

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA, ANIMALI, ALIMENTI, RISORSE NATURALI E
AMBIENTE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE E TECNOLOGIE PER
L'AMBIENTE E IL TERRITORIO

Determinazione di matrina e ossimatrina nel miele e loro valutazione come nuovi contaminati alimentari

Relatore: Prof. A. Tapparo

Co-relatore: Dott.ssa M. Martinello

Laureanda: Lavinia Guerra

Matricola 2092111

Anno Accademico: 2023/2024

Sommario

ABSTRACT

1. INTRODUZIONE	1
1.1 STRUTTURA CHIMICA DI MATRINA ED OSSIMATRINA	1
1.2 ORIGINE DELLE MOLECOLE E UTILIZZI	2
1.3 UTILIZZO NELLA MEDICINA	4
1.4 UTILIZZO COME PESTICIDI	5
1.5 TOSSICITÀ DELLE SOSTANZE	6
1.6 MATRINA E OSSIMATRINA NEL MIELE	8
1.7 METODI ANALITICI ESISTENTI	10
2. SCOPO DELLA TESI	13
3. MATERIALI E METODI	15
3.1 REAGENTI	15
3.2 STANDARD UTILIZZATI	15
3.3 PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI	17
3.4 STRUMENTAZIONE	17
3.5 ALTRI MATERIALI	18
3.6 CAMPIONI DI MIELE	18
3.7 FASE DI ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE	20
3.8 METODO CROMATOGRAFICO	21
3.9 CONDIZIONI DELLO SPETTROMETRO DI MASSA	21
3.10 VALIDAZIONE	23
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	27
4.1 OTTIMIZZAZIONE DELLA TECNICA DI PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	27
4.2. OTTIMIZZAZIONE DEL METODO DI RILEVAZIONE	28
4.3. RISULTATI DELLA VALIDAZIONE	30
4.4. ANALISI DI CAMPIONI REALI	36
5. CONCLUSIONI	45
6. BIBLIOGRAFIA	47
7. RINGRAZIAMENTI	53

Abstract

Matrina e ossimatrina sono due alcaloidi chinolizidinici derivanti da diverse piante, principalmente del genere *Sophora*. Queste piante vengono storicamente utilizzate nei paesi asiatici come erbe medicinali, grazie ai loro molteplici effetti farmacologici, ad esempio a fini antitumorali e antinfiammatori. Più di recente matrina e ossimatrina hanno iniziato ad essere utilizzate anche come principi attivi in alcuni pesticidi, grazie alla loro attività acaricida e insetticida. Ancora non ci sono sufficienti dati sulla loro presenza negli alimenti e sugli eventuali effetti tossici di queste sostanze nell'uomo e in generale negli organismi viventi incluse le api. Il loro utilizzo come pesticidi è vietato dall'Unione Europea, per cui il relativo livello massimo residuale (MRL) negli alimenti è stabilito in termini cautelativi pari a 0.01 mg/kg. Ci sono state varie segnalazioni in questi anni di superamento di questo limite negli alimenti ed in particolare nel miele di acacia. La Commissione Europea li include tra le sostanze di interesse da analizzare nel miele nell'ambito dei piani di controllo nazionali. In tale ottica, nella presente tesi è stato messo a punto e validato un metodo di analisi per la determinazione di matrina e ossimatrina nel miele mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS). La metodica ottimizzata è stata quindi applicata all'analisi di 30 campioni di miele di origine italiana e di 30 campioni di miele provenienti dall'estero per verificare se queste molecole potessero rappresentare una effettiva contaminazione anche nei mieli reperibili in Italia.

Dai risultati ottenuti si può affermare che il metodo in LC-MS/MS risulta valido ed affidabile e i risultati della validazione sono in linea con i criteri di accettabilità stabiliti dal documento SANTE/11312/2021. I risultati dall'analisi sui campioni si sono rivelati rassicuranti, in quanto i mieli di origine italiana sono risultati tutti privi di tali sostanze, che sono invece state riscontrate in due campioni di miele di acacia di origine estera in concentrazioni inferiori al limite di quantificazione del metodo, che coincide con l'LMR (0,01 mg/kg) nel miele, e quindi comunque in concentrazioni tali da non rappresentare un rischio per la salute umana o per la commercializzazione del prodotto.

1. Introduzione

Gli alcaloidi sono composti organici naturali generalmente basici e principalmente eterociclici, contenenti azoto. In tutto se ne conoscono più di 100000 (Trapella C., 2016). Sono il più grande gruppo di metaboliti secondari delle piante e sono spesso tossici per gli animali. Questo fa pensare che vengano prodotti dalle piante con scopo di difesa dai predatori (Trapella C., 2016). Oltre che nelle piante, vengono ritrovati meno frequentemente anche in funghi e animali.

All'interno del grande gruppo degli alcaloidi di origine vegetale si trovano le molecole matrina e ossimatrina.

1.1 Struttura chimica di matrina ed ossimatrina

La matrina (figura 1a) è un alcaloide chinolizidinico tetraciclico, ovvero un composto eterociclico azotato il cui scheletro centrale è dato dal composto organico chinolizidina (figura 1c) (Cely – Veloza W. et al., 2023). La formula chimica della matrina è $C_{15}N_{24}N_2O$, peso molecolare 248,36 g/mol e CAS n. 519-02-8. È formata da quattro anelli esagonali che possono formare 8 diversi isomeri, tra i quali il più stabile è quello con conformazione a sedia (Galasso V. et al., 2006). È solubile in acqua, benzene, cloroformio, metanolo, etanolo e parzialmente solubile in etere di petrolio. Ha punto di fusione 76 °C e punto di ebollizione 396,7 °C, per questo allo stato puro, a temperatura ambiente, si presenta sottoforma di polvere giallastra (Chapman and Hall, 1997) (Sun. X et al., 2022).

L'ossimatrina (figura 1b) è un alcaloide chinolizidinico tetraciclico generato a seguito dell'ossidazione della matrina. Ha formula chimica $C_{15}H_{24}N_2O_2$ e peso molecolare 264.36 g/mol. La sostanza è solubile in acqua, etanolo e metanolo. Ha punto di fusione 208°C, per questo allo stato puro, a temperatura ambiente, si presenta sottoforma di polvere di colore bianco (Chapman and Hall, 1997).

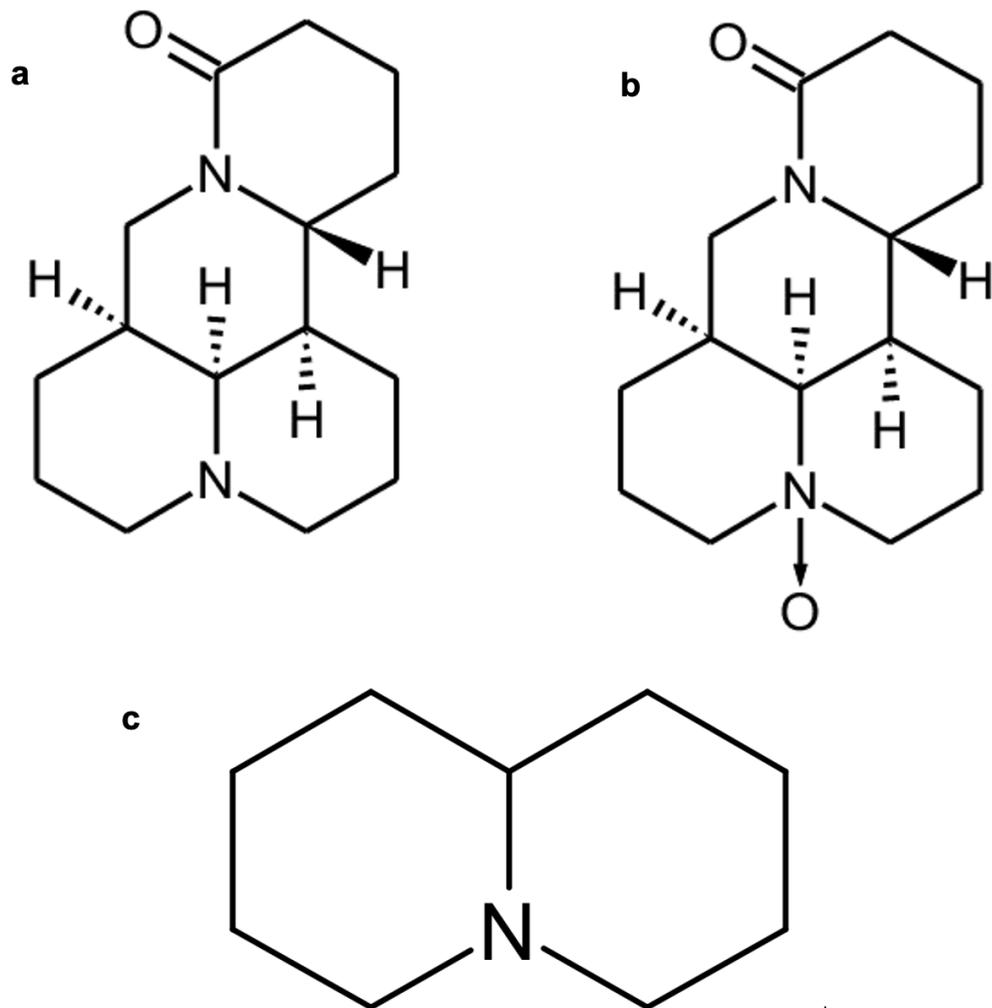


Figura 1. Struttura chimica di matrina (a), ossimatrina (b), chinolizidina (c)
(Fischer B et al., 2024)

1.2 Origine delle molecole e utilizzi

Matrina e ossimatrina vengono prodotte principalmente dalle piante appartenenti alla famiglia delle Fabaceae (leguminose). La caratteristica condivisa da tutte le specie appartenenti a questa famiglia è la presenza del legume o baccello. Questo frutto della pianta è costituito da un carpello che contiene i semi. In particolare, queste sostanze vengono ritrovate nelle piante del genere *Sophora*, *Goebilia*, *Vexibia* ed *Euchresta*.

Le maggiori concentrazioni di matrina e ossimatrina si trovano nelle piante del genere *Sophora*, il quale comprende circa 52 specie fra piccoli alberi e arbusti. Le piante di questo genere sono molto utilizzate dal punto di vista ornamentale, grazie al fogliame fine, verde scuro ed ai rami penduli di alcune varietà. Meno comunemente vengono utilizzate anche per il legname. Sono piante native

dell'Asia del Sud, Australia, regione Pacifica e di alcune zone del Nord America (Abd-Alla H, et al., 2021). Nelle piante del genere *Sophora* il contenuto di matrina e ossimatrina arriva all'1-2% in peso nelle radici essiccate e generalmente la quantità di ossimatrina risulta essere predominante rispetto quella di matrina (Federal Institute for risk assesment, 2023). Queste tossine vegetali sono sintetizzate come una naturale difesa verso i predatori, come ad esempio insetti, funghi e batteri.



Figura 2. Pianta di *Sophora flavescens* (plants of the world online, 2024)

La prima estrazione della matrina è stata fatta partendo dalla radice di *Sophora flavescens* (figura 2), conosciuta nella medicina tradizionale cinese con il nome di kushen (Zhang B et al., 2023), che sembra essere anche la pianta con il maggior

contenuto di questa sostanza. Successivamente la molecola è stata ritrovata, in altre specie del genere *Sophora* come *Sophorae tonekiensis* e *Sophora alopecuroides*.

Viene inoltre ritrovata in *Gymnospermium albertii*, pianta della famiglia delle *Berberidaceae* (Sun. X et al., 2022).

Analogamente anche l'ossimatrina è presente principalmente in *Sophora flavescens*, ma anche in *Sophora alopecuroides*, *Sophora moorcroftiana*, *Sophora tonkinensis* e *Sophora subprostata*.

Oltre alle molecole di nostro interesse, che rappresentano comunque gli alcaloidi presenti in maggior concentrazione in queste piante, vengono prodotti anche altri alcaloidi chinolizidinici appartenenti alla stessa famiglia, caratterizzati dallo stesso scheletro tetraciclico basico. Alcuni di questi differiscono soltanto per la stereochimica, come allomatrina e sofordina, altri contengono uno o più doppi legami, come soforamina, o gruppi idrossilici come soforanolo. (Boiteau L et al., 1998).

Tutti questi alcaloidi vengono estratti dalle piante al fine di essere utilizzati per svariati scopi.

1.3 Utilizzo nella medicina

Sin dall'antichità le piante del genere *Sophora* sono state utilizzate come erbe medicinali, soprattutto in Cina e nei paesi dell'Asia Orientale. Risultavano infatti utili per curare febbre, infezioni batteriche, problemi al cuore, reumatismi, eczemi, coliti, infezioni faringeo-tonsillari, dissenteria, emorragie ed altri disturbi gastrointestinali (Abd-Alla H, et al., 2021), questo grazie alle molecole in esse contenute.

Dopo anni di pratiche in campo medico, matrina e ossimatrina risultano essere sostanze dai molteplici effetti che continuano ad essere utilizzate in prevenzione di malattie cardiovascolari, per i loro effetti antitumorali e antinfiammatori. Risultano efficaci, inoltre, nel trattamento di disturbi cronici come epatite virale, fibrosi polmonare, aritmie e disturbi autoimmuni. Ne sono stati evidenziati però anche effetti epatotossici e possibili effetti genotossici (Federal institute for risk assesment, 2023). È ad oggi difficile stabilire quali siano le dosi di assunzione accettabili a causa della mancanza di dati sulla loro presenza negli alimenti e sulla loro tossicità.

1.4 Utilizzo come pesticidi

Negli ultimi anni è emersa sempre di più la necessità di sviluppare nuove tipologie di pesticidi, in quanto i classici composti chimici, spesso altamente tossici, favoriscono lo sviluppo di resistenza da parte degli insetti portando ad un necessario incremento della dose.

In risposta a questa problematica sono stati sviluppati nuovi pesticidi di origine botanica, detti anche “pesticidi green”, i quali risultano invece avere tendenzialmente un’alta efficienza, minor tossicità e minor residuo (in quanto più facili da degradare). Anche matrina ed ossimatrina trovano impiego in questo campo, utilizzate come componente principale, assieme ad altri composti attivi, in molti bio - pesticidi ad ampio spettro (Cheng X et al., 2020). Esse possiedono infatti moderata attività insetticida, batteriostatica, acaricida, fungicida e nematocida.

I pesticidi contenenti matrina e ossimatrina vengono utilizzati specialmente nei paesi asiatici come Bangladesh, Cina e Vietnam (Zhang B et al., 2023). In Cina più di 90 aziende hanno registrato 115 formulazioni di pesticida che utilizzano la matrina come composto attivo (Hui X. Et al, 2023).

