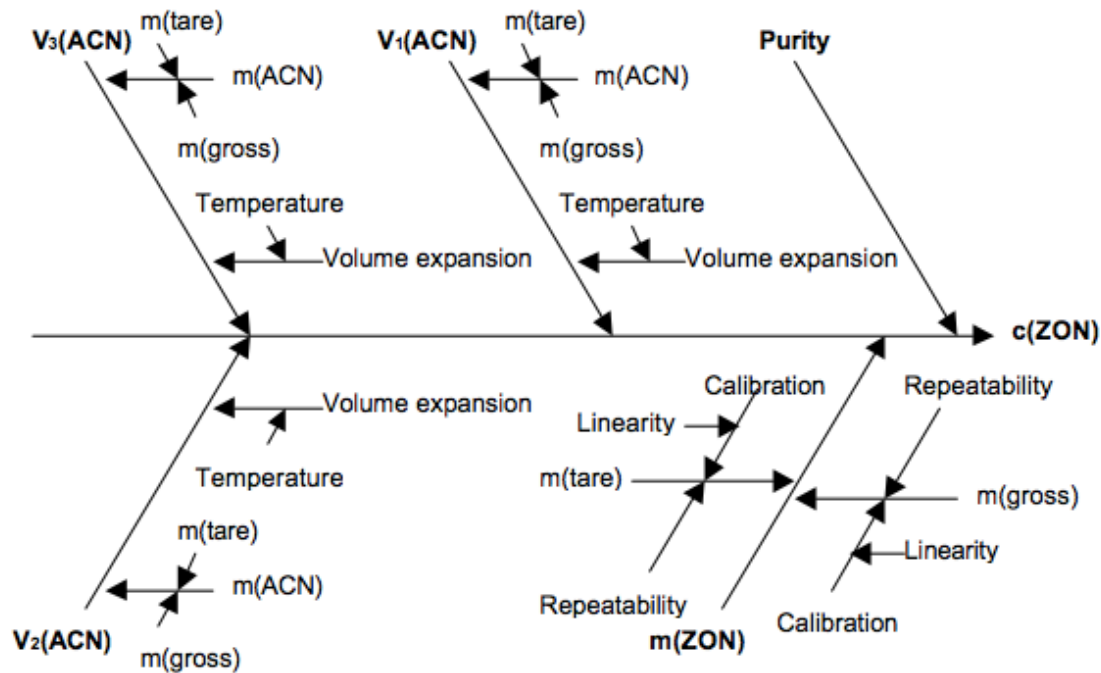


Figure 6.1: Fishbone diagram for the uncertainty calculation of ZON in acetonitrile - BCR-699

