Ordine dei Tecnologi Alimentari
dell'Emilia Romagna Toscana Marche ed Umbria

Alma Mater Studiorum
Università di Bologna

CONTAMINAZIONE DEGLI ALIMENTI DA PACKAGING

Parte 2 - MATERIE PLASTICHE (3 CASI)

Prof. Giorgio Bonaga

21 ottobre 2017

PREMESSA: LE PLASTICHE

Negli ultimi 30 anni le materie plastiche hanno progressivamente sostituito il vetro, i metalli, la carta, il legno, le ceramiche, ecc. I contenitori in plastica sono onnipresenti e la loro diffusione nel settore alimentare è impressionante: *bottiglie, vasetti, vaschette, sacchetti, buste, scatole rivestite con film plastici (coating cans), pellicole, taniche, fusti, cassette, sacchi, ecc.* per contenere: *acqua*, *latte*, *prodotti lattiero-caseari*, *frutta*, *verdura*, *ortaggi*, *legumi, carne*, *pesce*, *pane*, *prodotti da forno*, *gelati*, *condimenti* (*olio*, *maionese*, *senape, ketchup*, ecc.).

Non tutte le plastiche sono materiali idonei al food packaging e pertanto, oggi, il rischio per la salute umana è certamente legato alla qualità degli alimenti, ma dipende anche dalla qualità dei loro contenitori. Anche i mezzi d'informazione si stanno occupando dell'argomento, con un'attenzione quasi sorprendente, dopo tanti anni di silenzio.

Il "**Regolamento (UE) N. 10/2011 della Commissione del 14 gennaio 2011, riguardante i materiali e gli oggetti di materia plastica destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari**" è entrato in vigore l'1 maggio 2011. Definito "*Plastics Implementation Measure*" (PIM), esso prevedeva la graduale applicazione di tutte le disposizioni entro il 31 dicembre 2015. E' lo strumento normativo della comunità europea attualmente vigente

All'Art. 11 viene definita:

Migrazione specifica (SML)

1. I materiali e gli oggetti di materia plastica non devono cedere i loro costituenti ai prodotti alimentari in quantità superiori ai *limiti di migrazione specifica* (*specific migration limit* = SML) di cui all'allegato I.
   SML = mg/kg di alimento (*indicato nell'allegato I*)

2. Alle sostanze per le quali nell'allegato I non sono indicati limiti di migrazione specifica o altre restrizioni si applica un limite generico di migrazione specifica pari a 60 mg/kg.
   SML = 60 mg/kg di alimento (*se non indicato nell'allegato I*)

Gli SML sono determinati nei prodotti alimentari secondo un metodo analitico conforme alle prescrizioni dell'articolo 11 del regolamento (CE) n. 882/2004.

All'Art. 12 viene definita:

Migrazione globale (OML)

1. I materiali e gli oggetti di materia plastica non devono cedere i loro costituenti ai simulanti alimentari in quantità superiori a 10 mg di costituenti totali ceduti per dm^2 di superficie a contatto con i prodotti alimentari (mg/dm^2). OML = 10 mg/dm^2 di superficie a contatto

2. In deroga al paragrafo 1, i materiali e gli oggetti di materia plastica destinati a entrare in contatto con alimenti per lattanti e bambini non devono trasferire i loro costituenti ai simulanti alimentari in quantità superiori a 60 mg/kg di liquido simulante.
   OML = 60 mg/kg di simulante alimentare

Negli articoli successivi vengono indicate le condizioni per la determinazione del SML e dell'OML:

Determinazione di SML

Per la dimostrazione di conformità di composizione dello SML *dei materiali e degli oggetti di materia plastica destinati a entrare in a contatto con i prodotti alimentari* si impiegano, in condizioni stabilite di *tempo* (t) e di *temperatura* (T), dei "*simulanti alimentari*", scelti in base all'uso a cui è destinato il materiale, ovvero alle caratteristiche dell'alimento che dovrà contenere, ma comunque sempre nelle peggiori condizioni d'uso.

La Tabella 1 riporta i simulanti alimentari, la Tabella 2 le condizioni di contatto in termini di tempo, la Tabella 3 le condizioni in termini di temperatura .

Tabella 1 - Simulanti alimentari per la determinazione di SML.

Simulante	Composizione	Prodotti alimentari
A	etanolo 10% (v/v)	• prodotti alimentari idrofili con pH > 4,5
B	acido acetico al 3% (p/v)	• prodotti alimentari idrofili con pH < 4,5
C	etanolo al 20% (v/v)	• prodotti alimentari alcolici con alcol ≤ 20% • prodotti alimentari lipofili
D1	etanolo al 50% (v/v)	• prodotti alimentari alcolici con alcol > 20%
D2	olio vegetale	• prodotti alimentari con grassi liberi in superficie
E	poli(ossido di 2,6-difenil-p-fenilene), 60-80 mesh, con pori di 200 nm	• alimenti secchi

Tabella 2 - Condizioni di contatto (tempo = t)

Durata del contatto	Durata della prova
t ≤ 0,5 min	0,5 mim
5 min < t ≤ 0,5 h	0,5 h
0,5 h < t ≤ 1 h	1 h
1 h < t ≤ 2 h	2 h
2 h < t ≤ 6 h	6 h
6 h < t ≤ 24 h	24 h
1 g < t > 3 gg	3 gg
3 gg < t > 30 gg	10 gg
oltre 30 gg	vedere condizioni specifiche

Tabella 3 - Condizioni di contatto (temperatura = T)

Temperatura di contatto (°C)	Temperatura della prova (°C)
T ≤ 5	5
5 < T ≤ 20	20
20 < T ≤ 40	40
40 < T ≤ 70	70
70 < T ≤ 100	100 o temperatura di riflusso
100 < T ≤ 121	121 (*)
121 < T ≤ 130	130 (*)
130 < T ≤ 150	150 (*)
150 < T > 175	175 (*)
> 175	regolare la T alla temperatura effettiva dell'interfaccia con il prodotto alimentare

Determinazione di OML

Le norme per le determinazioni di OML sono prescritte nel Regolamento N. 10/2011. Per la dimostrazione di conformità di materiali e oggetti di materia plastica *non ancora a contatto* con i prodotti alimentari si impiegano, in condizioni stabilite di *tempo* (t) e di *temperatura* (T), uno o più "*simulanti alimentari*", scelti in base all'uso a cui è destinato il materiale, ovvero alle caratteristiche dell'alimento che dovrà contenere (acquoso, alcolico, acido, ecc.).

La Tabella 4 riporta i simulanti alimentari per la determinazione di OML.