L’attività insetticida della matrina è stata testata su diverse specie di insetti, fra cui la zanzara della febbre gialla (*Aedes aegypti*), zanzara anofele della malaria (*Anopheles gambiae*) e mosca comune (*Musca domestica*), nelle quali la matrina risulta essere tossica per contatto. Provoca in generale una riduzione dell’energia e del movimento degli insetti, andando ad agire su diversi target e sistemi fisiologici. Ha effetti sulle giunzioni neuromuscolari e sui recettori del GABA (Acido gamma-amminobutirrico), inoltre blocca i canali del potassio. Non è ancora stato definito quale sia l’esatto meccanismo di azione con cui la molecola esercita la sua tossicità verso gli insetti. (Bloomquist J et al., 2018).

Anche per l’ossimatrina è stata dimostrata l’attività insetticida su diverse specie, fra cui pupe e adulti di zanzara (*Culex pupiens*) (Mohamed M, et al., 2023), e acari come il ragnetto rosso (*Tetranychus urticae*) (Marčić D, et al., 2014).

Oltre ad essere tossiche per contatto, sembra che queste sostanze siano insetticidi sistemici, ovvero insetticidi che vengono assorbiti dalle colture e accumulati in radici, semi e foglie, venendo poi trasmessi agli organismi infestanti tramite ingestione. Questo meccanismo funziona particolarmente bene per contrastare gli afidi (Sun Z et al., 2023).

Vista la bassa attività di matrina e ossimatrina come prodotti fitosanitari, i dosaggi di queste molecole, usate come pesticidi, risultano essere elevati. Apportando delle modifiche alla struttura di base tramite reazioni chimiche, si è riusciti ad incrementare il potere insetticida ottenendo sostanze con alta efficienza e bassa tossicità (Cheng X et al., 2020; Zhang B et al., 2023). Così facendo è possibile diminuire la quantità di pesticida utilizzato.

Per quanto riguarda il destino ambientale di queste molecole non ci sono ancora molti dati, ma sembra che la matrina abbia un tempo di dimezzamento che va dai 6.7 ai 21.9 giorni nel terreno di coltivazione di cetrioli e cavoli; e un tempo di dimezzamento di 7,64 giorni nel tabacco. Questa molecola fatica ad arrivare nelle profondità del suolo, concentrandosi nella fascia più superficiale (primi 10 cm). Viene facilmente degradata nelle acque di stagni o fiumi (Hui J. et al., 2023).

1.5 Tossicità delle sostanze

Le sostanze matrina e ossimatrina sono classificate come pesticidi nell'Unione europea rispettivamente dal 2019 e dal 2021. Sono classificate come sostanze non approvate/rischiose secondo Il Reg. (EC) No 1107/2009, il quale definisce le regole relative alle autorizzazioni dei prodotti commerciali per la protezione delle piante all'interno della comunità Europea. Questo perché, per via dei pochi dati tossicologici in merito, sono sostanze trattate come pericolose in via precauzionale. Non è stato ancora determinato un limite tossicologico ed in questi casi il limite massimo residuale (LMR) negli alimenti, ossia il tenore massimo di residuo di pesticida ammesso per legge in alimenti o mangimi, viene fissato in via precauzionale al livello più basso possibile, ossia 0,010 mg/kg sulla base dell'articolo 18 (l) (b) del Reg. (CE) n. 396/2005. Il LMR può essere modificato e ricalcolato dopo una valutazione esaustiva delle proprietà del principio attivo e della destinazione d'uso del pesticida e si applica anche ai prodotti alimentari d'importazione per agevolare il commercio internazionale (efsa.europa.eu, 2024). In Cina, invece, dove queste sostanze vengono attivamente utilizzate, il valore di LMR per queste tossine è definito per alcuni alimenti. Ad esempio, il valore stabilito per pere e cetrioli è di 5 mg/kg, mentre quello per gli agrumi è di 1 mg/kg (Anastassiaeds M, et al., 2023).

Non è stato possibile con i dati raccolti fino ad ora determinare per matrina e ossimatrina un valore di acceptable daily intake (ADI), ovvero la quantità di

sostanza nel cibo o acqua potabile che può essere assunta giornalmente da un individuo nel corso della vita senza che ci siano rischi apprezzabili per la salute (efsa.europa.eu, 2024); né un valore di acute reference dose (ARfD), ovvero la quantità di sostanza nel cibo o acqua potabile che può essere ingerita in un breve periodo di tempo, di solito un pasto o un giorno, senza che ci siano apprezzabili rischi di salute per il consumatore. (ECHA, 2016).

Residui di matrina e ossimatrina sono stati ritrovati in vari alimenti, fra cui le radici di liquirizia ed i loro estratti. L'istituto federale tedesco per la valutazione dei rischi (BfR) ha esaminato il rischio per la salute in seguito ad assunzione di matrina e ossimatrina con le radici di liquirizia, concludendo che il danno genetico da matrina e ossimatrina è "improbabile". Il report riporta una serie di studi scientifici, tra cui uno studio cinese non pubblicato del 2020 che ha individuato per la matrina un valore di ADI di 0,1 mg/kg di peso corporeo (bw) al giorno. Questo dato è stato ottenuto a seguito di studi di tossicità acuta della matrina sui topi. La modalità di somministrazione per via sottocutanea, utilizzata in questo studio, non risulta però appropriata per un'analisi dei rischi secondo BfR. Secondo studi effettuati dall' RDA scientific consultants GMBH, una società di consulenze tedesca, le concentrazioni di matrina e ossimatrina assumibili sono assimilabili al threshold of toxicological concern (TTC) definito dall'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) di 1,5 µg/kg bw al giorno. Questo valore rappresenta la soglia di allarme tossicologico, un limite di esposizione prudenziale, in assenza di sufficienti dati tossicologici specifici alla sostanza chimica (efsa.europa.eu, 2024). Nello stesso report vengono presentati anche dati ricavati da studi di tossicità sub-cronica fatti sul ratto, utilizzando un estratto a concentrazioni note di matrina e ossimatrina, da cui si è definito un NOAEL (no observed adverse effect level) di 10 mg estratto/kg (per entrambe le sostanze) attribuendo un valore di ADI provvisorio di 0,91 µg/kg bw/gg per matrina e 2,135 µg/kg bw/gg per ossimatrina. Viene evidenziato però che partendo da un estratto complesso di pianta è difficile definire con certezza se gli effetti tossici osservati siano dovuti a matrina e ossimatrina o ad altre sostanze. (Federal Institute for risk assesment, 2023).

Il Bio-pesticide database dell'università dell'Hertfordshire (BPDB), fornisce proprietà di pesticidi e bio-pesticidi per singolo principio attivo elencando, dove disponibili, le caratteristiche fisiche e chimiche, tossicologia e metabolismo, destino e comportamento ambientale ed ecotossicologia della sostanza. È un

database autorevole in quanto viene aggiornato regolarmente e viene effettuato il controllo di qualità ai dati inclusi. La matrina è presente nella lista dei bio-pesticidi del BPDB (<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/bpdb/Reports/3135.htm>) e nella sezione riguardante gli effetti della molecola sulla salute umana, viene riportata l'indicazione di bassa tossicità, segnalando però anche in modo evidente la mancanza di dati significativi a riguardo. Nello stesso database, per quanto riguarda i dati sull'ecotossicità, viene citato uno studio (Wu et al., 2010) che riporta un'elevata tossicità della matrina sui bombi. In particolare, viene studiato l'effetto del pesticida Kingbo, contenente lo 0,6% di matrina in soluzione acquosa, sulle specie *Bombus hypocrita*, *Bombus ignitus* e *Bombus patagiatus* determinando un valore di LD₅₀ (quantità di una sostanza che determina la morte del 50% di una popolazione in saggi di tossicità acuta) per esposizione per ingestione. Sono stati riscontrati valori di LD₅₀ per il pesticida molto bassi, ovvero di 0,0005 µg/insetto per *Bombus ignitus* e *Bombus patagiatus* ed un valore di 0,002 µg/insetto per *Bombus hypocrita*.

1.6 Matrina e ossimatrina nel miele

Le api (*Apis mellifera*), sono insetti notoriamente in declino, a causa di diversi fattori che spesso agiscono in sinergia tra di loro, come cambiamenti nell'uso del suolo, agricoltura intensiva, perdita di biodiversità vegetale, agenti patogeni, inquinanti e cambiamenti climatici. A questo si aggiunge il fatto che sono sensibili a molti agrofarmaci utilizzati nelle colture, incluse le molecole in esame.

Apis mellifera risulta essere di particolare interesse anche da un punto di vista economico, grazie al suo contributo all'impollinazione delle colture agricole. Durante la sua attività di foraggiamento entra in contatto con svariati inquinanti, diventando così un indicatore ambientale di alta sensibilità. Le api, infatti, possono raggiungere distanze di bottinamento molto elevate, fino ai 10 Km ed un singolo alveare può avere sotto il proprio controllo fino a 7 Km² di superficie. Questo permette alle api di intercettare gli inquinanti di una vasta area, fra cui pesticidi e metalli pesanti. Monitorare il comportamento e la mortalità di questa specie permette di individuare situazioni critiche e alterazioni dello stato di salute ambientale (Celli G et al., 2003; Rabea E, et al., 2010). La composizione del miele prodotto dalle api è affetta dall'origine floreale del polline, dall'origine geografica, condizioni climatiche e altri fattori. Quando le api prendono il nettare da piante

nettariifere velenose, le sostanze tossiche possono essere trasferite al miele, in particolare questo accade per gli alcaloidi. Allo stato attuale sono molti gli alcaloidi ritrovati nel miele: alcaloidi pirolozidinici, isochinolinici, chinoloni, tropanici, matrina e ossimatrina.

Nel 2010 è stato svolto uno studio sull'effetto dell'ossimatrina presente nei pesticidi nei confronti di *Apis mellifera*, determinando un valore di LC₅₀ (dose della sostanza che determina la morte del 50% degli individui in saggi di tossicità acuta per somministrazione diretta) di 10,60 mg/L. In particolare, è stato dimostrato l'effetto inibitorio dell'ossimatrina nei confronti dell'attività dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE), il quale è presente nella membrana post-sinaptica e giunzioni colinergiche e permette l'idrolisi di acetilcolina in colina e acetato, controllando trasmissione dell'impulso nervoso. L'inibizione dell'attività di tale enzima porta ad effetti letali e subletali nell'ape. (Rabea I. et al., 2010).

Il RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) è un sistema rapido di allerta, ideato nel 1979 dal Consiglio europeo per permettere una rapida diffusione delle informazioni legate a rischi per la salute umana derivanti da alimenti e mangimi nel mercato europeo. È descritto nell'Articolo 50 del Regolamento (CE) n. 178/2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare (Ministero della Salute, 2024). Questo strumento permette, oltre una rapida diffusione delle informazioni, anche un'immediata azione di risposta ai rischi e l'eliminazione di prodotti che possono risultare dannosi per i consumatori. Il database online consultabile, denominato RASFF Window, offre l'accesso pubblico alle informazioni riassuntive sulle più recenti notifiche RASFF e consente di cercare informazioni su qualsiasi notifica emessa in passato (attualmente dal 2020 in poi). Dal 2020 sono state emesse 21 segnalazioni relative a presenza di matrina e ossimatrina sopra il limite definito per legge in diversi tipi di prodotti, come mangime per pesci, polvere e radici di liquirizia, miele, frutta (es. avocado e uva), tè. Le segnalazioni mostrano superamenti nei limiti previsti sia in prodotti provenienti da paesi europei (es. Belgio, Francia), che da paesi extraeuropei (es. Cina, Perù) (Commissione europea, RASFF, 2024). In particolare, per quanto riguarda il miele, sono state ad oggi pubblicate cinque notifiche relative alla presenza di matrina e ossimatrina in miele proveniente dalla Cina da parte di Spagna, Belgio e altre nazioni. È stato segnalato anche il

ritrovamento di queste sostanze nei preparati alimentari per api di allevamento (Commissione europea, RASFF, 2024), ma la maggior parte dei rilievi riguarda miele di acacia proveniente dalla Cina.

Non è ancora chiara l'origine delle sostanze ritrovate in questo miele, anche se ci sono diverse ipotesi. Ad esempio, in alcune zone del nord-est della Cina dove si produce miele d'acacia, avvengono fioriture quasi contemporanee di piante d'acacia e piante di *Sophora davidii*, queste ultime particolarmente ricche in contenuto di matrina e ossimatrina. Di conseguenza nel momento in cui le api raccolgono il nettare di acacia è possibile che vadano a foraggiare anche nettare di *S. davidii*, producendo miele che contiene residui di matrina e ossimatrina (Zongyan, C. et al., 2022). In alternativa è possibile che tracce di questi composti vengano introdotte nel miele attraverso l'uso di formulazioni commerciali di agrofarmaci a base di matrina e ossimatrina nella regione.

Visto che al momento il limite massimo residuale imposto dall'Unione Europea (0,01 mg/kg) risulta essere basso rispetto i quantitativi ritrovati nel miele di origine cinese l'Unione Europea ha invitato la Cina a presentare una richiesta di tolleranza all'importazione di miele con matrina e ossimatrina, che sarà accolta se riceverà una valutazione favorevole da parte dell'EFSA (Luetjohann J. et al., 2023).

1.7 Metodi analitici esistenti

Al momento in letteratura si possono trovare alcuni metodi per la ricerca di questi alcaloidi. Questi metodi si sono sviluppati in primis per la ricerca di matrina e ossimatrina nelle piante e nei loro estratti. Per questo scopo si utilizzano metodologie in HPLC accoppiata alla spettrometria di massa a mobilità ionica (Jia X, et al., 2021), HPLC-MS/MS (Cang S, et al., 2019), Molecular imprinting extraction accoppiata con HPLC-MS/MS (Ma X, et al., 2018). Alcuni di questi metodi sono stati applicati successivamente a matrici più complesse; ad esempio, HPLC-MS/MS è stata applicata al plasma di ratto (Jiang M, et al., 2015), il molecular imprinting accoppiato ad HPLC-MS/MS all'identificazione delle molecole nel suolo (Yin R, et al., 2019) e l'ettroforesi capillare alla ricerca su campioni di urina (Chu C, et al., 2019).

Per quanto riguarda la ricerca di matrina e ossimatrina negli alimenti, i metodi presenti sono ancora molto pochi, e quelli noti sono stati messi a punto soprattutto per la loro ricerca nel miele. Fra questi ritroviamo un metodo per la determinazione

di matrina in campioni di frutta e verdura mediante estrazione in fase solida e successiva analisi rimediante LC-MS (Liu X. Et al, 2014).

Esiste poi il metodo ufficiale sviluppato dall'EURL per la determinazione dei pesticidi altamente polari negli alimenti (aggiornato nel 2023), che permette l'analisi dei residui di numerosi pesticidi polari, fra cui matrina e ossimatrina, in molte tipologie di alimenti di origine vegetale e nel miele. Questo metodo consiste nell'estrazione dal campione con metanolo acidificato e successiva analisi in LC-MS/MS. Per quanto riguarda le condizioni strumentali, la determinazione di matrina e ossimatrina viene effettuata in spettrometria di massa con ionizzazione ESI in modalità positiva, dopo separazione su colonna cromatografica BEH Amide 2.1 x 100mm 1.7 μ m. (Anastassiaeds M, et al., 2023).