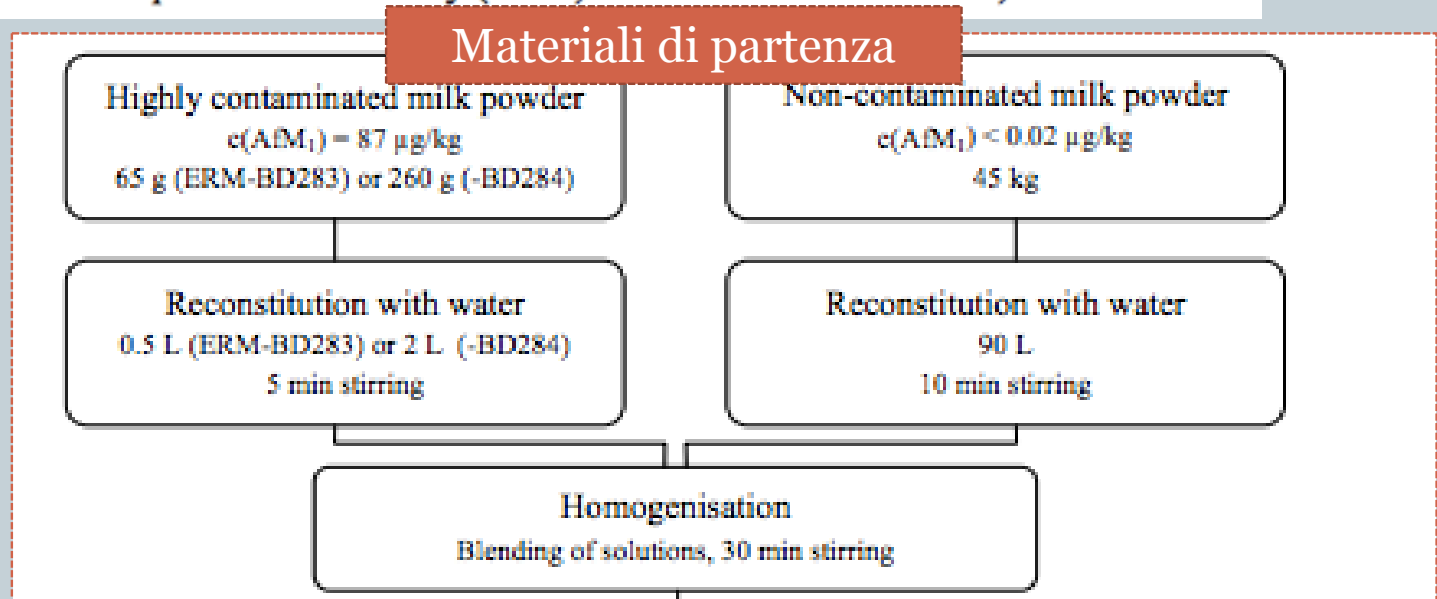
Aflatossina M1 in milk powder *



ERM No.	Certified value	Uncertainty	No. of accepted sets of results (p)
ERM-BD282	$< 0.02 \mu\text{g/kg}$	-	9
ERM-BD283	$0.111 \mu\text{g/kg}^{1)}$	$0.018 \mu\text{g/kg}^{2)}$	7
ERM-BD284	$0.44 \mu\text{g/kg}^{1)}$	$0.06 \mu\text{g/kg}^{2)}$	8

- 1) This value is the unweighted mean of p accepted mean values, independently obtained by p laboratories.
- 2) The uncertainty is the expanded uncertainty ($k = 2$) of the value defined in 1).

Preparazione dei livelli low (ERM-BD283) high (ERM-BD284)



Fonti di incertezza*



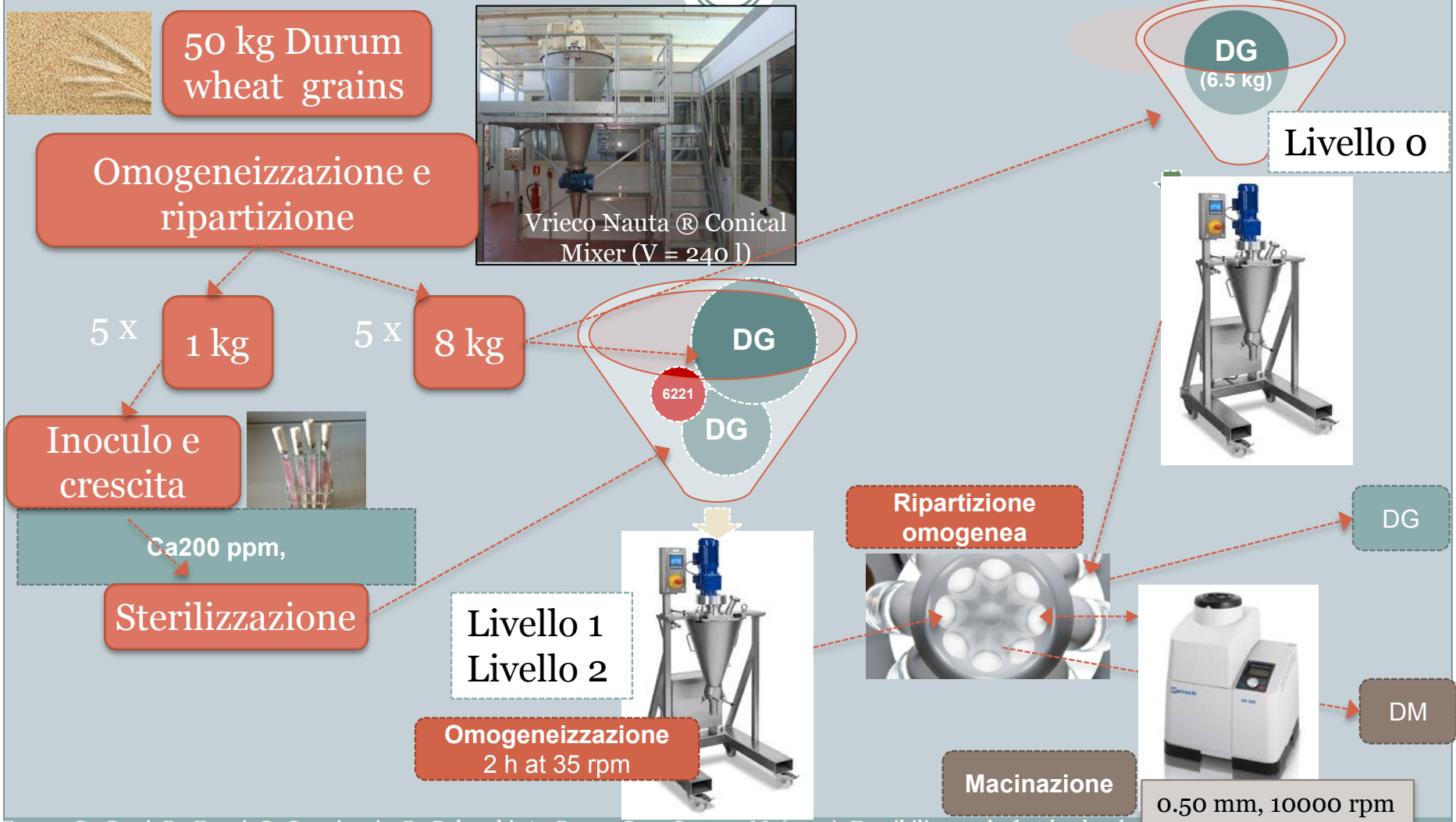
Table 4.2: Evaluation of the expanded uncertainties for the AfM₁ content of ERM-BD283 (low level) and ERM-BD284 (high level)