Tabella 4 - Simulanti alimentari per OML

Prodotti alimentari	**Simulanti**
tutti i tipi di prodotti alimentari	acqua dist., A, B, D2
tutti i tipi di prodotti alimentari eccetto quelli acidi	A, D2
tutti i tipi di prodotti alimentari acquosi, alcolici, prodotti lattiero-caseari,	D1
tutti i tipi di prodotti alimentari acquosi, acidi, alcolici, prodotti lattiero-caseari	B
tutti i tipi di prodotti alimentari acquosi e alcolici contenenti alcol fino al 20 %	C
tutti i tipi di prodotti alimentari acquosi, acidi e alcolici contenenti alcol fino al 20 %	C, B

La Tabella 5 riporta i valori di SML e SML(T)(*) di alcune sostanze che, da contenitori di materia plastica, possono migrare negli alimenti. Per i fotoiniziatori, non regolamentati dalla legislazione EU, sono riportati i SML stabiliti dall'Ordinanza Svizzera RS 817.023.21

Tabella 5 - Alcuni SML e SML(T)

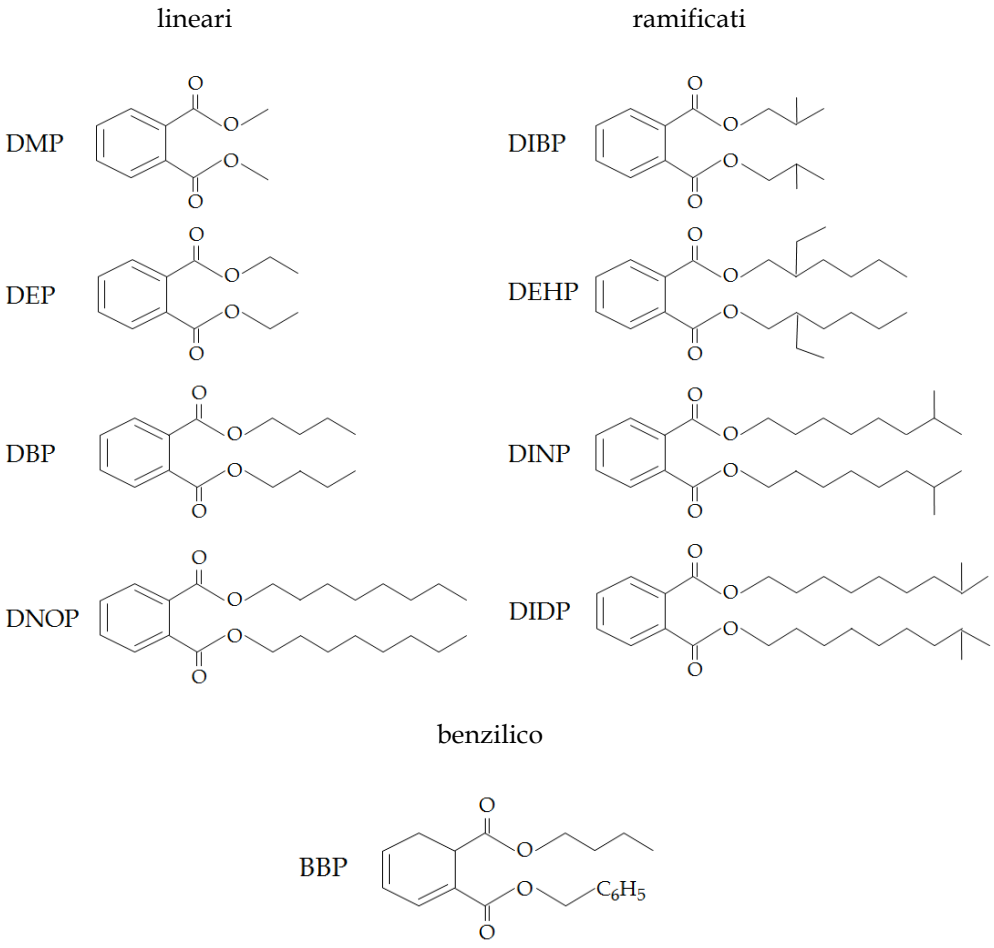
Ftalati	**Source**	**SML (mg/kg)**	**SML(T) (mg/kg)**
DBP	Reg. (UE) N.10/2011	0,3	-
DEHP	Reg. (UE) N.10/2011	1,5	-
BBP	Reg. (UE) N.10/2011	30,0	-
Bisfenolo A	Source	SML (mg/kg)	SML(T) (mg/kg)
BPA	Reg. (UE) N.10/2011	0,6	-
BADGEs 1	Reg. (UE) N.10/2011	-	9,0
BADGEs 2	Reg. (UE) N.10/2011	-	1,0
Fotoiniziatori	Source	SML (mg/kg)	SML(T) (mg/kg)
BP	Swiss Ord. RS 817.023.21	0,6	-
ITX	Swiss Ord. RS 817.023.21	0,05	-
EHA	Swiss Ord. RS 817.023.21	5,0	-

(*) SML(T) indica il limite di migrazione specifica totale per una classe di sostanze simili.

CASO 1: CONTAMINAZIONE DA FTALATI DI ALCUNI FORMAGGI ITALIANI

Gli ftalati (esteri dell'acido ftalico) sono i più diffusi additivi delle materie plastiche. La produzione mondiale di ftalati nel 2015 è stata di circa 6.000.000 di tonnellate. In Europa, il 90% della produzione annuale viene utilizzata per conferire flessibilità ai polimeri, specialmente al PVC. Non legandosi chimicamente al PVC gli ftalati possono disperdersi nell'ambiente o migrare negli alimenti a contatto con il materiale plastico.

ACRONIMO	NOME
DMP	Di-methylphthalate
DEP	Di-ethylphthalate
DBP	Di-butylphthalate
DNOP	Di-n-octylphthalate
DIBP	Di-isobutylphthalate
DEHP	Di-2-ethylhexylphthalate
DINP	Di-isononylphthalate
DIDP	Di-isodecylphthalate
DNOP	Di-n-octylphthalate
BBP	Benzylbutylphthalate



La Figura 1 riporta le percentuali di impiego dei diversi ftalati come plastificanti (flessibilizzanti) del PVC.

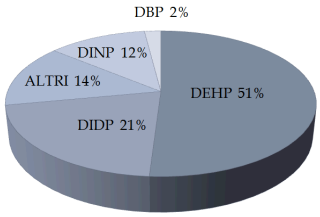


Figura 1 - Principali ftalati utilizzati nella produzione di PVC

1. PROPRIETA' DEGLI FTALATI

I di-esteri dell'acido ftalico sono una classe di sostanze con un ampio intervallo di proprietà fisico-chimiche in funzione del tipo (lineare, ramificata, ecc.) e della lunghezza (1-10-atomi di carbonio) delle catene alchiliche che esterificano i due gruppi funzionali carbossilici. In generale gli ftalati sono:

- liposolubili
- incolori
- inodori
- volatili (DMP, DEP, DIBP, BBP, DEHP)
- termolabili

2. ESPOSIZIONE AGLI FTALATI

Gli ftalati sono classificati *Persistent Organic Pollulants* (POPs). Oltre alla persistenza nell'ambiente gli ftalati si bioaccumulano attraverso la catena alimentare. L'esposizione avviene per inalazione, ingestione e contatto con aria inquinata o con alimenti contaminati. I bambini sono più esposti ad elevate concentrazioni di ftalati provenienti da alimenti contaminati perché è maggiore il consumo di cibo rispetto il loro peso corporeo. Un'ulteriore fonte di ftalati è rappresentata dai giocattoli, articoli sanitari e prodotti cosmetici, mentre l'esposizione del feto è correlata all'esposizione della madre (dispositivi sanitari a base di PVC quali sacche, guanti, cateteri, ecc., e prodotti cosmetici).