Un altro metodo messo a punto da Zongyan C et al., (2022), applicato ai mieli di acacia, consiste nell' estrazione in fase solida del campione utilizzando una colonnina MPX 60mg/3ml e successiva analisi mediante LC-MS/MS, utilizzando la colonna cromatografica Agilent EclipsePlus C18, lavorando in modalità ESI positivo.

Il metodo del gruppo di Wang, applicato ai mieli cinesi, consiste nell' estrazione del campione in fase solida utilizzando una colonnina MCX (60mg) e successiva analisi mediante HPLC-MS/MS, utilizzando la colonna cromatografica Atlantis T3 (2.1 mm x 150 mm, 3 μ m), lavorando in ESI positivo (Wang Z et al., 2023).

2. Scopo della tesi

Lo scopo principale di questo progetto è quello di mettere a punto e validare un metodo di analisi per la determinazione delle molecole matrina e ossimatrina nel miele, impiegando una tecnica di estrazione in fase solida e l'analisi in cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS). Tale metodica, ottimizzata e validata, è inoltre utilizzata per analizzare 30 campioni di miele di origine italiana e di 30 campioni di miele provenienti dall'estero per verificare se queste molecole possano rappresentare una effettiva contaminazione anche nei mieli reperibili comunemente nel commercio in Italia.

3. Materiali e metodi

Lo studio è stato realizzato interamente presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE) di Legnaro, in particolare nel laboratorio del Centro di Referenza Nazionale per l'Apicoltura (CRNA).

Il metodo sviluppato per la determinazione di matrina e ossimatrina nel miele prevede l'utilizzo della cromatografia liquida ad alta prestazione (UHPLC). Gli analiti di interesse vengono separati in una colonna cromatografica BEH Amide 2.1 x 100 mm, 1.7 µm, e rivelati in spettrometria di massa tandem.

3.1 Reagenti

- Acido formico (FA) di grado LC-MS, 98-100%, Chem-Lab ANALYTICAL (Zedelgem, Belgio);
- Metanolo (MeOH) di grado LC-MS, ≥ 99.9%, della Sigma-Aldrich® (Merck KGaA, Dramstadt, Germania);
- Ammoniaca (NH₄OH), soluzione 30%, Carlo Erba reagents® (Val de Reuil Cedex, Francia);
- Acetonitrile (ACN) di grado LC-MS della Supelco® (Merck KGaA, Dramstadt, Germania);
- Ammonio formiato (NH₄Form), ≥ 99.995%, Sigma-Aldrich® (Merck KGaA, Dramstadt, Germania);
- Acido ortofosforico, 85%, Carlo Erba reagents® (Val de Reuil Cedex, Francia).

3.2 Standard utilizzati

Sono stati acquistati gli standard di riferimento per le seguenti molecole:

- Matrina in polvere, ≥ 95,0%, Merck life science (Darmstadt, Germania);
- Ossimatrina in polvere, ≥ 95,0%, Merck life science (Darmstadt, Germania);
- Ossimatrina deuterata, in polvere, LGC (Middlesex, UK);
- Matrina deuterata, in polvere, LGC (Middlesex, UK).

I composti standard in polvere sono stati conservati in congelatore a -20 °C ± 7°C e protetti dalla luce fino al momento di preparazione delle soluzioni.

Sono state preparate le soluzioni madre standard concentrate pesando 10 mg di ciascuno standard e successivamente sciogliendoli in 10 mL di ACN (1 mg/mL).

- Le soluzioni di matrina e ossimatrina deuterate sono state ulteriormente diluite prima a 10 mg/kg (ppm) e poi a 200 µg/kg (ppb) in ACN preparando una miscela delle due. La miscela viene utilizzata come standard interno che viene iniettata, grazie ad una particolare modalità di lavoro, dall'autocampionatore dello strumento assieme al campione in ogni corsa cromatografica. In particolare, l'ago dell'autocampionatore preleva prima una quantità predefinita di standard interno, successivamente viene risciacquato ed utilizzato per l'iniezione del campione. Standard e campione vengono così sottoposti alle stesse condizioni cromatografiche e ionizzati contemporaneamente nella sorgente della spettrometria di massa.
- Le soluzioni standard di matrina e ossimatrina, utilizzate per costruire la retta di taratura in solvente/matrice, sono state ulteriormente diluite prima a 10 mg/kg e successivamente fino a 1 ppm in ACN preparando una soluzione standard mix dei due composti.

Queste soluzioni sono state utilizzate per la messa a punto del metodo, per la validazione e per l'analisi dei campioni.

Tutte le soluzioni vanno conservate al buio in congelatore. Se correttamente conservate, hanno come data di scadenza di 6 mesi dalla data di preparazione.

A partire dalla standard mix a concentrazione 1 ppm, sono state predisposte delle diluizioni in fase ricostituente (10 % di 50 mM NH₄Form a pH 3 (fase mobile acquosa) in ACN) a diverse concentrazioni: 5, 15, 25, 35 e 50 ppb, utilizzate per costruire una retta in solvente. La stessa standard mix è stata utilizzata anche per costruire una retta in matrice alle stesse concentrazioni della retta in solvente, aggiungendo i volumi calcolati di standard mix all'estratto di un miele sicuramente privo di matrina e ossimatrina utilizzato come matrice negativa.

Le due rette sono state confrontate allo scopo di studiare l'effetto matrice, e successivamente la retta in matrice è stata utilizzata per la quantificazione delle concentrazioni di campioni e addizionati.

Le concentrazioni di campioni e addizionati sono state determinate utilizzando la formula:

$$Y = mX + q$$

Dove:

Y = area del picco;

X = concentrazione dello standard in nanogrammi per millilitro,

m (slope) = pendenza della curva;

q = intercetta con l'asse y

3.3 Preparazione delle soluzioni

- La soluzione acquosa di formiato d'ammonio (NH₄Form 0,1 M) utilizzata per l'estrazione è stata preparata pesando 3,153 g di NH₄Form disciolto in un matraccio da 500 mL assieme a 10 mL di acido fosforico, portando a volume con acqua milliQ. La soluzione è stata conservata in frigorifero a +5°C ± 3°C per un mese.
- La soluzione eluente, NH₄OH al 5% in MeOH, è stata preparata aggiungendo 12,5 mL di NH₄OH in matraccio da 250 mL e portando a volume con MeOH. La soluzione si prepara all'uso.
- La fase mobile acquosa (A), 50 mM NH₄Form, viene preparata sciogliendo 1,576g di NH₄Form in 500 mL di acqua milliQ sotto agitazione meccanica. La soluzione è stata portata a pH 3 aggiungendo gradualmente alcune gocce di acido formico e leggendo il valore del pH in tempo reale attraverso il pHmetro. La soluzione è stata conservata al buio, in frigorifero a +5°C ± 3°C, conservata per massimo una settimana.
- La fase ricostituente è stata preparata miscelando in proporzioni 1:9 la fase mobile acquosa in ACN. La soluzione si prepara all'uso.

3.4 Strumentazione

- Bilancia analitica, sensibilità di 0,1 mg (Radwag AS 220X2, Germania);
- Micropipette da 20, 100, 200, 500, 1000 e 5000 µm (Eppendorf, Germany) con idonei puntali;
- Dispensatore da 50 mL (Eppendorf, Germany);
- Agitatore per provette Vortex (Heidolph Multi Reax); (Velp Scientifica, ZX3, Advanced Vortex Mixer);

- Centrifuga per provette (Universal 32 R, Hettich Zentrifugen; MPW Med Instruments, Centrifuge MPW – 352R);
- pHmetro (Mettler Toledo, PH/Ion meter S220)
- Sistema di evaporazione sottovuoto rotativo (RapidVap® della LabConco®);
- Sistema UHPLC – MS/MS 8045, (Shimadzu, Giappone) costituito da:
 - Sistema cromatografico con:
 - pompa HPLC (Shimadzu, LC-30 AD, Giappone);
 - autocampionatore (Shimadzu, SIL-30 AC, Giappone);
 - forno termostato per colonna (Shimadzu, CTO-20 AC, Giappone);
 - colonna BEH Amide 2.1 x 100 mm 1.7 µm (ACQUITY UPLC®, Waters, Paesi Bassi);
 - sistema di degassaggio (Shimadzu, DGU-20 A5R, Giappone);
 - Software utilizzato: LabSolution versione 6.122 (Shimadzu, Giappone);
 - Spettrometro di massa a triplo quadrupolo: LC-MS-8045, (Shimadzu, Giappone).

3.5 Altri materiali

- Cartucce SPE Oasis® MCX 3cc (60 mg) extraction cartridges (Waters,USA);
- Camera di eluizione (J.T. Baker, Avantor®, Milano);
- Provette di plastica da 50 mL coniche con tappo a vite (Clearline®, Cina);
- Provette di plastica da 15 mL coniche con tappo a vite (Sarsted, Numbrecht, Germania);
- Vials autofiltranti Verex PTFE 0.2 µm (Phenomenex, USA).

3.6 Campioni di miele

I campioni di miele utilizzati per lo sviluppo e la validazione del metodo sono campioni precedentemente acquistati dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie a fini di ricerca negli anni 2023 e 2024. Parte dei mieli di origine estera analizzati a fini statistici sono stati acquistati ad hoc per questo progetto di tesi nei supermercati locali. Sono stati analizzati 30 campioni di origine nazionale e 30 di origine internazionale, di diverse origini botaniche, come indicato in tabella 1.

Tabella 1: elenco dei campioni di miele analizzati per sviluppo, validazione e analisi

ID Campione	Origine botanica	Paese di provenienza
1	Castagno	Italia
2	Fiori del bosco	Italia
3	Acacia	Italia
4	Millefiori	Italia
5	Tiglio	Italia
6	Millefiori	Italia
7	Eucalipto	Italia
8	Limone	Italia
9	Fiori del bosco	Italia
10	Arancia	Italia
11	Tarassacco	Italia
12	Castagno	Italia
13	Castagno	Italia
14	Melata	Italia
15	Millefiori	Italia
16	Sulla	Italia
17	Coriandolo	Italia
18	Tiglio	Italia
19	Barena	Italia
20	Fiori	Italia
21	Millefiori	Italia
22	Arancio	Italia
23	Arancio	Italia
24	Fiori	Italia
25	Castagno	Italia
26	Millefiori	Italia
27	Acacia	Italia
28	Millefiori	Italia
29	Trifoglio	Italia
30	Tiglio	Italia
31	Millefiori	Italia, Argentina, Ungheria, Moldavia
32	Acacia	Ungheria
33	Fiori	Ungheria
34	Millefiori	Ungheria, Ucraina
35	Millefiori	Ucraina, Romania, Thailandia, Argentina, Guatemala
36	Millefiori	Ungheria, Ucraina
37	Tiglio	Romania
38	Millefiori	Ungheria, Ucraina
39	Acacia	Ungheria
40	Acacia	Repubblica di San Marino
41	Millefiori	Turchia
42	Millefiori	Bulgaria
43	Manuka	Australia
44	Acacia	Romania

45	Acacia	Romania, Moldavia, Isola di Formosa, Ucraina, Ungheria
46	Acacia	Ungheria, Moldavia, Ucraina, Isola di Formosa
47	Acacia	Ucraina, Serbia
48	Acacia	Ungheria, Romania
49	Fiori	Argentina, Romania, Thailandia, Vietnam
50	Fiori	Argentina, Vietnam, Ucraina, Thailandia, Romania
51	Millefiori	Ungheria, Ucraina
52	Millefiori	Bulgaria, Romania
53	Fiori	Guatemala, Argentina, Ucraina, Thailandia, Vietnam, Romania
54	Millefiori	Turchia
55	Fiori	Romania, Brasile
56	Millefiori	Romania, Argentina, Ucraina, Vietnam, Thailandia
57	Sconosciuto	Israele
58	Millefiori	Ungheria, Romania
59	Acacia	Argentina, Ucraina, Romania
60	Castagno	Ungheria

3.7 Fase di estrazione e purificazione

Matrina e ossimatrina sono state estratte dal miele secondo il metodo descritto da Wang Z., et al. (2022) a cui sono state apportate alcune modifiche e ottimizzazioni. Viene pesato 1g di miele per ogni campione, a cui vengono aggiunti 10 mL di una soluzione acquosa di NH₄Form contenete il 2% di acido fosforico. La miscela viene agitata vigorosamente, fino a completo scioglimento del miele. La miscela viene poi agitata 10 min in vortex e successivamente posta 10 min in centrifuga a 5000 rpm e temperatura ambiente.

La soluzione viene caricata nella cartuccia MCX, preventivamente condizionata con 3 mL di metanolo e 3 mL di acqua. Successivamente la cartuccia viene lavata con 6 mL di acqua e 6 mL di metanolo. Gli analiti vengono poi eluiti con 5 mL di una soluzione al 5% di NH₄OH in metanolo. L'eluato viene evaporato a secchezza, mediante evaporatore rotante sottovuoto termostatato a temperatura di 50°C.

Il residuo secco viene solubilizzato con 1 mL di soluzione ricostituente (10% di fase mobile acquosa in acetonitrile) agitando mediante vortex per un minuto per sciogliere completamente l'estratto. Si trasferiscono 500 µL di soluzione in vials autofiltranti, con filtro di dimensione 0,22 µm, prima di essere analizzarli mediante HPLC-MS/MS.

3.8 Metodo cromatografico

Di seguito vengono riportate le condizioni strumentali di analisi cromatografica:

- Eluente A: 50 mM di NH₄Form in acqua milliQ
- Eluente B: ACN
- Flusso: 0,3 mL/min
- Volume di iniezione: 0,3 μ L
- Temperatura colonna: 40°C
- Durata dell'acquisizione: 8.50 min

Di seguito (tabella 2) vengono riportati i parametri cromatografici che definiscono il profilo utilizzato in LC.

Tabella 2. Parametri cromatografici: gradiente LC

Tempo (min)	% Fase mobile A	% Fase mobile B (ACN)	Flusso (mL/min)
0	3	97	0.3
0.50	3	97	0.3
3.50	60	40	0.3
4.50	60	40	0.3
4.60	3	97	0.3
8.50	3	97	0.3

3.9 Condizioni dello spettrometro di massa

Nella presente sperimentazione l'analisi strumentale è stata effettuata utilizzando come analizzatore uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo (Shimadzu LCMS-8045, figura 3), con ionizzazione *electrospray* (ESI) positiva.

Il sistema è composto da:

- Sorgente ionica: ESI;
- Analizzatore di massa: Q1 e Q3 (triplo quadrupolo);
- La rivelazione viene eseguita mediante spettrometria di massa con monitoraggio a reazione multipla (MRM);
- I parametri ottimizzati sono che portano a una sensibilità maggiore sono indicati nelle tabelle 3 e 4.