	AfM ₁ in milk powder	
	ERM-BD283 (low level)	ERM-BD284 (high level)
u_{char} (%)	2.2	1.7
u_{bb} (%)	0.89	0.77
u_{its} (%)	7.4	6.3
Combined uncertainty (%)	7.8	6.6
Certified value ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.111	0.442
Combined uncertainty ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.0086	0.0291
Expanded uncertainty ¹⁾ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.018	0.059
Expanded uncertainty ¹⁾ (%)	15.6	13.2

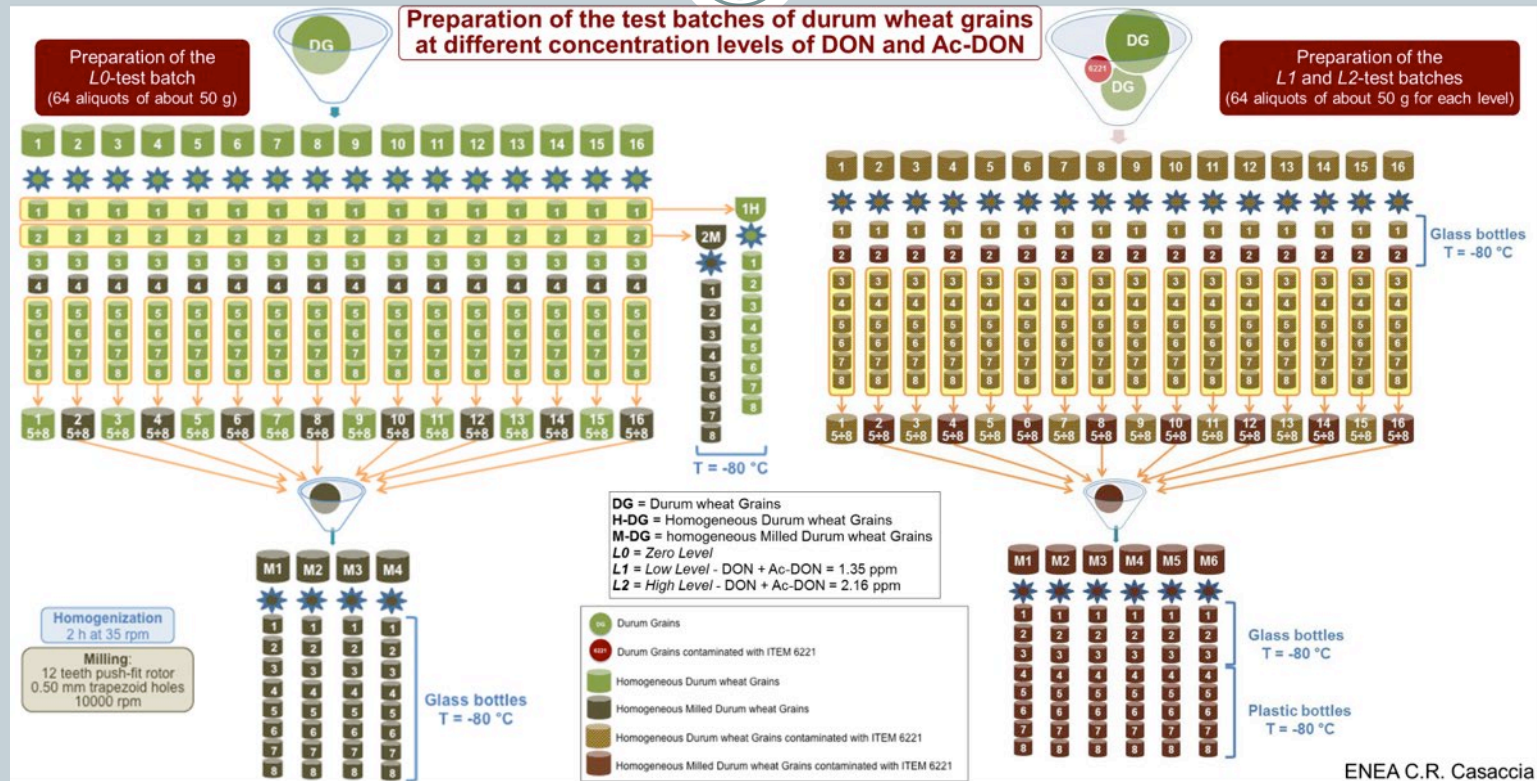
1) A coverage factor ($k = 2$) was applied to obtain expanded uncertainties.