3. RISCHIO PER LA SALUTE UMANA

Gli ftalati sono degli *interferenti endocrini* (*Endocrine Disrupting Compounds* = EDCs). Nel 2009 la *Endocrine Society* ha confermato gli effetti nocivi degli interferenti endocrini nei confronti di tutti i sistemi fisiologicamente sensibili agli ormoni. Gli effetti accertati dell'esposizione agli ftalati sono:

- asma e altri disturbi respiratori;
- riniti ed eczemi nei bambini;
- obesità;

- grave deficit di attenzione;
- difficoltà di apprendimento;
- iperattività;
- precoce sviluppo del seno nelle femmine;
- tumore del seno
- alterazione della spermatogenesi nei maschi. (basso numero di spermatozoi, modifica della morfologia degli spermatozoi).

4. LEGISLAZIONE SUGLI FTALATI

Il Regolamento (UE) n. 10/2011 stabilisce i limiti di sicurezza SML e SML(T) e precisa che gli ftalati si possono utilizzare solo come "*plastificanti dei materiali e oggetti ad uso ripetuto a contatto con* ***alimenti non grassi***".

Tabella 6 - SML e SML(T) degli ftalati

Phthalate	Source	SML (mg/kg)	SML(T) (mg/kg)	NOTE
DBP	Reg. (UE) N.10/2011	0,3	-	-
DEHP	Reg. (UE) N.10/2011	1,5	-	-
BBP	Reg. (UE) N.10/2011	30,0	-	-
DNOP	Reg. (UE) N.10/2011	-	9,0	DINP > 60%
DINP				
DIDP				
DINP	Reg. (UE) N.10/2011	-	9 ,0	DIDP > 90%
DIDP				
DIUP				
DMP	Reg. (UE) N.10/2011	-	-	(60 mg/kg)
DEP	Reg. (UE) N.10/2011	-	-	(60 mg/kg)
DIBP	Reg. (UE) N.10/2011	-	-	(60 mg/kg)
DIBP	German BfR	1,0	-	-

5. VALUTAZIONE DEGLI FTALATI NEGLI ALIMENTI

La letteratura scientifica relativa alla contaminazione degli alimenti da ftalati è molto scarsa, per almeno due motivi: 1) gli studi più accreditati sulla contaminazione da ftalati degli alimenti sono molto recenti; 2) la determinazione degli ftalati negli alimenti richiede una procedura analitica molto complessa, sia nella fase di estrazione/purificazione, sia nella messa a punto delle condizioni strumentali (GC-MS o HPLC-MS/MS) ottimali per la separazione, identificazione e quantificazione dei singoli ftalati. Un ulteriore problema - dal punto di vista della procedura - è la diffusione degli ftalati nei locali e nei materiali stessi dei laboratori, una condizione che obbliga ad ottenere, preliminarmente, delle condizioni assolutamente *phthalates-free*, non facilissime da raggiungere.

6. GLI FTALATI NEI FORMAGGI

I formaggi sono alimenti ad elevato contenuto di sostanza grassa, una frazione nella quale gli ftalati, estremamente liposolubili, possono migrare facilmente. La presenza di ftalati nei formaggi può essere dovuta alle interazioni delle diverse matrici (latte di partenza, semilavorati, lavorati, prodotto finito confezionato) con i materiali con cui sono fabbricate

le attrezzature e gli impianti lungo la filiera, ma anche alla contaminazione dovuta all'inquinamento ambientale. Tra i formaggi italiani il *Parmigiano Reggiano*, *Grana Padano* e *Provolone* meritano un'attenzione particolare per almeno tre buone ragioni: 1) sono formaggi di riconosciuto pregio e di grande prestigio, internazionale, con un notevole impatto sul bilancio economico agro-alimentare dei territori di produzione; 2) sono formaggi che vengono stagionati prima del consumo, con un conseguente incremento della percentuale di sostanza grassa (fino ad oltre il 30%) nella quale gli ftalati sono solubili; 3) il mercato segnala un consistente aumento del consumo di Parmigiano Reggiano e Grana Padano grattugiati e di Provolone porzionato, tutti confezionati in buste di plastica (buste-zip).

7. PROCEDURA ANALITICA PER LA DETERMINAZIONE DEGLI FTALATI

L'estrazione/purificazione degli ftalati è stata effettuata con il metodo QuEChERS. La separazione, identificazione e quantificazione dei singoli ftalati è stata realizzata con l'impiego di uno strumento HPLC (ESI)-QqQ, con acquisizione degli spettri in MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). (*vedere*: APPENDICE a pag.25)

8. RISULTATI

Sono stati analizzati campioni prelevati in tutte le fasi significative di 12 filiere di produzione di Parmigiano Reggiano, Grana Padano e Provolone, allo scopo di individuare le possibili fonti di contaminazione da ftalati. In 3 campioni di Grana Padano (grattugiato e confezionato) le quantità di DINP e di DBP sono notevolmente superiori ai corrispondenti valori di SML, mentre la quantità di DIBP lo è solo leggermente, come mostra la Tabella 7. In 1 campione di Provolone (porzionato e confezionato) le quantità di DIBP, DBP e DEHP sono sensibilmente superiori ai corrispondenti valori di SML, come mostra la Tabella 8.

Tabella 7 - Contenuto di ftalati nei campioni della filiera di Grana Padano 3

Campione	DMP (ppb)	DEP (ppb)	BBP (ppb)	DIBP (ppb)	DBP (ppb)	DEHP (ppb)	DNOP (ppb)	DINP (ppb)	DIDP (ppb)	Σ (ppb)
1a	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
2a	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
3a	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
4a	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
5a	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	**130**	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	**130**
6a	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
7a	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	**98**	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	**98**
8a	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	**79**	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	**79**
9a	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1b	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
2b	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
3b	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	**137**	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	**137**
1c	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	**87**	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	**87**
2c	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	**161**	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	**161**
3c	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1d	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	**148**	<LOD	<LOD	**19773**	<LOD	**19921**
2d	<LOD	<LOD	<LOD	**1056**	**1224**	**680**	<LOD	**7461**	<LOD	**10421**
SML	60000	60000	30000	1000	300	1500	SML(T) 9000			

Tabella 8 - Contenuto di ftalati nei campioni della filiera di Provolone 1

Campione	DMP (ppb)	DEP (ppb)	BBP (ppb)	DIBP (ppb)	DBP (ppb)	DEHP (ppb)	DNOP (ppb)	DINP (ppb)	DIDP (ppb)	Σ (ppb)
1b	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
2b	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
3b	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	**72**	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	**72**
4b	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
5b	<LOD	<LOD	<LOD	**3580**	**647**	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	**4227**
6b	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
7b	<LOD	<LOD	<LOD	**1233**	**393**	**3625**	<LOD	<LOD	<LOD	**5251**
8b	<LOD	<LOD	<LOD	**280**	**284**	**1881**	<LOD	<LOD	<LOD	**2445**
9b	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	**153**	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	**153**
10b	<LOD	<LOD	<LOD	**590**	**275**	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	**865**
SML	-	-	30000	1000	300	1500	9000	9000	9000	

Alla luce di questi risultati, si può tentare di valutare l'incidenza delle diverse fasi del processo di produzione dei formaggi sul fenomeno della contaminazione da ftalati.