Figura 3. Sistema LCMS-8045 (Shimadzu, Japan)

Tabella 3. Parametri di acquisizione degli ioni frammento con relativi parametri di massa

Analita	Precursore > ione frammento (m/z)	CE (V)	Tempo di ritenzione (min)
matrina	248.95 > 148.05	- 32.0	3.555
	248.95 > 96.15	- 42.0	
	249.05 > 110.15	- 40.0	
	248.95 > 176.16	- 34.0	
ossimatrina	264.95 > 136.15	- 34.0	3.572
	265.05 > 148.15	- 31.0	
	264.95 > 205.10	- 28.0	
	264.95 > 247.30	- 28.0	

matrina - D3	252.05 > 148.10	- 30.0	3.554
	251.95 > 96.15	- 44.0	
	251.95 > 122.15	- 42.0	
ossimatrina - D3	268.05 > 208.30	- 30.0	3.570
	268.05 > 250.30	- 30.0	
	268.05 > 148.20	- 28.0	

N.B. Gli ioni frammento evidenziati in grassetto sono gli ioni utilizzati come quantificatori.

Tabella 4. Parametri della sorgente ESI

Parametro	Valore
Temperatura dell'interfaccia	350° C
Temperatura DL	200° C
Temperatura di desolvatazione	602°C
Flusso gas riscaldamento	5 L/min
Temperatura blocco termico	300° C
Flusso gas essiccazione	10 L/min
Flusso gas nebulizzante	3 L/min

Lo standard interno, una mix composta di matrina e ossimatrina deuterati (200 ppb), viene iniettato assieme al campione dall'autocampionatore dell'HPLC, come indicato al paragrafo 3.2. Il volume iniettato è 0,3 µL ad ogni corsa.

3.10 Validazione

Per la validazione del metodo sono state seguite le linee guida del documento "SANTE/11312/2021 - Analytical Quality Control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed", integrate ai requisiti della norma ISO IEC 17025:2017.

In particolare, si verificano i seguenti parametri:

- Sensibilità/ linearità: La linearità di un metodo analitico è determinata dalla sua capacità di produrre risultati direttamente proporzionali alla presenza di un analita, in relazione alla sua quantità nel campione. Questa viene verificata mediante costruzione di una retta di calibrazione su almeno 5 punti, di cui il

punto minore deve essere \leq al LOQ (limite di quantificazione). Per soddisfare il parametro di linearità, i residui (%) devono essere $\leq 20\%$.

$$\text{Residuo [\%]} = \frac{\text{valore teorico} - \text{valore reale}}{\text{valore teorico}} \cdot 100\%$$

In cui per valore teorico si intende il valore di area (nel nostro caso il rapporto con lo standard interno) dell'analita calcolato matematicamente con i parametri di retta (concentrazione del punto di retta, intercetta e pendenza), e valore reale ottenuto a seguito delle analisi.

- Limite di quantificazione (LOQ): La concentrazione o la massa minima di analita che soddisfa i criteri di identificazione e di prestazione del metodo per recupero e precisione. È opportuno che il LOQ sia inferiore o uguale al limite massimo residuale (LMR) definito per legge, che in questo caso è di 10 ppb sia per matrina che per ossimatrina.
- Effetto matrice: Viene calcolato in quanto la matrice può influenzare la risposta strumentale, generando fenomeni di soppressione o di arricchimento del segnale. L'effetto matrice (ME%) viene valutato per entrambi gli analiti, mediante confronto delle risposte ottenute dalla lettura di una soluzione standard in solvente e una soluzione standard in estratto matrice. Il limite di accettabilità per questo valore è $\pm 20\%$. Nel caso in cui il valore sia superiore. Gli effetti matrice devono essere eliminati o compensati con una calibrazione corrispondente alla matrice o l'utilizzo di uno standard interno.
- Specificità: La capacità di un detector (supportata da adeguate procedure di estrazione, clean-up e derivatizzazione, se necessario) nel rilevare univocamente un analita. Questo parametro viene valutato mediante risposta del bianco reagente e del bianco matrice, che deve essere $<$ del 30% RL.
- Esattezza: Vicinanza (accuratezza) dell'accordo tra il valore medio ottenuto da un serie di risultati di analisi e il valore vero. Viene valutata mediante la media dei recuperi percentuali, per ogni livello di addizionamento, basandosi su almeno 5 campioni. Nel nostro caso è stata valutata per campioni addizionati a 10 ppb e a 40 ppb. Il calcolo del recupero viene effettuato mediante la seguente formula:

$$\text{Recupero [\%]} = \frac{\text{concentrazione determinata}}{\text{concentrazione aggiunta}} \cdot 100$$

Per essere accettabile il valore del recupero percentuale deve essere tra 70% e 120%.

- Precisione: La precisione, ovvero il grado di concordanza fra misure ripetute, è stata valutata come deviazione standard relativa di ripetibilità (RSD_r %) per tutti gli analiti analizzati e per ogni livello di concentrazione. È stata calcolata con la seguente formula:

$$RSDr [\%] = \frac{\text{deviazione standard}}{\text{media}} \cdot 100$$

Per rientrare nei criteri di accettabilità il valore deve essere ≤ 20 %.

4. Risultati e discussione

4.1 Ottimizzazione della tecnica di preparazione del campione

Per andare a definire la metodologia di preparazione del campione, riportata nel capitolo 3.7, si sono tenute in considerazione le difficoltà legate alla determinazione di matrina e ossimatrina a basse concentrazioni e soprattutto le problematiche derivanti dall'analisi della matrice miele.

La composizione del miele stesso, caratterizzata da un'elevata concentrazione di zuccheri e pigmenti, tende a dare luogo ad un forte "effetto matrice" che può comportare, a causa degli interferenti presenti in fase di ionizzazione, una soppressione o un innalzamento del segnale cromatografico degli analiti. Le caratteristiche intrinseche della matrice possono inoltre portare nel tempo ad una diminuzione della sensibilità dello strumento utilizzato in seguito ad un accumulo di residui a livello della sorgente o dell'analizzatore.

Non è stata seguita la procedura di preparazione del campione indicata nel metodo ufficiale QuPPE di EURL-SRM (Anastassiades et al., 2015), in quanto prevedeva una semplice separazione liquido/liquido, che non permetteva il raggiungimento di un'adeguata pulizia del campione considerando la tipologia di strumentazione disponibile presso il laboratorio. Di conseguenza la preparativa del campione si è basata sul metodo di Wang (Wang et al., 2023), a cui sono state apportate diverse modifiche.

Di seguito si riportano i diversi passaggi e relativa ottimizzazione del metodo di preparazione del campione:

- **Dimensione del campione:** Inizialmente la dimensione del campione utilizzata, scelta basandosi sul metodo di Wang, era di 2 g. Tale dimensione del campione, però, comportava lunghi tempi in fase di purificazione e, soprattutto, ad una bassa efficienza di estrazione causata dai componenti della matrice, con presenza di interferenti che vanno a contaminare lo spettrometro di massa e rendono difficilmente individuabili i picchi d'interesse in cromatografia. Di conseguenza la dimensione del campione è stata dimezzata ad 1 g permettendo di minimizzare la presenza di interferenti provenienti dal miele e facilitando la fase di purificazione, senza andare ad inficiare la riproducibilità della prova.

- **Fase di estrazione:** Il campione è stato sciolto, seguendo il metodo di Wang, con una soluzione acquosa di NH_4Form acidificata mediante acido fosforico. Per portare in soluzione i composti d'interesse si è proceduto all'agitazione manuale e successivamente tramite vortex. Per eliminare il residuo solido la metodologia di Wang prevedeva la filtrazione attraverso un imbuto mediante cotone assorbente, ma nel nostro caso è risultata sufficiente la centrifugazione del campione per depositare sul fondo la parte solida.
Per la fase di estrazione vera e propria si utilizzano le cartucce indicate nel metodo Wang Oasis® MCX 3cc (60 mg), condizionandole preventivamente con 3 mL di MeOH e 3 mL di acqua. Successivamente al caricamento del campione la cartuccia viene lavata con 6 mL di acqua e 6 mL di MeOH, rispetto ai 3 mL utilizzati dal metodo Wang. Si è scelto di lavare le cartucce con una maggior quantità di prodotto al fine di migliorare la pulizia del campione diminuendo il rumore di fondo causato da interferenti della matrice, anche se questa modifica ha portato ad un maggior tempo richiesto per completare la fase di estrazione.
- **Evaporazione e ricostituzione:** Successivamente all'eluizione del campione, il metodo Wang indica di portarlo a secco mediante flusso di azoto alla temperatura di 50°C . Noi invece abbiamo raggiunto lo stesso risultato utilizzando un evaporatore rotante posto sottovuoto, termostato a 50°C .
Inizialmente il campione veniva ricostituito mediante 2 mL di una miscela al 25% di MeOH e acqua. A seguito del cambiamento della colonna utilizzata e conseguente modifica del metodo cromatografico, che parte da un'elevata percentuale di fase organica, la fase ricostituente è stata modificata in 10% di fase mobile acquosa (50 mM NH_4Form) in ACN. È stato inoltre deciso di diminuire il volume di soluzione ricostituente ad 1 mL a seguito del dimezzamento del campione di miele pesato.

4.2. Ottimizzazione del metodo di rilevazione

Per sviluppare il metodo LC-MS/MS per la rilevazione degli analiti in oggetto ci si è basati sulle informazioni presenti in studi precedenti. Dapprima la metodologia selezionata è stata, analogamente alla fase di preparazione del campione, quella descritta nello studio di Wang (Wang et al., 2023), il quale utilizza come colonna cromatografica una Atlantis T3 (C18, 2.1 mm x 150 mm, 3 μm), utilizzando come fase

mobile acquosa una soluzione 10 mM di ammonio acetato e come fase mobile organica MeOH.

A seguito di diverse sessioni di lavoro seguendo questo metodo abbiamo riscontrato un notevole calo di sensibilità dello strumento osservando un calo nell'area dei picchi degli standard, e una forma di questi sempre più allargata. Abbiamo quindi pensato di modificare il metodo cromatografico, visti anche i costi molto elevati delle colonne per HPLC che non ne consentono una frequente sostituzione. Abbiamo quindi seguito le indicazioni del metodo ufficiale dell'EURL, utilizzando la colonna BEH Amide 2.1 x 100 mm, 1.7 μ m (HILIC) con fase mobile acquosa una soluzione 50 mM di NH₄Form in acqua (pH=3) e fase mobile organica ACN.

Si utilizza una separazione cromatografica in fase normale, il cui gradiente utilizzato, riportato al paragrafo 3.8 in tabella 2, è stato modificato rispetto quanto riportato nel metodo ufficiale, che è indicato nella seguente tabella.

Tabella 5. Parametri cromatografici metodo EURL: gradiente LC

Tempo (min)	% Fase mobile A	% Fase mobile B (ACN)	Flusso (mL/min)
0	3	97	0.5
0.5	3	97	0.5
4.0	30	60	0.5
5.0	60	40	0.5
6.0	60	40	0.5
6.1	3	97	0.5
10	3	97	0.5

In particolare, la durata della corsa cromatografica è stata diminuita da 10 min a 8.50 min, aumentando la percentuale di fase acquosa più rapidamente rispetto quanto riportato nel metodo ufficiale. Anche a causa di queste modifiche, oltre che per la struttura molto simile, le molecole matrina e ossimatrina hanno tempi di ritenzione molto vicini fra loro (3.555 min per matrina e 3.572 min per ossimatrina). Le molecole avrebbero potuto essere separate maggiormente seguendo il profilo cromatografico indicato dall'EURL, ma considerato che vengono rivelate mediante spettrometria di massa che permette di distinguerle in base al diverso ione molecolare (o ione padre) di matrina e ossimatrina che viene successivamente frammentato, si è scelto di ridurre

la durata della corsa al fine di avere una riduzione dei tempi analitici e conseguentemente maggiore velocità di risposta e risparmio economico.

Un'altra differenza rispetto al metodo EURL è nel flusso utilizzato. Si è scelto di utilizzare un flusso di 0.3 mL/min, piuttosto che di 0.5 mL/min, per compensare la riduzione del tempo della corsa, consentendo una sufficiente separazione tra picchi di interesse ed eventuali interferenti di matrice.

La temperatura impostata per la colonna è di 40°C, come indicato dal metodo EURL. Sono stati testati diversi volumi d'iniezione, partendo dai 2 µL utilizzati sia nel metodo EURL che nel metodo Wang, ma si è scelto di ridurre il volume fino a 0.3 µL in modo da ridurre la quantità di sostanza che andava a "sporcare" lo spettrometro di massa diminuendone le prestazioni. Questa riduzione del volume di iniezione riduce l'effetto di soppressione del segnale da parte della matrice e quindi permette di avere picchi con area discreta per la quantificazione degli analiti.

Le transizioni che si è scelto di osservare per determinare matrina e ossimatrina, e tutti i parametri strumentali di sorgente ed analizzatore di massa, sono stati messi a punto in fase di ottimizzazione strumentale della procedura analitica.

4.3. Risultati della validazione

- Linearità: La linearità del metodo è stata testata sia nella retta di calibrazione in solvente che in matrice. Nel primo caso il solvente utilizzato è stato la fase ricostituente, fortificata mediante le soluzioni standard di matrina e ossimatrina. Nel secondo caso un miele millefiori già testato e risultato negativo per gli analiti da ricercare, è stato fortificato mediante le soluzioni standard di matrina e ossimatrina. Le rette sono state costruite analizzando cinque livelli di calibrazione per entrambi gli analiti, alle seguenti concentrazioni: 5, 15, 25, 35 e 50 ppb. Gli estremi delle curve devono essere \leq LOQ e $>$ LMR, il quale per matrina e ossimatrina nel miele è di 0,01 mg/Kg. La linearità ottenuta dall'analisi di regressione è stata considerata soddisfacente per entrambi gli analiti, in quanto è stato ottenuto un coefficiente di correlazione (R^2) superiore a 0,99 per entrambe le rette, mostrate in figura 4.