Studio di fattibilità per la realizzazione di nuovi materiali di riferimento per l'analisi di micotossine nei cereali

(ENEA – ISS - Barilla – UCSC) Progetto Cluster Safe&Smart - set2013-gen2019



Schema di ripartizione, re-miscelazione e macinazione



Caratterizzazione dei materiali e Omogeneità

Tabella 4. Parametri di validazione del metodo

Parametro	DON	3AcDON	15AcDON
R _A (%)	108	69	64
SSE (%)	118	71	70
R _E (%)	88	97	121
LOQ (µg/kg)	50	25	25
Livello 1			
Valore medio (µg/kg)	741	207	<LOQ
Deviazione standard (µg/kg)	146	37	-
RSD _r (%)	20	18	-
Livello 2			
Valore medio (µg/kg)	918	233	<LOQ
Deviazione standard (µg/kg)	131	41	-
RSD _r (%)	14	18	-

Tabella 5. Valutazione dell'omogeneità dei materiali

	Livello 1		Livello 2	
	DON	3AcDON	DON	3AcDON
S² sam	2122.110	358.576	3984.489	856.170
Valore critico per S² sam	25435.313	2073.690	25815.868	2938.513

Valutazione irraggiamento γ e stabilità a lungo termine *



Risultati 2017 (Barilla)*	$\mu\text{g}/\text{kg}^*$	
	DON	$^3\text{AcDON}$
L2 bottle A2.8	1149	212
L2_Bottle B4.8	1109	190
L2_IRR-A 10kGray	1129	133
L2_IRR-B 25kGray	1112	156

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

* Risultati preliminari in corso di elaborazione

Riflessioni a conclusione dello studio di fattibilità



- La procedura di preparazione (inoculo, diluizione, macinazione, omogeneizzazione, ripartizione) si è dimostrata adeguata ed ha fornito ottimi risultati in termini di omogeneità e stabilità a breve termine
- È necessario ridurre ulteriormente l'incertezza nella caratterizzazione e prevedere l'utilizzo di un calibrant comune durante l'esercizio interlaboratorio
- La commutabilità del materiale è da approfondire
- La radiosterilizzazione può fornire un'ulteriore garanzia di stabilità
- La stabilità dei materiali a lungo termine (4 anni) è risultata sufficiente a T -80°C, mentre per le altre T la sperimentazione dovrà essere ripetuta
- Nel caso di stabilità non sufficiente si potrà valutare anche la possibilità di preparare RM in forma di estratti (intermedi di procedura analitica)

Grazie per l'attenzione!

*Giovanna Zappa
ENEA C.R. Casaccia
Via Anguillarese 301
giovanna.zappa@enea.it*