1. **Latte di partenza**
   Presenti in tracce, gli ftalati possono derivare dai raccordi in PVC delle mungitrici meccaniche o dai tubi di travaso (se in PVC flessibile) del latte nelle cisterne per il trasporto al caseificio.

2. **Processi tecnologici**
   I processi tecnologici a cui vengono sottoposti i formaggi grattugiati e porzionati sono analoghi e non contribuiscono alla migrazione di ftalati nei semilavorati, lavorati e formaggi stagionati.

3. **Stoccaggio e movimentazione**
   Lungo la filiera di produzione sono numerose le materie plastiche (casse, pallet, film protettivi, ecc.) con cui i formaggi, prima del confezionamento, possono venire in contatto. Non si può escludere che alcune materie plastiche contribuiscano alla contaminazione finale da ftalati, benché non sia nota la loro natura.

4. **Confezionamento**
   I nastri trasportatori, i dosatori e altre parti dell'impianto di confezionamento del formaggio sono costituiti da materie plastiche, di cui non era nota la natura. Inoltre, le stesse buste-zip di plastica e gli inchiostri di stampa delle buste contengono ftalati. La contaminazione dovuta agli inchiostri potrebbe derivare dall'effetto della controstampa di tipo *set off* della bobina in avvolgimento, con gli ftalati che migrano dal lato stampato al lato destinato a venire in contatto con il formaggio.

5. **Inquinamento ambientale**
   I risultati dimostrano che in alcuni campioni di alcune filiere di produzione dei 3 formaggi italiani gli ftalati sono assenti o presenti in tracce non quantificabili (<LOQ), ma in altri campioni di altre filiere gli ftalati sono presenti in quantità molto superiori ai valori di SML stabiliti dalla normativa comunitaria. Considerando l'analogia delle tecnologie di produzione dei formaggi, questo carattere occasionale - cioè tutt'altro che

sistematico - della contaminazione da ftalati fa ritenere che nei formaggi la fonte principale sia l'inquinamento ambientale. Gli ftalati, specialmente quelli più volatili, possono contaminare i formaggi per effetto della diffusione dell'aria presente nei locali del caseificio. Pur tuttavia anche le materie plastiche a contatto con gli alimenti, comprese quelle del packaging, possono dare un contributo non trascurabile. Certamente è urgente mettere in campo tutte le iniziative (scientifiche, tecnologiche e legislative) in grado di difendere la salute pubblica da una vera e propria "invasione degli ftalati".

ESEMPI DI CALCOLO DEL RISCHIO ALIMENTARE

1. Escludendo altre fonti di esposizione agli ftalati, quanto grana padano grattugiato, contaminato dai 18.000 µg/kg di DINP, può mangiare un soggetto del peso di 60 kg per non superare la t-TDI ?

   - residuo DINP = 18.000 µg/kg (> SML = 9.000 µg/kg)
   - essendo la t-TDI = 150 µg/kg bw/giorno, per il soggetto di 60 kg diventa = (150 x 60) = 9.000 µg
   - per superare la t-TDI del DINP il soggetto dovrebbe mangiare più di 500 g di grana padano grattugiato in un giorno.

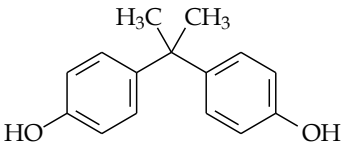
2. Escludendo altre fonti di esposizione agli ftalati, quanto provolone, contaminato da 4.000 µg/kg DI DIBP, può mangiare un soggetto del peso di 60 kg per non superare la t-TDI ?

   - residuo DIBP = 3.000 µg/kg (> SML = 1.000 µg/kg)
   - essendo la t-TDI = 50 µg/kg bw/giorno, per il soggetto di 60 kg essa diventa = (0,05 x 60) = 3.000 µg
   - per superare la t-TDI del DIBP il soggetto dovrebbe mangiare più di 1000 g di provolone in un giorno.

CASO 2: CONTAMINAZIONE DA BISFENOLO A NEI "CANNED FOODS"

1. PREMESSA

Il bisfenolo A (BPA) è uno dei più diffusi monomeri di partenza per la produzione di materie plastiche e di altri composti di sintesi, come riportato nella Figura 2. La produzione mondiale di BPA nel 2015 è stata di circa 6.000.000 di tonnellate.



BPA
2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane

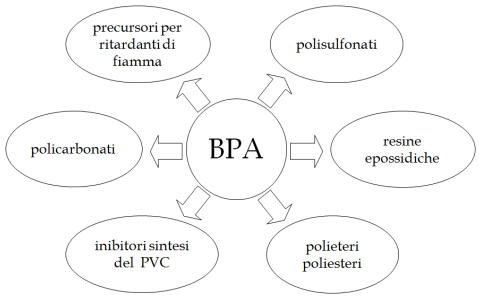


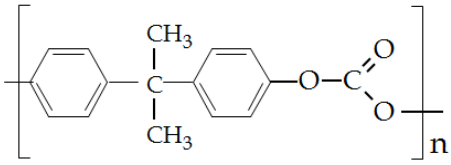
Fig. 2 - Derivati del BPA

Nel packaging alimentare il BPA è il monomero di partenza per la produzione di:

- policarbonati: fabbricazione di contenitori permanenti per alimenti e per microonde
- resine epossidiche: rivestimento (*coating*) di contenitori metallici per alimenti
- resine epossi-fenoliche: rivestimento (*coating*) di contenitori metallici per alimenti

2. FABBRICAZIONE DI BABY BOTTLES

Dal 2011 nei paesi membri della UE è vietata la produzione di biberon fabbricati con policarbonato di bisfenolo A. Anche in Canada (2008), USA (2010), Australia, Giappone, Cina (2012), è vietata la fabbricazione e l'importazione di biberon di policarbonato di BPA.

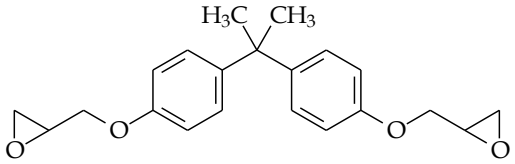


policarbonato di bisfenolo A

Il policarbonato di bisfenolo A, però, è autorizzato per la fabbricazione di contenitori cavi per la conservazione e la cottura al microonde degli alimenti.