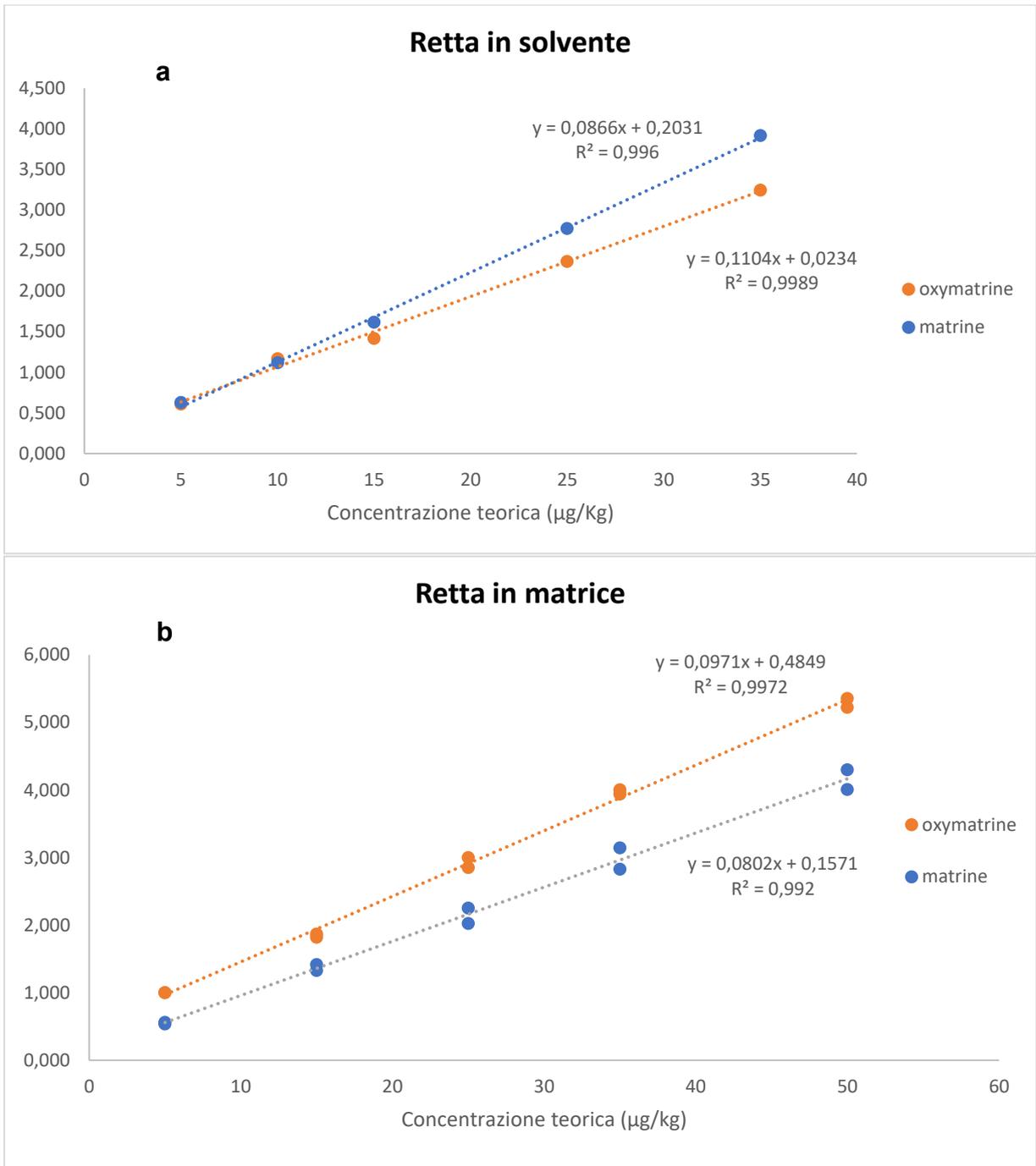


Figura 4. Rette di calibrazione e intervallo di linearità per matrina e ossimatrina in solvente (a) e matrice (b)

I residui, intesi come la differenza in percentuale tra valore teorico e valore reale dei diversi punti della retta, sono risultati <20% in entrambi i casi per entrambi gli analiti, rispettando quindi i criteri di accettabilità.

- LOQ (limite di quantificazione): Il LOQ stabilito per questo metodo coincide con il LMR ed è uguale 10 µg/kg, ed indica la concentrazione più bassa che

si può quantificare con sufficiente probabilità statistica, considerando i limiti strumentali. Sono stati studiati 6 campioni di miele negativi addizionati a questo livello, ed è stato verificato che i parametri di accettabilità fossero in linea con i requisiti del documento SANTE.

- Effetto matrice: il valore, quantificato confrontando retta in solvente e retta in matrice, risulta essere superiore al 20% per entrambi gli analiti. In questo caso il metodo richiede l'utilizzo di uno standard interno o di una retta di calibrazione in matrice. A tal fine, nello studio di validazione per la quantificazione è stato utilizzato il rapporto delle aree di ciascun analita con il rispettivo standard interno. Inoltre, la quantificazione è stata effettuata utilizzando una retta in matrice: si è utilizzato a tal scopo il miele maggiormente commercializzato e consumato in Italia, ovvero il miele millefiori, che presenta anche caratteristiche "intermedie" rispetto agli altri mieli monoflorali. Per effettuare ulteriori valutazioni sull'effetto matrice e sull'efficienza del metodo sono state utilizzate durante gli studi di validazione altre due tipologie di miele, l'acacia e il castagno. Generalmente è quest'ultimo che, caratterizzato da pigmenti scuri ed elevata densità, tende ad influenzare maggiormente le prestazioni analitiche dando un'elevata soppressione del segnale. Nelle figure 5, 6 e 7 si può osservare l'effetto che diverse tipologie di miele hanno sul segnale.

Per l'analisi di campioni reali si è ritenuto opportuno, nel nostro caso, l'utilizzo di una retta di calibrazione in matrice, scegliendo, quando possibile, di utilizzare un miele negativo della stessa origine botanica di quello in esame.

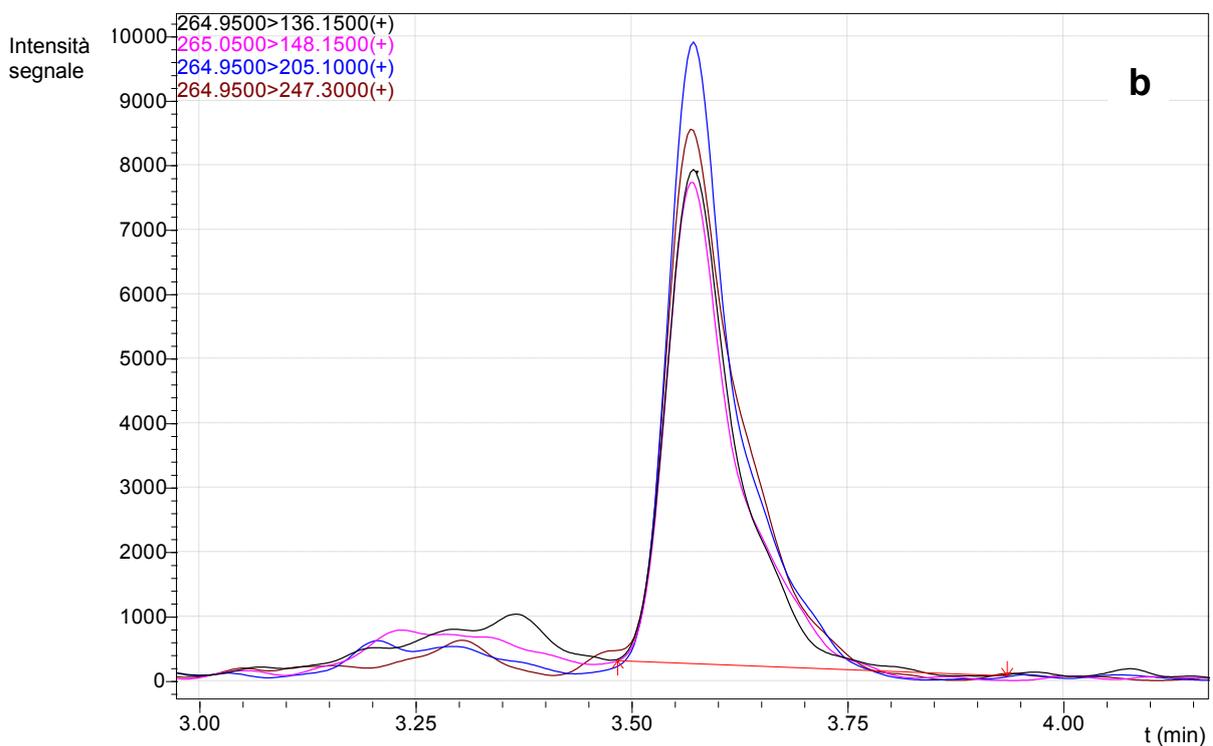
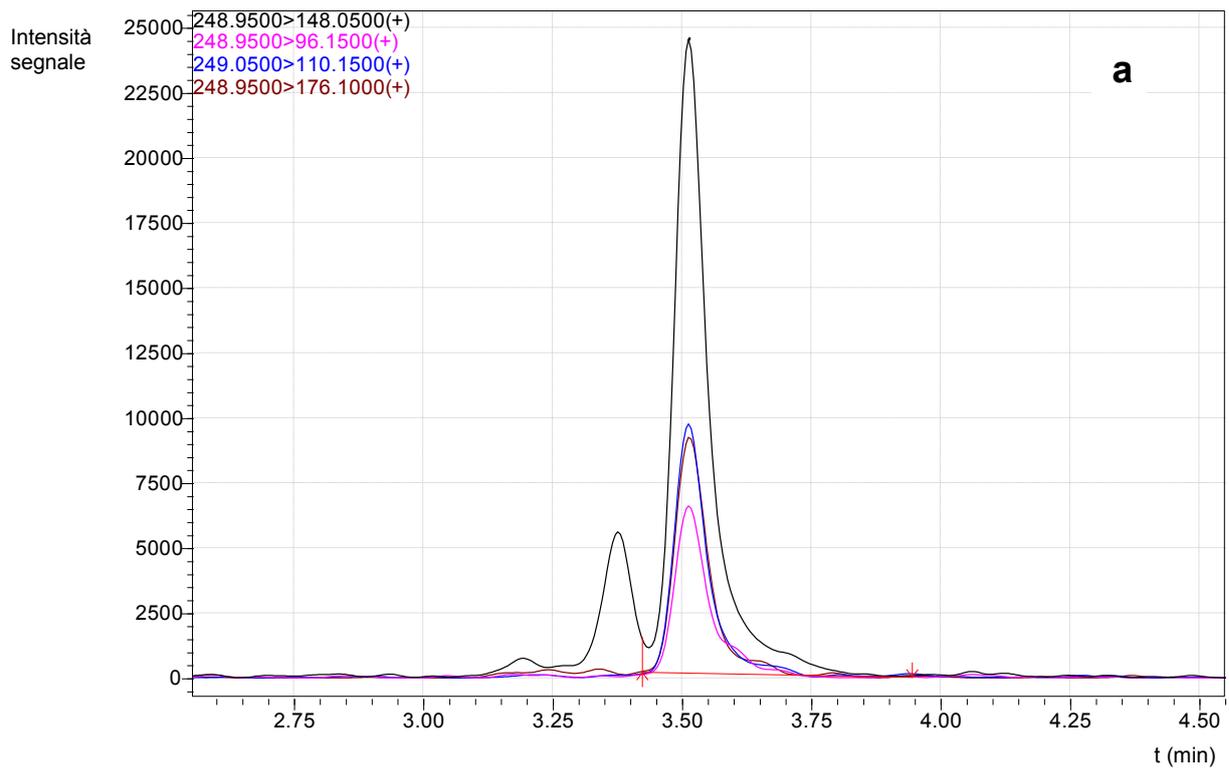


Figura 5 Campione di miele di acacia addizionato con standard di matrigna (a) e ossimatrigna (b) a 10 ppb

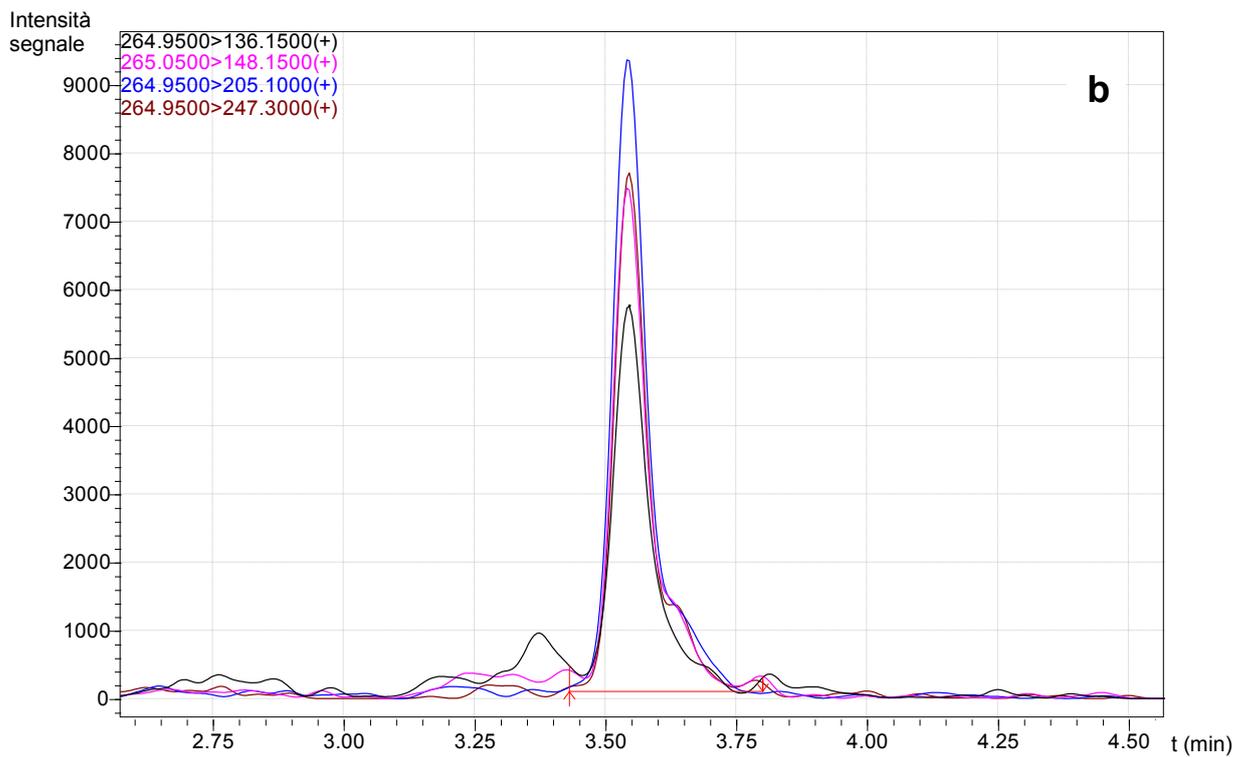
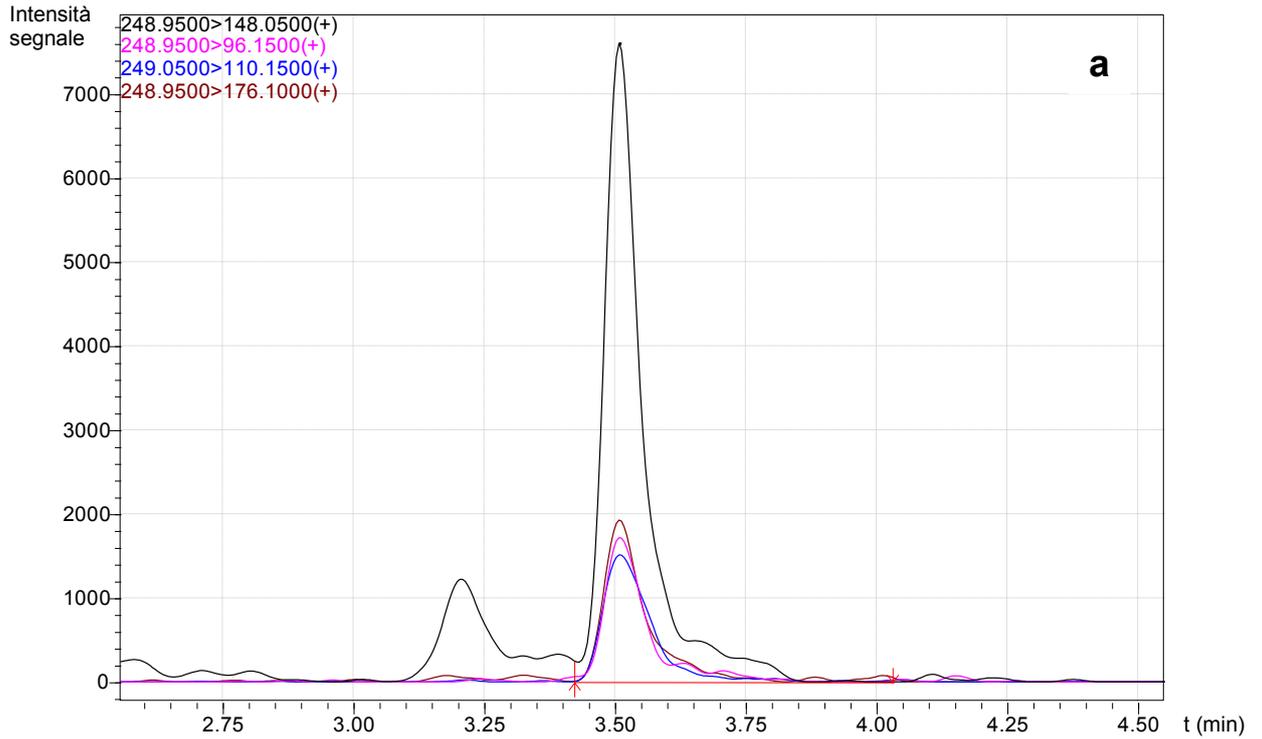