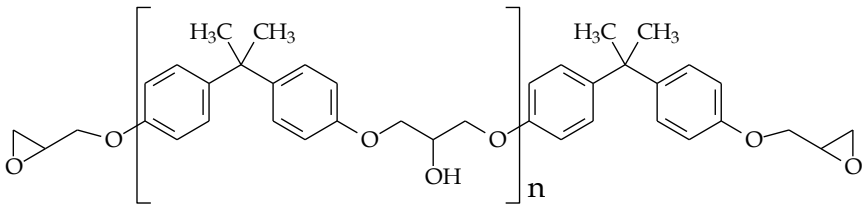
2. PRODUZIONE DI RESINE EPOSSIDICHE

a) Produzione del BADGE
La reazione del BPA con l'epicloridrina, con catalisi basica, produce il bisfenolo A diglicidil etere (BADGE).



BADGE
Bisphenol A Diglycidyl Ether

b) Polimerizzazione del BADGE
Il BADGE è il monomero di partenza del processo di polimerizzazione.



polimero BADGE

c) Produzione di resine epossidiche
La produzione è schematizzata nella Figura 3.

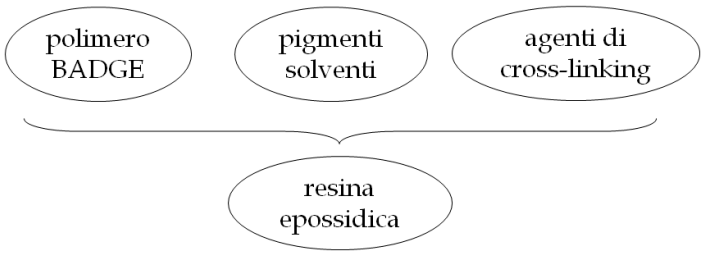


Fig. 3 - Produzione di resine epossidiche

I film ottenuti dalle resine epossidiche sono impiegati come rivestimento (*coating*) smaltato bianco (Ti_2O) o trasparente delle scatole e dei barattoli di latta di alimenti acquosi (prodotti ittici, derivati del pomodoro, mais, ecc.) e delle lattine per bevande analcoliche e alcoliche.

I vantaggi e gli svantaggi dei film di resine epossidiche sono:

VANTAGGI:

- elevata resistenza verso numerosi agenti chimici;
- eccellente resistenza all'abrasione e all'urto;
- eccezionale adesione alle superfici di differente natura

- notevole resistenza a temperature comprese tra -70°C e +100°C;
- quelle a basso peso molecolare non richiedono solventi per la loro sintesi.

SVANTAGGI:

- costo relativamente elevato;
- ingialliscono e opacizzano se esposte a radiazioni UV e/o a contatto con l'ossigeno;
- in condizioni spinte i film diventano fragili e polverizzano.

3. PRODUZIONE DI RESINE EPOSSI-FENOLICHE

Le resine epossi-fenoliche sono copolimeri termoindurenti che si ottengono facendo reagire le resine epossidiche con le resine fenoliche in presenza di catalizzatori. La struttura è riportata nella Figura 4.

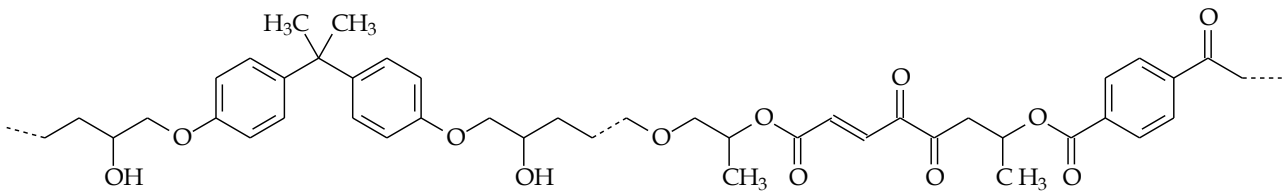


Fig. 4 - Struttura delle resine epossi-fenoliche (epossidiche+fenoliche)

I film ottenuti dalle resine epossi-fenoliche sono impiegati come rivestimenti (*coating*) trasparenti delle scatole e dei barattoli di latta di alimenti sott'olio (prodotti ittici), verdure, frutta sciroppata, pet foods).

I vantaggi e gli svantaggi dei film di resine epossi-fenoliche sono:

VANTAGGI:

- elevata resistenza verso acidi e solventi;
- stabilità alla luce e all'ossigeno (parte fenolica);
- flessibilità, adesione e tenacia (parte epossidica).

SVANTAGGI:

- costo relativamente elevato.

Le resine epossi-fenoliche sono utilizzate anche nel rivestimento interno (coating) di serbatoi, contenitori metallici e cisterne industriali.

4) MIGRANTI DALLE RESINE EPOSSIDICHE ED EPOSSI-FENOLICHE

Le sostanze che dalle resine epossidiche ed epossi-fenoliche possono migrare e contaminare gli alimenti e le bevande sono: BPA, BADGE e BADGEs. Con l'acronimo

BADGEs si definiscono i cloroderivati (cloridrine) e i dioli (prodotti di idrolisi) del BADGE, come riportato nella Figura 5.