Figura 6 Campione di miele millefiori addizionato con standard di matricina (a) e ossimatrina (b) a 10 ppb.

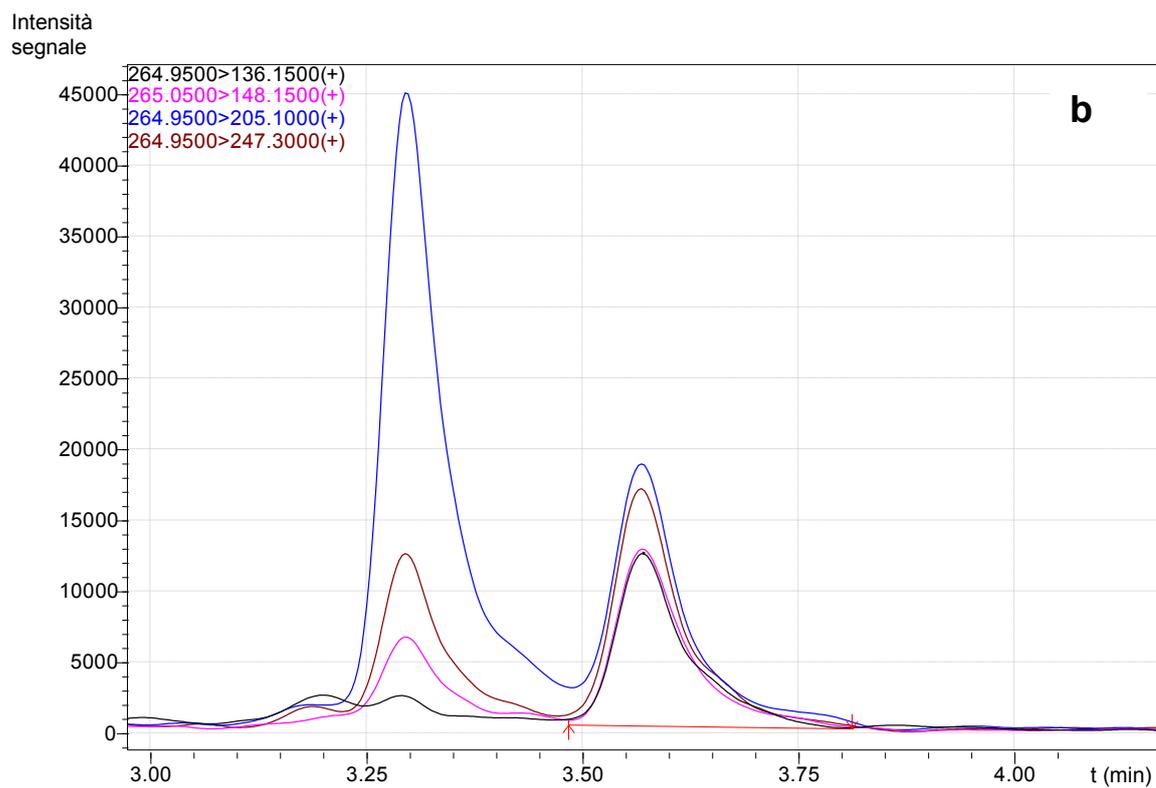
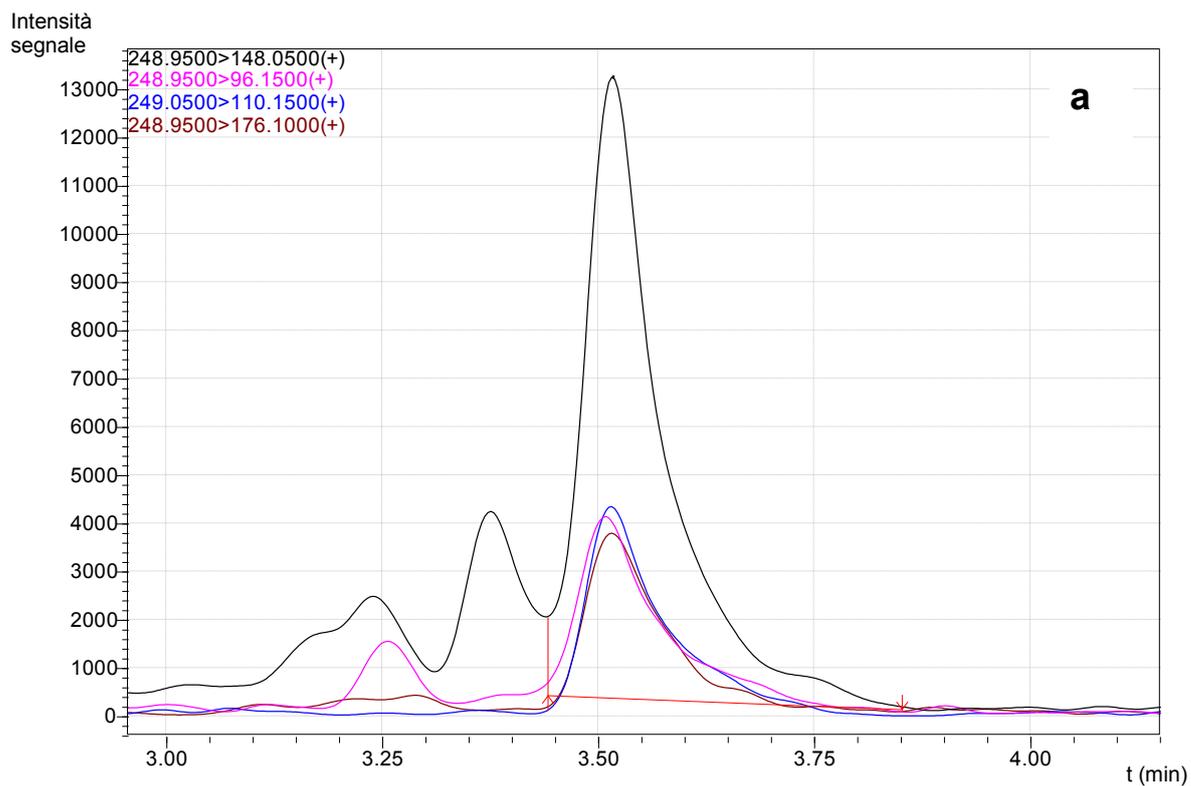


Figura 7 Campione di miele di castagno addizionato con standard di matricina **(a)** e ossimatrina **(b)** a 10 ppb.

- Specificità: È stato verificato che la risposta cromatografica di bianco reagente e bianco matrice sono inferiori al 30% del LOQ, integrando eventuali aree di interferenti prossime al tempo di ritenzione di matrina e ossimatrina.
- Esattezza e precisione: Esattezza e precisione sono state verificate fortificando 6 campioni di miele di diverse origini botaniche (in particolare sono stati utilizzati 2 campioni di miele d'acacia, 2 di millefiori, 1 campione di miele di tiglio e 1 di fiori di bosco) sia a livello del LOQ (10 µg/kg) che a livello 4 x LOQ (40 µg/kg). I recuperi medi percentuali sono compresi tra 70 e 120% e la deviazione standard percentuale relativa alla ripetibilità (RSDr) risulta inferiore al 20%, come richiesto dal documento SANTE. I risultati sono riportati in Tabella 6.

Tabella 6. Recuperi e precisione (RSDr) per matrina e ossimatrina nel miele (n=6) ai due diversi livelli di addizionamento.

Analita	Concentrazione (µg/kg)	Recuperi [%]	RSDr [%]
Matrina	10	91,1	9,7%
	40	86,1	6,7%
Ossimatrina	10	112,5	11,3%
	40	102,3	7,3%

4.4. Analisi di campioni reali

Il metodo sviluppato è stato utilizzato per verificare la presenza ed eventualmente quantificare di matrina e ossimatrina nel miele e valutare l'applicabilità del metodo in campioni ambientali reali derivanti da ricerche precedenti e in alcuni campioni acquistati ad hoc per l'analisi. Il metodo è stato quindi testato su miele di diversa origine botanica e geografica. Analisi e quantificazione dei campioni è stata effettuata preparando rette di calibrazione in matrice, utilizzando un miele della stessa origine botanica (ad esempio millefiori, castagno o acacia) del miele analizzato.

Il metodo è stato applicato a 60 campioni, di cui 30 di origine nazionale e 30 di origine estera. I risultati sono riportati in tabella 7.

Tabella 7: Risultati dell'analisi dei campioni di miele

ID Campione	Origine botanica	Paese di provenienza	Matrina	Ossimatrina
1	Castagno	Italia	Non rilevata	Non rilevata
2	Fiori del bosco	Italia	Non rilevata	Non rilevata
3	Acacia	Italia	Non rilevata	Non rilevata
4	Millefiori	Italia	Non rilevata	Non rilevata
5	Tiglio	Italia	Non rilevata	Non rilevata
6	Millefiori	Italia	Non rilevata	Non rilevata
7	Eucalipto	Italia	Non rilevata	Non rilevata
8	Limone	Italia	Non rilevata	Non rilevata
9	Fiori del bosco	Italia	Non rilevata	Non rilevata
10	Arancia	Italia	Non rilevata	Non rilevata
11	Tarassaco	Italia	Non rilevata	Non rilevata
12	Castagno	Italia	Non rilevata	Non rilevata
13	Castagno	Italia	Non rilevata	Non rilevata
14	Melata	Italia	Non rilevata	Non rilevata
15	Millefiori	Italia	Non rilevata	Non rilevata
16	Sulla	Italia	Non rilevata	Non rilevata
17	Coriandolo	Italia	Non rilevata	Non rilevata
18	Tiglio	Italia	Non rilevata	Non rilevata
19	Barena	Italia	Non rilevata	Non rilevata
20	Fiori	Italia	Non rilevata	Non rilevata
21	Millefiori	Italia	Non rilevata	Non rilevata
22	Arancio	Italia	Non rilevata	Non rilevata
23	Arancio	Italia	Non rilevata	Non rilevata
24	Fiori	Italia	Non rilevata	Non rilevata
25	Castagno	Italia	Non rilevata	Non rilevata
26	Millefiori	Italia	Non rilevata	Non rilevata
27	Acacia	Italia	Non rilevata	Non rilevata
28	Millefiori	Italia	Non rilevata	Non rilevata
29	Trifoglio	Italia	Non rilevata	Non rilevata
30	Tiglio	Italia	Non rilevata	Non rilevata
31	Millefiori	Italia, Argentina, Ungheria, Moldavia	Non rilevata	Non rilevata
32	Acacia	Ungheria	Non rilevata	Non rilevata
33	Fiori	Ungheria	Non rilevata	Non rilevata
34	Millefiori	Ungheria, Ucraina Ucraina, Romania,	Non rilevata	Non rilevata
35	Millefiori	Thailandia, Argentina, Guatemala	Non rilevata	Non rilevata
36	Millefiori	Ungheria, Ucraina	Non rilevata	Non rilevata
37	Tiglio	Romania	Non rilevata	Non rilevata
38	Millefiori	Ungheria, Ucraina	Non rilevata	Non rilevata
39	Acacia	Ungheria	Non rilevata	Non rilevata

40	Acacia	Repubblica di San Marino	Non rilevata	Non rilevata
41	Millefiori	Turchia	Non rilevata	Non rilevata
42	Millefiori	Bulgaria	Non rilevata	Non rilevata
43	Manuka	Australia	Non rilevata	Non rilevata
44	Acacia	Romania	Non rilevata	Non rilevata
45	Acacia	Romania, Moldavia, Isola di Formosa, Ucraina, Ungheria	Conc. < LOQ	Conc. < LOQ
46	Acacia	Ungheria, Moldavia, Ucraina, Isola di Formosa	Conc. < LOQ	Conc. < LOQ
47	Acacia	Ucraina, Serbia	Non rilevata	Non rilevata
48	Acacia	Ungheria, Romania	Non rilevata	Non rilevata
49	Fiori	Argentina, Romania, Thailandia, Vietnam	Non rilevata	Non rilevata
50	Fiori	Argentina, Vietnam, Ucraina, Thailandia, Romania	Non rilevata	Non rilevata
51	Millefiori	Ungheria, Ucraina	Non rilevata	Non rilevata
52	Millefiori	Bulgaria, Romania	Non rilevata	Non rilevata
53	Fiori	Guatemala, Argentina, Ucraina, Thailandia, Vietnam, Romania	Non rilevata	Non rilevata
54	Millefiori	Turchia	Non rilevata	Non rilevata
55	Fiori	Romania, Brasile	Non rilevata	Non rilevata
56	Millefiori	Romania, Argentina, Ucraina, Vietnam, Thailandia	Non rilevata	Non rilevata
57	Sconosciuto	Israele	Non rilevata	Non rilevata
58	Millefiori	Ungheria, Romania	Non rilevata	Non rilevata
59	Acacia	Argentina, Ucraina, Romania	Non rilevata	Non rilevata
60	Castagno	Ungheria	Non rilevata	Non rilevata

Tabella 8: Percentuale di rilevazione di matrina e ossimatrina divise per provenienza e origine botanica del campione di miele

Origine miele	Origine botanica	Numero campioni analizzati	% rilevazione matrina	% rilevazione ossimatrina
Italiana	Millefiori	6	0%	0%
	Acacia	2	0%	0%
	Fiori	4	0%	0%
	Altro	18	0%	0%
Estera	Millefiori	12	0%	0%
	Acacia	9	22,2%	22,2%
	Fiori	5	0%	0%
	Altro	4	0%	0%

Come mostrato nelle tabelle 7 e 8, matrina e ossimatrina non sono state ritrovate in campioni di origine nazionale. Al contrario sono state ritrovate tracce di entrambi gli alcaloidi in due campioni di miele di origine estera. In particolare, il ritrovamento è relativo ai campioni 45 e 46, entrambi miele di acacia.

I campioni di acacia di provenienza estera analizzati in totale sono stati 9, con percentuale di rilevamento di queste sostanze nel 22,2% di tali campioni.

Il primo campione che presenta tracce degli alcaloidi in esame è una miscela di mieli provenienti da Romania, Moldavia, Isola di Formosa, Ucraina e Ungheria; il secondo è una miscela di mieli provenienti da Ungheria, Moldavia, Ucraina e Isola di Formosa.

In figura 8 e 9 sono mostrati i cromatogrammi ottenuti dall'analisi di questi campioni.

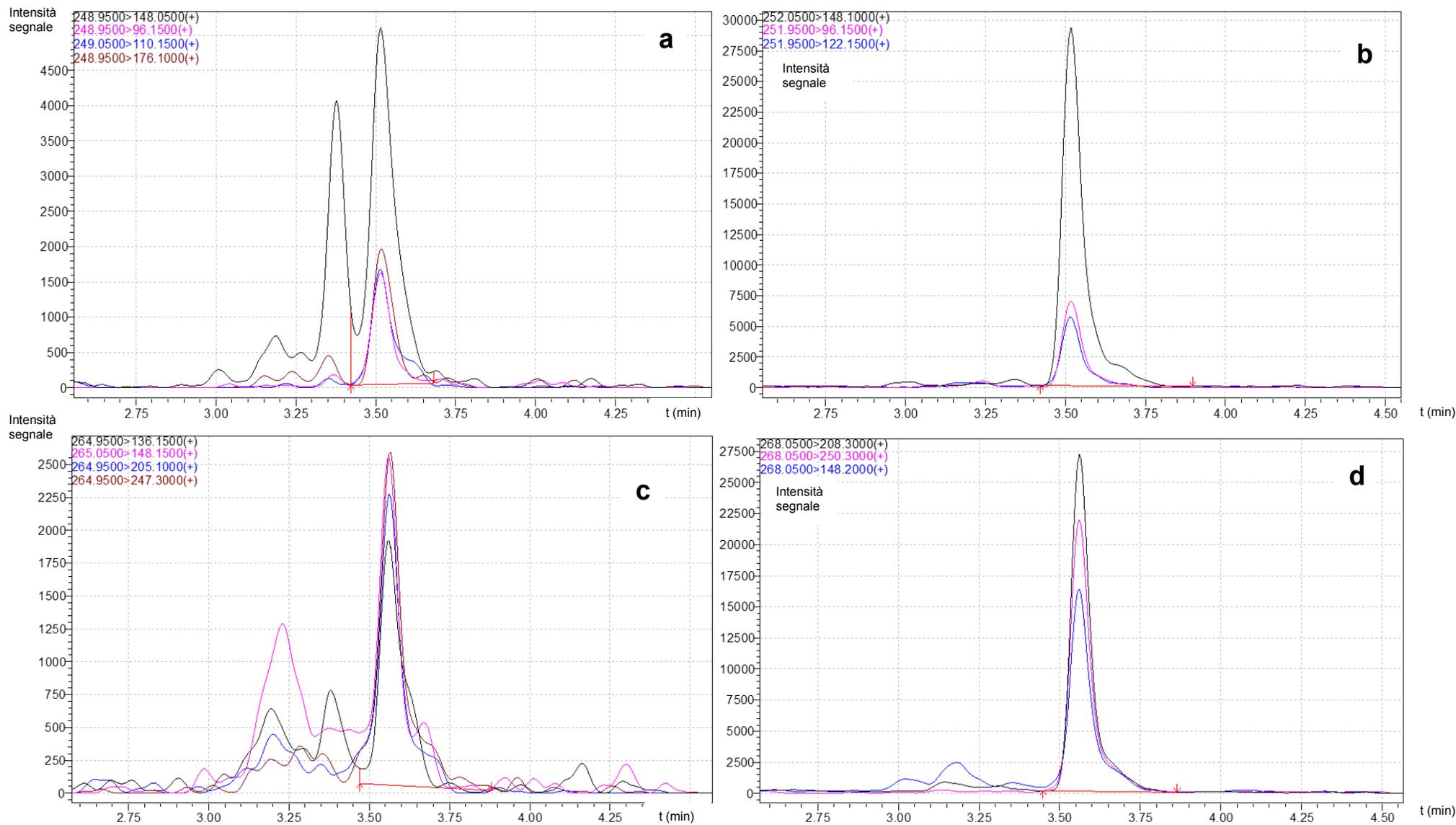


Figura 8 Cromatogrammi ottenuti dall'analisi del campione n° 45 per matrina (a), ossimatrina (c) e per i loro rispettivi standard interni (b e d)

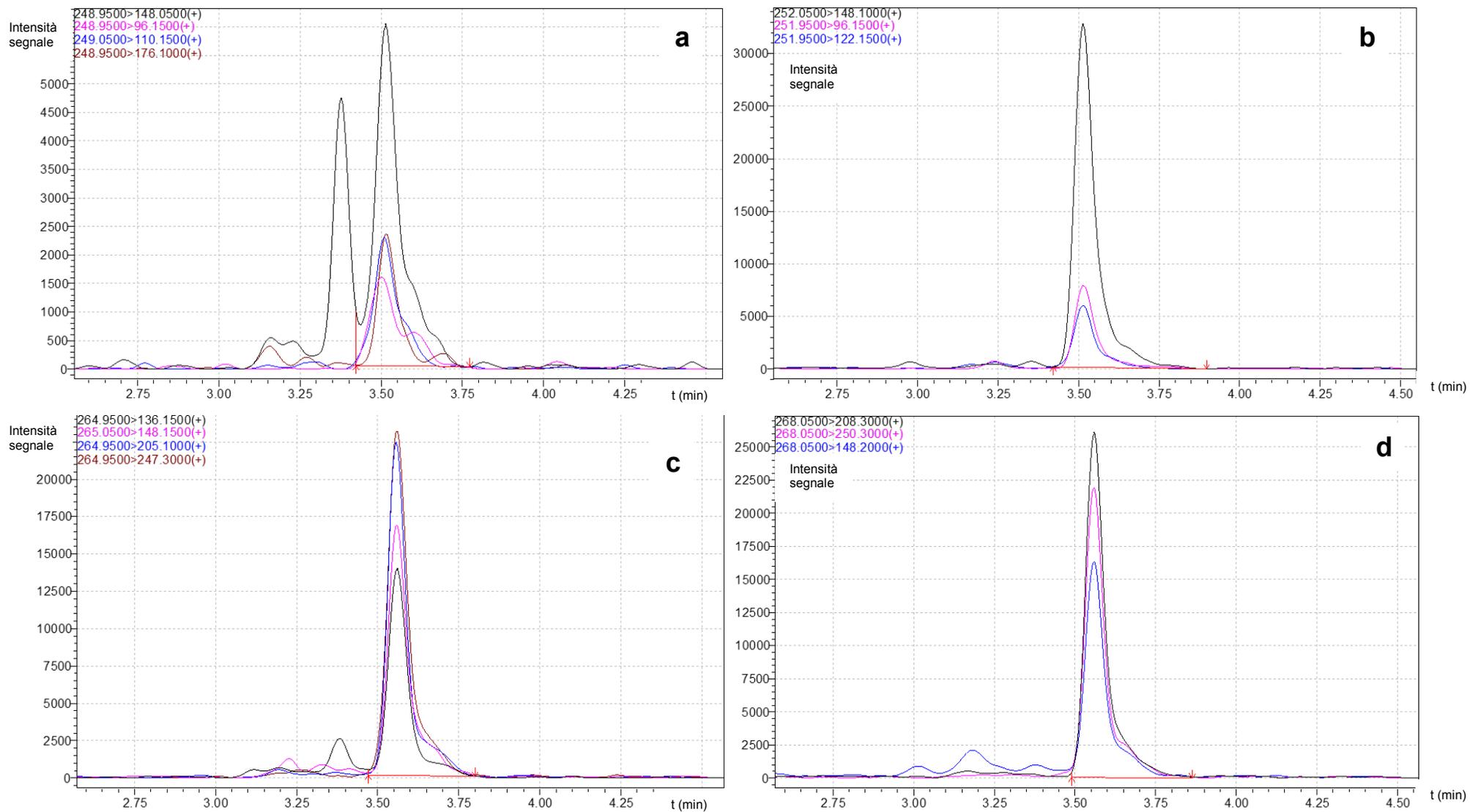


Figura 8 Cromatogrammi ottenuti dall'analisi del campione n° 45 per matrina (a), ossimatrina (c) e per i loro rispettivi standard interni (b e d)

Nel lavoro del gruppo di Zongyan (Zongyan et al.,2022), il metodo proposto è stato utilizzato per analizzare 39 campioni di miele di acacia raccolti in Cina nel 2021, con una percentuale di rilevamento di matrina e ossimatrina del 69,2% e 18 campioni raccolti in anni differenti, con una percentuale di rilevamento del 77,8%. I campioni positivi provenivano principalmente dal nord-est della Cina. Anche il gruppo di Wang (Wang et al., 2023) ha applicato il proprio metodo a 567 campioni di miele di varie origini botaniche, provenienti da diverse parti della Cina. In questo caso l'incidenza di rilevamento di matrina e ossimatrina è rispettivamente del 36,7% e 58,2% e la maggioranza dei campioni positivi hanno provenienza dall'est della Cina. Per quanto riguarda i soli mieli di acacia hanno testato 383 campioni, con percentuale di rilevazione di matrina e ossimatrina rispettivamente del 40,7% e 72,3%. In entrambi questi studi sono stati analizzati anche i fiori di acacia, ma in entrambi i casi la concentrazione di matrina e ossimatrina osservata non è rilevante e comunque non tale da giustificare le concentrazioni di tali sostanze rilevate nel miele.

Nel nostro caso non è stato possibile reperire dei mieli di origine cinese, che, come indicato dagli studi citati precedenti, hanno una maggior incidenza di rilevazione delle sostanze in oggetto, data la contemporanea presenza dei maggiori "fattori di rischio" precedentemente citati: la presenza di piante che producono gli alcaloidi in esame, la fioritura contemporanea di queste piante con l'acacia, e l'utilizzo in queste zone geografiche di pesticidi contenenti matrina e ossimatrina. Lo studio di Wang infatti riporta una sovrapposizione fra l'area di diffusione delle piante d'acacia e delle piante del genere *Sophora* concludendo quindi che la contaminazione può avvenire durante la fase di bottinamento delle api.

Nel nostro caso risulta interessante che fra tutti i campioni analizzati gli unici due che contengono tracce dei nostri analiti siano quelli il cui miele proviene in parte anche dall'Isola di Formosa. L'isola di Formosa, meglio nota come Taiwan è situata a 150 Km a sud-est della Cina ed anche in quest'area sono diffuse le piante del genere *Sophora* (Shen, C., et. al 2006). Una possibilità è quindi che anche in questo caso la contaminazione dei campioni di miele con gli alcaloidi matrina e ossimatrina sia dovuta ad una contaminazione del polline raccolto dalle api in fase di bottinamento, essendo inoltre il miele in oggetto, miele di acacia, pianta che fiorisce nello stesso periodo della *Sophora*. Ovviamente non si può escludere una contaminazione del miele causata dall'utilizzo di pesticidi a base di matrina e

ossimatrina, che come già detto sono diffusi in queste zone geografiche.

Gli studi precedentemente citati hanno rilevato concentrazioni medie di matrina e ossimatrina molto elevate nei campioni di miele. Ad esempio, nello studio di Zongyan, la maggior parte dei campioni di acacia analizzati aveva concentrazioni superiori a 5 µg/kg, fino ad arrivare ad un massimo, per l'ossimatrina, di 142,2 µg/kg. Lo studio di Wang riporta, invece, valori medi di 12,8 µg/kg per matrina e 77,7 µg/kg per ossimatrina. Per quanto riguarda invece i campioni dove abbiamo rilevato tracce di matrina e ossimatrina, in base al nostro metodo essi non sarebbero quantificabili, in quanto la concentrazione rilevata è inferiore a 10 µg/kg, ovvero il LOQ del nostro metodo, e comunque sono al di sotto dei limiti di legge. Le concentrazioni sono basse ma, come si evince dalle figure 8 e 9 relative a questi campioni da noi analizzati, i picchi sono chiaramente visibili a dimostrazione dell'efficienza del metodo preparativo e cromatografico da noi messo a punto. Nel primo campione le concentrazioni puramente indicative calcolate sono di 1 e 2 µg/kg e nel secondo 7 e 2 µg/kg, rispettivamente di ossimatrina e matrina. Valori così bassi possono probabilmente essere legati al fatto che tali campioni sono etichettati come miscela di mieli di diverse origini geografiche (ad esempio con miele dall'Ucraina, Moldavia, Ungheria) e quindi la quantità di alcaloidi presenti nel miele dell'Isola di Formosa potrebbe essere stata diluita dalla presenza di altri mieli.

5. Conclusioni

Con la presente ricerca è stato messo a punto un metodo semplice ed efficace che permette la determinazione di matrina e ossimatrina nel miele mediante HPLC-MS/MS con un LOQ di 10 µg/kg. Nel dettaglio il metodo prevede un'estrazione in fase solida seguita da separazione degli analiti dagli interferenti mediante cromatografia liquida e successiva rivelazione mediante spettrometria di massa in modalità ESI +. Il metodo è stato successivamente validato seguendo le linee guida del documento SANTE/11312/2021 e tutti i parametri definiti per la validazione di metodi per l'analisi di residui di pesticidi in alimenti sono stati testati e sono rispondenti ai requisiti.

Grazie all'applicazione del metodo sviluppato a 60 campioni reali è stato possibile raccogliere dati sulla presenza di questi alcaloidi nei mieli reperibili in Italia, ritrovando gli alcaloidi d'interesse soltanto in due campioni positivi, entrambi costituiti da miele di acacia ed entrambi costituiti da una miscela di mieli provenienti da diversi paesi esteri, fra cui l'Isola di Formosa.