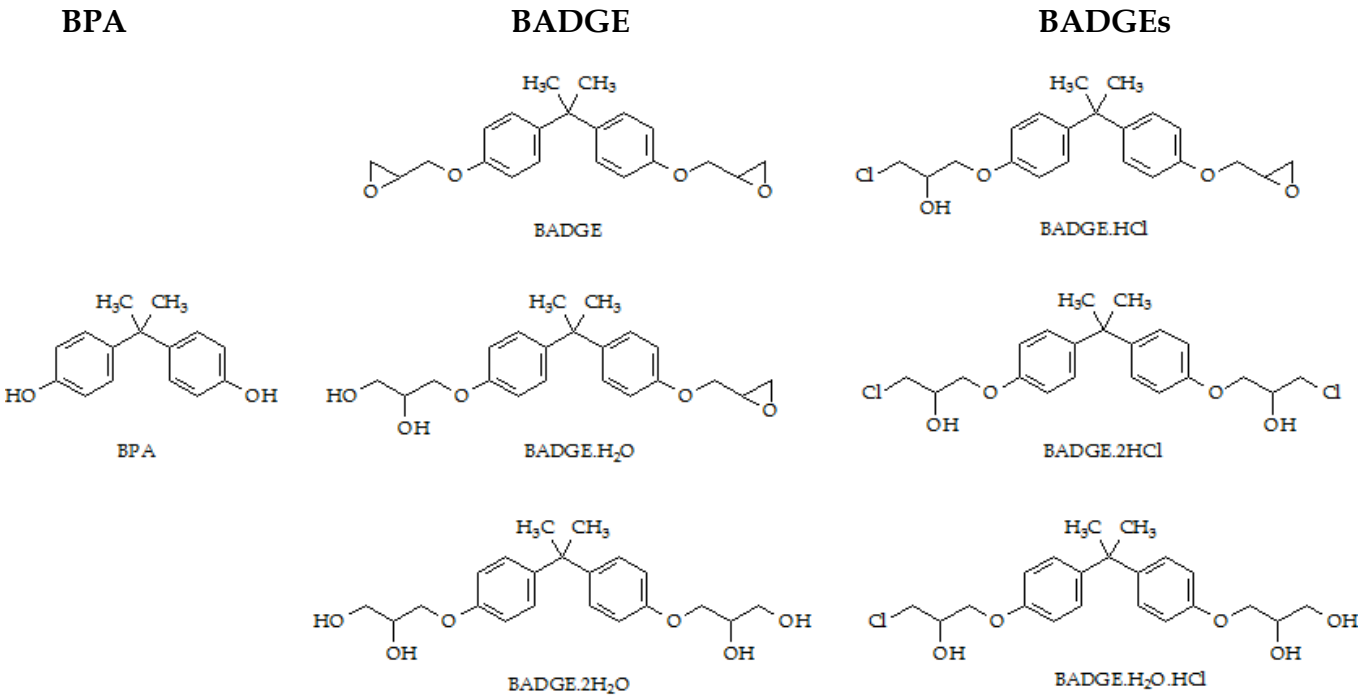


Fig. 5 - Sostanze migranti dalle resine epossidiche ed epossi-fenoliche

5) RISCHIO PER LA SALUTE UMANA DELL'ESPOSIZIONE AL BPA

L'esposizione al BPA è in relazione alla fascia di età, come indicano i valori di assunzione giornaliera stimata del "National Toxicology Program Expert Panel Report", riportati nella Tabella 9.

Tabella 9 - Assunzione giornaliera stimata di BPA

Popolazione	**Assunzione giornaliera stimata** (µg/kg/giorno)
Bambini (0–6 mesi) - Allattamento artificiale	1–11
Bambini (0–6 mesi) - Allattamento al seno	0,2-1
Bambini (6–12 mesi)	1,65-13
Bambini (2–6 anni)	0,043–14,7
Adulti	0,008–1,5

Studi recenti concordano nel classificare il BPA tra gli EDCs (Endocrine Disrupting Compounds). È stato dimostrato che il BPA produce:

- effetti nocivi sullo sviluppo endocrino, durante l'infanzia;

- effetti nocivi sullo sviluppo neurocomportamentale, durante l'infanzia;
- effetti nocivi sul'apparato riproduttivo, durante l'infanzia;
- obesità infantile;
- alterazione della spermatogenesi, con riduzione della fertilità maschile;
- un incremento di disturbi cardiocircolatori, negli adulti;
- un incremento del cancro del seno.

- ✓ La tossicità del BPA è stata studiata in modo esauriente a partire dall'anno 2000, ad eccezione di alcuni studi sull'estrogenicità del BPA risalenti agli anni '30.
- ✓ Nota la tossicocinetica del BPA (rapida biotrasformazione e rapidissima escrezione), la valutazione dell'esposizione a concentrazioni molto basse di BPA non può essere fatta sulla base dei livelli di BPA del sangue, ma su quelli dell'urina.
- ✓ Lang *et al.* (2008) hanno condotto il primo studio sistematico sugli effetti dovuti all'esposizione al BPA sulla salute umana. Alcuni livelli di BPA sono significativamente correlati a disturbi cardiovascolari, diabete, obesità e livelli anormali di alcuni enzimi epatici.
- ✓ L'EFSA (2015) ha stabilito il nuovo valore t-TDI ed ha lasciato invariato quello del 2008 relativo al SML:
  $t\text{-}TDI_{(BPA)}$ = 4,0 µg/kg bw/giorno
  $SML_{(BPA)}$ = 0,6 mg/kg (600 ppb)
- ✓ Il BPA non è genotossico.

DATI RIASSUNTIVI BPA; BADGE, BADGRs

MIGRANTI	TDI (µg/kg bw)	SML (mg/kg)
BPA	4	0,6
BADGE	150	9,0
BADGEs	1.000	1,0

6. RISCHIO PER LA SALUTE UMANA DELL'ESPOSIZIONE A BADGE E BADGEs

Sulla base dei risultati degli studi condotti sulla tossicità/ cancerogenicità cronica nel ratto, un gruppo di esperti dell'EFSA ha concluso che, se somministrato oralmente, il BADGE è privo di potenziale oncogeno nel tratto intestinale o in altri tessuti. Inoltre, tenuto conto dei risultati di test *in vivo* sul topo e dei risultati di precedenti test di mutagenicità *in vitro*, gli esperti hanno concluso che la dicloridrina (BADGE.2HCl) non è genotossico *in vivo*, ma è il composto più critico rispetto la monocloridrina (BADGE.HCl) e la idrossimono-cloridrina ($BADGE.H_2O.HCl$). In sintesi, il gruppo di esperti ha concluso che il BADGE e i BADGEs non destano timori in ordine alla cancerogenicità e alla genotossicità *in vivo*.

L'EFSA (2004) ha stabilito:
TDI(BADGE) = 0,15 mg/kg bw/giorno
TDI(BADGEs) = 1,00 mg/kg bw/giorno

L'EFSA (2005) ha stabilito:
SML(T) (BADGE) = 9,0 mg/kg
SML(T) (BADGEs) = 1,0 mg/kg

E) QUADRO NORMATIVO EU, PAESI EUROPEI, PAESI EXTRA-EUROPEI

- **EU**
  Dal 2011 è vietata la vendita di biberon di policarbonato di BPA in tutti i paesi membri della EU, ma il BPA è ammesso nei FCM.

- **AUSTRIA**
- **BELGIO**
- **DANIMARCA**
- **SVEZIA**

  } Il BPA è vietato nei FCM destinati all'infanzia

- **FRANCIA**
  Dal 2013 il BPA è vietato nei FCM destinati all'infanzia. Dal 2015 è vietato in tutti i FCM.

- **CANADA**
  Dal 2008 è vietata la produzione di biberon contenenti BPA.

- **USA**
  Dal 2010 il BPA è vietato nei prodotti destinati all'alimentazione dell'infanzia. A partire dal 2014 lo stato del Vermont limiterà l'uso del BPA anche negli alimenti in scatola.

- **AUSTRALIA**
  Dal 2012 è vietata la produzione di biberon contenenti BPA

- **GIAPPONE**
  Dal 2012 il BPA è vietato in tutti i FCM prodotti destinati all'infanzia.

- **CINA**
  Dal 2012 è vietata la produzione e l'importazione di biberon contenenti BPA.

7) MIGRAZIONE DI BPA, BADGE E BADGEs NEGLI ALIMENTI
I contenuti di BPA, BADGE e BADGEs sono stati determinati in alimenti e pet foods in scatola. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti dosando gli stessi migranti nelle scatole vergini analoghe a quelle nelle quali erano contenuti gli alimenti, impiegando i simulanti alimentari previsti dal Regolamento (UE) n. 10/2011.

CIBI IN SCATOLA (35)

1. pesce (tonno naturale, tonno sott'olio, ventresca, filetti di acciughe, sardine sott'olio, sgombro sott'olio, salmone naturale, salmone sott'olio)

2. ortaggi e legumi (pomodori, pomodori pelati, mais, fagiolini, fagioli borlotti, fagioli cannellini, piselli, olive al naturale);

3. frutta sciroppata (pesche, ananas);

PET-FOODS IN SCATOLA (9)

4. alimenti diversi della stessa marca

8. PROCEDURA ANALITICA PER DETERMINARE BPA, BADGE E BADGEs

Con i Simulanti A e B l'estratto è stato direttamente sottoposto all'analisi HPLC-(ESI)QqQ. Con il Simulante D2 e con gli alimenti l'estrazione/purificazione del BPA, BADGE e BADGEs è stata effettuata con il metodo QuEChERS. Gli estratti sono stati sottoposti all'analisi HPLC-(ESI)-QqQ. L'acquisizione di tutti gli spettri è stata fatta in MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). (*vedere*: APPENDICE a pag. 25).