Il lavoro riportato nella presente tesi risulta importante in quanto i dati attualmente disponibili sull'effettiva presenza di questi alcaloidi negli alimenti risultano ancora molto scarsi. In particolare, le pubblicazioni scientifiche in merito la presenza di matrina e ossimatrina sui campioni di miele sono soltanto tre (Wang et al., 2023; Zongyan et al., 2022; Jing et al., 2022) e sono limitate al solo studio dei mieli di acacia.

I risultati dello studio verranno quindi ampliati dal laboratorio del Centro di Referenza Nazionale per l'Apicoltura (CRNA), raccogliendo dati su un numero più elevato di campioni e i risultati ottenuti saranno oggetto di una pubblicazione scientifica. I dati emersi fino ad ora sono comunque rassicuranti, in quanto la presenza di questi alcaloidi sembra essere limitata alla Cina o a paesi limitrofi.

A livello più ampio è importante raccogliere inoltre ulteriori informazioni sulla tossicità ed eventuale genotossicità di matrina e ossimatrina per gli insetti impollinatori ma soprattutto per l'uomo. Nel primo caso, l'approfondimento sugli effetti letali o subletali di queste sostanze a carico degli insetti pronubi come *Apis mellifera*, data la loro ormai ben nota importanza per il mantenimento degli ecosistemi, rappresenta una questione promossa anche dalla stessa Commissione Europea mediante l'inclusione di queste molecole tra le "Sostanze di interesse da analizzare nel miele nell'ambito dei programmi nazionali di

controllo” come riportato nei documenti di lavoro (SANCO/12745/2013 rev. 15(3) del 21–22 novembre 2023) pubblicati nel portale dei Laboratori Europei di Riferimento per i Pesticidi. Per quanto riguarda lo studio sui possibili effetti tossici per la salute umana, questo aspetto sarà fondamentale anche ai fini della definizione di un adeguato LMR negli alimenti basato su robusti dati scientifici. Il dato risulterà importante, oltre che per tutelare la salute dei consumatori, anche a livello europeo, al fine di regolamentare in modo appropriato l’importazione di mieli provenienti da paesi asiatici come la Cina, che possono facilmente contenere concentrazioni di questi alcaloidi a livelli superiori dell’attuale LMR previsto.

6. Bibliografia

Abd-Alla, H. I., Souguir, D., & Radwan, M. O. (2021). Genus *Sophora*: a comprehensive review on secondary chemical metabolites and their biological aspects from past achievements to future perspectives. *Archives of Pharmacal Research*, 44(11), 903–986. <https://doi.org/10.1007/S12272-021-01354-2>

Anastassiades, M., Kolberg, ; D I, Eichhorn, ; E, Benkenstein, ; A, Wachtler, A.-K., Zechmann, ; S, Mack, ; D, Wildgrube, ; C, Barth, ; A, Sigalov, ; I, Görlich, ; S, Dörk, ; D, & Cerchia, ; G. (2023). *EU Reference Laboratory for pesticides requiring Single Residue Methods (EURL-SRM) Quick Method for the Analysis of Highly Polar Pesticides in Food involving Extraction with acidified methanol and LC or IC- MS/MS Measurement I. Food of Plant Origin (QuPPE-PO-Method)*.

Bio-Pesticides Database, Retrieved September 23, 2024, from <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/bpdb/>

Bloomquist, J. R., Jiang, S., Taylor-Wells, J., Yang, L., & Li, Y. X. (2018). Insecticidal activity and physiological actions of matrine, a plant natural product. *ACS Symposium Series*, 1289, 175–186. <https://doi.org/10.1021/BK-2018-1289.CH009>

Boiteau, L., Boivin, J., Liard Annie, Quiclet-Sire, B., & Zard, S. Z. (1998). *A Short Synthesis of (±)-Matrine - Boiteau - 1998 - Angewandte Chemie International Edition - Wiley Online Library*. 1128–1131. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19980504\)37:8<1128::AID-ANIE1128>3.0.CO;2-P](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19980504)37:8<1128::AID-ANIE1128>3.0.CO;2-P)

Cang, S., Liu, R., Wang, T., Jiang, X., Zhang, W., Bi, K., & Li, Q. (2019). Simultaneous determination of five active alkaloids from Compound Kushen Injection in rat plasma by LC–MS/MS and its application to a comparative pharmacokinetic study in normal and NSCLC nude rats. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1126–1127. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2019.121734>

Celli, G., & Maccagnani, B. (2003). Honey bees as bioindicators of environmental pollution. *Bulletin of Insectology*, 56(1), 137–139.

Cely-Veloza, W., Kato, M. J., & Coy-Barrera, E. (2023). Quinolizidine-Type Alkaloids: Chemodiversity, Occurrence, and Bioactivity. *ACS Omega*, 8(31), 27862–27893. https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.3C02179/SUPPL_FILE/AO3C02179_SI_001.PDF

Chapman, & Hall. (1997). *Dictionary of organic compounds*. Supply.4 (John Buckingham, Ed.; 6th ed., Vol. 4).

Cheng, X., He, H., Wang, W. X., Dong, F., Zhang, H., Ye, J., Tan, C., Wu, Y., Lv, X., Jiang, X., & Qin, X. (2020). Semi-synthesis and characterization of some new matrine derivatives as insecticidal agents. *Pest Management Science*, 76(8), 2711–2719. <https://doi.org/10.1002/PS.5817>

Chu, C., Liu, C., Jiang, L., Lian, L., Li, J., Li, H., Lv, H., & Yan, J. (2019). On-line synergistic stacking in capillary zone electrophoresis featuring field-amplified sample

stacking and micelle to cyclodextrin stacking in the determination of two alkaloids in complicated matrix samples. *Journal of Separation Science*, 42(18), 3009–3015. <https://doi.org/10.1002/JSSC.201900482>

Commissione europea, *EU Pesticides Database - Active substances - Active substance details*, Retrieved June 26, 2024, from <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/active-substances/details/1475>

Commissione europea, *RASFF Window - Notification detail*, Retrieved June 29, 2024, from <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/524611>

ECHA, (2005), *ADI and ARfD derivation for biocidal active substances*. [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono%](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono%20)

EFSA, *ADI*, Retrieved June 29, 2024 from <https://www.efsa.europa.eu/en/glossary/adi#>

EFSA, *Pesticidi*, Retrieved June 29, 2024, from <https://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/pesticides>

EFSA, *Scientific Opinion on Exploring options for providing advice about possible human health risks based on the concept of Threshold of Toxicological Concern (TTC)*. (2012). *EFSA Journal*, 10(7). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2012.2750>

EURL, *Working document on pesticides to be considered for inclusion in the national control programmes to ensure compliance with maximum residue levels of pesticides residues in and on food of plant and animal origin*, Retrived September 27, 2024 from https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmp/pt_article.asp?CntID=629&LabID=100&Lang=EN

Federal institute for risk assessment, (2023), *Plant alkaloids in liquorice roots: genetic damage by matrine and oxymatrine unlikely*. <https://doi.org/10.17590/20231219-105452-0>

Fischer, B. C., Musengi, Y., König, J., Sachse, B., Hessel-Pras, S., Schäfer, B., Kneuer, C., & Herrmann, K. (2024). Matrine and Oxymatrine: evaluating the gene mutation potential using in silico tools and the bacterial reverse mutation assay (Ames test). *Mutagenesis*, 39(1), 32–42. <https://doi.org/10.1093/MUTAGE/GEAD032>

Galasso, V., Asaro, F., Berti, F., Pergolese, B., Kovač, B., & Pichierri, F. (2006). On the molecular and electronic structure of matrine-type alkaloids. *Chemical Physics*, 330(3), 457–468. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMPHYS.2006.09.017>

Hui, X.; Chen, H.; Shen, S.; Zhi, H.; Li, W. Establishment of Residual Methods for Matrine in Quinoa Plants and Soil and the Effect on Soil Bacterial Community and Composition. *Foods* **2023**, 12, 1337. <https://doi.org/10.3390/foods12061337>

Jia, X., Zhang, H., Jiang, X., Lu, Y., Liu, W., & Yu, J. (2021). Profiling and quantitation of alkaloids in different parts of *Sophora alopecuroides* L. extracts by high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation ion mobility spectrometry detection. *Phytochemical Analysis : PCA*, 32(6), 1003–1010. <https://doi.org/10.1002/PCA.3042>

Jiang, M., Wang, L., Jiang, W., & Huang, S. (2015). Simultaneous determination of 14-thienyl methylene matrine and matrine in rat plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 974, 126–130. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2014.10.041>

Jing, H. H., Xiang, J., Jiang, D. H., Feng, Y. Y., Wang, Y. H., & Wang, L. L. (2022). Rapid determination of matrine and oxymatrine in honey. *Food and Machinery*, 38(7), 57–62. <https://doi.org/10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.60051>

Liu, X., Tian, Y., Dong, F., Xu, J., Li, Y., Liang, X., Wang, Y., & Zheng, Y. (2014). Simultaneous Determination of Matrine and Berberine in Fruits, Vegetables, and Soil Using Ultra-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 97(1), 218–224. <https://doi.org/10.5740/JAOACINT.12-328>

Ma, X., Lin, H., Zhang, J., She, Y., Zhou, X., Li, X., Cui, Y., Wang, J., Rabah, T., & Shao, Y. (2018). Extraction and identification of matrine-type alkaloids from *Sophora moorcroftiana* using double-templated molecularly imprinted polymers with HPLC-MS/MS. *Journal of Separation Science*, 41(7), 1691–1703. <https://doi.org/10.1002/JSSC.201701133>

Marčić, D., Marčić, M., & Marčić, D. (2014). Acaricidal activity and sublethal effects of an oxymatrine-based biopesticide on two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). *Exp Appl Acarol*, 64, 375–391. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9831-x>

Ministero della Salute, *Allerta rapido (RASFF)*, Retrieved July 1, 2024, from https://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?area=sicurezzaAlimentare&id=1146&menu=sistema

Mohamed, H. A., Gad, H. A., & Oraby, H. K. (2023). Field larvicidal and pupicidal efficacy of the natural insecticide, oxymatrine against *Culex* species in Beni Suef Governorate, Egypt. *Journal of Natural Pesticide Research*, 4, 100030. <https://doi.org/10.1016/J.NAPERE.2023.100030>

Parlamento europeo, Regolamento - 1107/2009 - EN - EUR-Lex. (n.d.). Retrieved August 28, 2024, from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=celex%3A32009R1107>

Parlamento europeo, Regolamento - 396/2005 - EN - EUR-Lex. (n.d.). Retrieved August 21, 2024, from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX%3A32005R0396>

Parlamento europeo, Regolamento - 178/2002 - EN - EUR-Lex. (n.d.). Retrieved August 21, 2024, from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=celex%3A32002R0178>

Pihlström, T., Fernández-Alba, A. R., Gamón, M., Amate, C. F., de Kok, A., O'rgan, F., Pelosi, P., Mol, H., & Jezussek, M., No SANTE/12682/2019 - Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.

Plants of the World Online | Kew Science | *Sophora flavescens* Aiton. (n.d.). Retrieved June 29, 2024, from <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:518831-1>

Rabea, E. I., Nasr, H. M., & Badawy, M. E. I. (2010). Toxic effect and biochemical study of chlorfluazuron, oxymatrine, and spinosad on honey bees (*apis mellifera*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(3), 722–732. <https://doi.org/10.1007/S00244-009-9403-Y/METRICS>

Sun, X. Y., Jia, L. Y., Rong, Z., Zhou, X., Cao, L. Q., Li, A. H., Guo, M., Jin, J., Wang, Y. di, Huang, L., Li, Y. H., He, Z. J., Li, L., Ma, R. K., Lv, Y. F., Shao, K. K., Zhang, J., & Cao, H. L. (2022). Research Advances on Matrine. *Frontiers in Chemistry*, 10, 867318. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2022.867318/BIBTEX>

Sun, Z., Zhang, B., Li, W., Zhou, Y., Zhang, J., Wang, J., & Ma, Z. (2023). Matrine can be absorbed and transmitted bidirectionally to defend against aphids (Hemiptera: Aphididae) on wheat and pepper. *Pest Management Science*, 79(6), 2098–2106. <https://doi.org/10.1002/PS.7376>

Trapella, C. (2016). *Chimica delle sostanze organiche naturali*. <https://www.unife.it/farmacia/lm.farmacia/insegnamenti/chimica-delle-sostanze-naturali-farmacia-ordinamento-2017/materiale-didattico-prof-claudio-trapella/sostanze-naturali/Dispense%20Sostanze%20Naturali%20Trap.pdf>

Wang, Z., Zu, T., Huang, X., Jiang, X., Jia, G., Xu, J., Cui, Z., Zhu, F., Zhang, J., Li, J., & Cao, Y. (2023). Comprehensive investigation of the content and the origin of matrine-type alkaloids in Chinese honeys. *Food Chemistry*, 402. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.134254>

Wu, J., Li, J.-L., Peng, W.-J., & Hu, F.-L. (2010). Sensitivities of three bumblebee species to four pesticides applied commonly in greenhouses in China. *Insect Science*, 17, 67–72. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2009.01286.x>

Yin, R., Chen, L., & Ma, L. (2019). Extraction of matrine from soil with matrix solid-phase dispersion by molecularly imprinted polymers derived from lignin-based Pickering emulsions. *Journal of Separation Science*, 42(23), 3563–3570. <https://doi.org/10.1002/JSSC.201900803>

Zhang, B., Hao, J., Sun, Z., Zhao, X., Zhang, J., & Ma, Z. (2023). Non-food bioactive products for botanical pesticides: Insights into residue and dissipation kinetics of matrine-type alkaloids from

Zhang, Y., Chen, X., Li, J., Hu, S., Wang, R., & Bai, X. (2018). Salt-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for enhancing the concentration of matrine alkaloids in

traditional Chinese medicine and its preparations. *Journal of Separation Science*, 41(18), 3590–3597. <https://doi.org/10.1002/JSSC.201701504>

Zongyan, C., Hong, L., Lei, C., Xuezhe, H., Tao, D., & Jinzhong, X. (2022). Determination and traceability of matrine and oxymatrine in Chinese acacia honey. *JSFA Reports*, 2(7), 313–319. <https://doi.org/10.1002/JSF2.71>

7. Ringraziamenti

Come ultima cosa ci tenevo a ringraziare tutte le persone che mi hanno aiutata e sostenuta in questo percorso. In primis ringrazio il mio relatore, il professor Tapparo, per i suoi preziosi consigli e la sua disponibilità. Un doveroso ringraziamento va anche a tutto il laboratorio CRA, in particolare a Marianna, per avermi accolta e aiutata durante questo percorso. Ringrazio anche Paola Carnieletto per aver creduto in me e aver accettato tutti i compromessi e i ritardi che sono serviti per raggiungere questo risultato.

Ringrazio i miei genitori per aver sempre creduto in me e nel fatto che potevo fare meglio di quanto io abbia mai creduto. Vi voglio bene.

Infine, ringrazio tutti i miei amici e la mia famiglia per esserci sempre e per tutti i momenti di spensieratezza.