9. RISULTATI

Le quantità di BPA, BADGE e BADGEs trovate negli alimenti dovrebbero coincidere con le quantità estratte dalle scatole vergini con i simulanti alimentari previsti dal Regolamento n. 10/2011;

- Premesso che in tutti i campioni di alimenti analizzati il contenuto di BPA, BADGE e BADGEs è inferiore ai corrispondenti valori di SLM o di SML(T) stabiliti dalla normativa europea, è da sottolineare che il confronto con i risultati ottenuti con le scatole vergini non ha alcuna significatività;

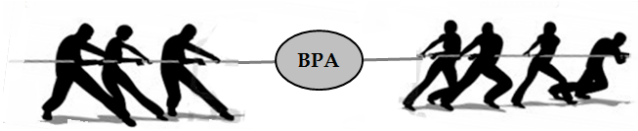
- La discordanza tra i risultati, infatti, supera il 70% dei campioni: il contenuto di migranti negli alimenti è frequentemente inferiore a quello nei simulanti;

- Le diverse quantità di BPA che migrano in alimenti analoghi (es.: tonno sott'olio e al naturale) sono anche da mettere in relazione alla grande varietà di resine epossidiche ed epossi-fenoliche utilizzate nei rivestimenti (*coatings*) delle scatole;

- La migrazione negli alimenti di BPA è differente rispetto le migrazioni di BADGE e di BADGEs, anche in funzione del tipo di alimento. Alcuni BADGE e BADGEs "scompaiono" in funzione del tempo di interazione con gli alimenti, specialmente con matrici a base proteica in mezzo oleoso (sequestro dei migranti da parte della matrice);

- I valori delle migrazioni di BPA, BADGE e BADGEs dalle scatole vergini *non sono attendibili* perché questi traferimenti di materia non sono influenzati dalla matrice. Non a caso l'art. 6 del Regolamento (UE) 10/2011 precisa: "*I risultati delle prove di migrazione specifica ottenuti nei prodotti alimentari prevalgono sui risultati ottenuti nei simulanti alimentari*".
  La perplessità legittima è che il dosaggio dei migranti nei prodotti alimentari sia sempre inferiore a quanto atteso per effetto della matrice. In altre parole, la significatività dei risultati sui singoli alimenti ha come presupposto la quantificazione degli effetti delle

diverse affinità (ovvero della capacità di sequestro) delle diverse matrici alimentari sul dosaggio di BPA, BADGE e BADGEs;



- Le migrazioni riguardano anche sostanze diverse da BPA, BADGE e BADGEs: sono *ftalati*, *impurezze varie*, *prodotti secondari della polimerizzazione*, ecc. Gli effetti dovuti ad alcune di queste sostanze non sono ancora noti e pertanto occorrerà valutare con maggiore rigore il rischio dovuto al consumo di alimenti in scatola;

- È urgente che la tossicologia alimentare affronti il tema degli effetti prodotti dalla presenza contemporanea di più contaminanti ("*effetto cocktail*").

10. CONCLUSIONI

Nel novembre 2012 l'EFSA aveva deciso di procedere alla ri-valutazione del rischio dell'esposizione al BPA utilizzato nei materiali a contatto con gli alimenti; in particolare di valutare gli effetti dell'esposizione al BPA nei gruppi così detti "vulnerabili" (neonati, bambini, anziani, soggetti portatori di patologie).
L'EFSA intendeva riesaminare tutti i dati disponibili e gli studi scientifici sull'esposizione da fonti alimentari, ma anche il contributo dell'esposizione da fonti non alimentari.
La "*Scientific Opinion*" dell'EFSA, annunciata per il 2013, è stata in realtà pubblicata nel 2015 e per il BPA è stato stabilita una *temporary Tolerable Daily Intake* (t-TDI) pari a 4,0 µg/kg bw (la precedente del 2008 era di 50 µg/kg bw).
Dopo la ri-valutazione della sicurezza del BPA, il 30 giugno 2017 l'EFSA ha annunciato l'intenzione di procedere ad una nuova valutazione della tossicità del BPA, in base ai risultati di studi approfonditi ancora in corso negli Stati Uniti. I nuovi dati contribuiranno ad una più accurata valutazione dei possibili effetti del BPA sulla salute umana, peraltro già individuati nelle conclusioni dell'EFSA. La valutazione includerà anche altri studi pertinenti al tema e pubblicati dopo il dicembre 2012, data limite stabilita dall'EFSA per l'esame della letteratura scientifica utilizzata nella revisione della sicurezza del BPA del 2015.
È attesa, come minimo, una revisione dello SML, che dall'attuale 0,6 mg/kg potrebbe essere ridotto a 0,24 mg/kg.

ESEMPIO DI CALCOLO DEL RISCHIO ALIMENTARE

Escludendo altre fonti di esposizione al BPA e alBADGE, quanto tonno al naturale in scatola, contaminato dai due migranti, può mangiare un soggetto del peso di 60 kg per non superare le rispettive TDI ?

BPA

- residuo di BPA = 120 µg/kg (< SML = 600 µg/kg)

- essendo la t-TDI = 4,0 μg/kg bw/giorno, per il soggetto di 60 kg diventa = 240 μg
- per superare la t-TDI del BPA il soggetto dovrebbe mangiare più di 2 kg di tonno al naturale in un giorno.

BADGE

- residuo di BADGE = 200 μg/kg < SML = 9.000 μg/kg
- essendo la TDI = 150 μg/kg bw/giorno, per il soggetto di 60 kg diventa = 9.000 μg
- per superare la TDI dei BADGE il soggetto dovrebbe mangiare più di 45 kg di tonno al naturale in un giorno.

CASO 3: MIGRAZIONE DI FOTOINIZIATORI NEGLI ALIMENTI

1. PREMESSA

Gli inchiostri UV (*UV curable inks*) garantiscono un'immagine stampata molto nitida e di alta qualità, ad un costo unitario molto vantaggioso. Inoltre, non producendo VOCs (*Volatile Organic Compounds*), sono un'alternativa ecosostenibile rispetto agli inchiostri a base di solvente. Nei processi di stampa del *food packaging* (flessografica, off set, serigrafica, ecc.), la tecnologia prevede la polimerizzazione dell'inchiostro mediante radiazioni UV (*reticolazione*). Per attivare la reticolazione, però, è necessario aggiungere dei *fotoiniziatori* che, decomponendosi, formano i radicali iniziali indispensabili per la reazione di

polimerizzazione dei doppi legami dei costituenti degli inchiostri UV.
Almeno 3 interrogativi richiedono una risposta:

1. In che misura i fotoiniziatori migrano negli alimenti e nelle bevande ?

2. La migrazione dipende dallo stato fisico dell'alimento (solido, liquido, emulsione) e/o dal suo tenore di grasso ?

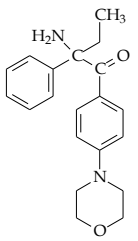
3. È noto il rischio per la salute umana dovuto all'esposizione ai fotoiniziatori ?

2. FOTOINIZIATORI

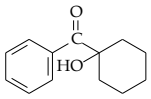
La produzione mondiale di fotoiniziatori non è reperibile, ma è certamente in espansione per effetto della diffusione degli inchiostri UV in tutti i processi di stampa. Il numero di fotoiniziatori è molto ampio e la Tabella 10 riporta quelli più impiegati nel settore del food packaging.

Tabella 10 - Fotoiniziatori impiegati negli UV inks del food packaging

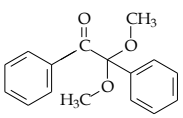
NOME IUPAC	NOME COMUNE	ACRONIMO
2-benzyl-2-(dimethylamino)-4'-morpholinobutyrophenone	Irgacure 369	IRG 369
1-hydroxy cyclohexyl phenyl ketone	Irgacure 184	IRG 184
2,2-dimethyloxy-2-phenylacetophenone	Irgacure 651	IRG 651
benzophenone	BP	BP
4-methyl benzophenone	4-MBP	4MBP
diphenyl (2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphine oxide	TPO	TPO
4-phenyl benzophenone	PBP	PBP
2-isopropyl thioxanthone	ITX	ITX
1-[4-[(4-benzoylphenyl)thio]phenyl]-2-methyl-2-[(4 methyl phenyl) sulfonyl-1-propanone	Esacure 1001	ESA 1001
phenyl bis-(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphine oxide	Irgacure 819	IRG 819
2-ethyl hexyl-4-(dimethylamino)benzoate	EHA	EHA



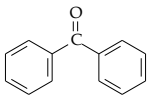
Irgacure 369



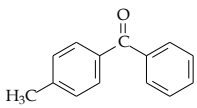
Irgacure 184



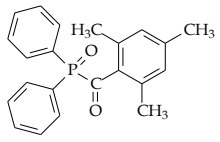
Irgacure 651



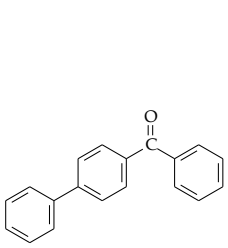
BP



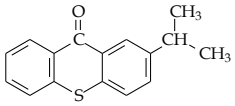
4-MBP



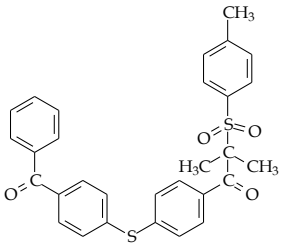
TPO



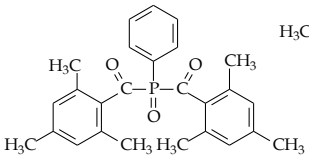
4-PBP



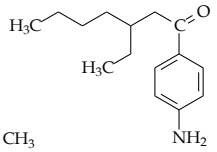
ITX



Esacure 10011



Irgacure 819



EHA

3. LEGISLAZIONE SUGLI INCHIOSTRI

Nella EU *non esiste* una legislazione specifica sugli inchiostri e neppure sulle modalità di stampa, ma si devono applicare le norme generali relative a tutti i componenti del packaging, stabilite dall'art. 3 del Regolamento (CE) n. 1935/2004. Anche per gli inchiostri ci si deve attenere anche a quanto prescritto nell'Allegato al Regolamento (CE) n. 2023/2006 sulle "Norme specifiche sulle buone pratiche di fabbricazione".

1. Gli inchiostri da stampa applicati sul lato dei materiali o degli oggetti non a contatto con il prodotto alimentare devono essere formulati e/o applicati in modo che le sostanze presenti sulla superficie stampata non siano trasferite al lato a contatto con il prodotto alimentare:

   - attraverso il substrato oppure
   - a causa del set-off quando vengono impilati o sono sulle bobine,

   in concentrazioni che portino a livelli di sostanza nel prodotto alimentare non in linea con le prescrizioni di cui all'articolo 3 del Regolamento (CE) n. 1935/2004.

2. I materiali e gli oggetti stampati in stato finito o semifinito vanno movimentati e immagazzinati in modo che le sostanze presenti sulla superficie stampata non siano trasferite al lato a contatto con il prodotto alimentare:

   - attraverso il substrato oppure
   - a causa del set-off quando vengono impilati o sono sulle bobine,

   in concentrazioni che portino a livelli di sostanza nel prodotto alimentare non in linea con le prescrizioni di cui all'articolo 3 del regolamento (CE) n. 1935/2004.

In Europa, l'unica legislazione che norma l'impiego dei fotoiniziatori è un'ordinanza svizzera (Swiss Ordinance RS 817.023.21 del 23.11.2005) che prevede una lista positiva dei fotoiniziatori con i rispettivi SML. La normativa EU ha fissato il TDI per il BP e gli SML soltanto per il BP e il 4-MBP.

NOME	SML (ppb)
Irgacure 369	10
Irgacure 184	10
Irgacure 651	10
BP	600
4-MBP	600
TPO	10
PBP	600
ITX	50
Esacure 1001	50
Irgacure 819	3300
EHA	10

4. RISCHIO PER LA SALUTE UMANA DELL'ESPOSIZIONE AI FOTOINIZIATORI

Nonostante non siano ancora chiari gli effetti prodotti sulla salute umana dall'esposizione alla maggior numero di fotoiniziatori, in un recente lavoro(*) sono stati studiati gli effetti dell'ITX e di alcuni suoi derivati, sul processo di formazione degli ormoni steroidei. I risultati indicano che l'ITX ed i suoi derivati possono agire come interferenti endocrini (EDCs):

i) come *antagonisti* degli ormoni a livello dei *recettori cellulari* (proteine che si legano con gli ormoni e con molecole a struttura steroidea);

ii) nella *produzione degli ormoni steroidei*.

Per il benzofenone l'EFSA ha stabilito una TDI = 30 mg/kg bw.

(*) M. Reitsma *et al.*: "Endocrine-Disrupting Effects of Thioxanthone Photoinitiators". *Toxicological Sciences*, 132, *1*, 64-74 (2013).

6. MIGRAZIONE DI FOTOINIZIATORI

E' stato determinato il contenuto dei più diffusi fotoiniziatori nei seguenti materiali stampati:
carta, cartone, plastica, Brik Tetra Pak
e nei seguenti alimenti a contatto con questi materiali:
a. *maionese*
b. *insalate varie condite*
c. *salami*
d. *formaggi*
e. *yogurt*
f. *succhi di frutta*

per caratterizzare la migrazione dei fotoiniziatori dal packaging verso gli alimenti e le bevande.

7. PROCEDURA ANALITICA PER LA DETERMINAZIONE DEI FOTOINIZIATORI

L'estrazione/purificazione dei fotoiniziatori è stata effettuata con il metodo QuEChERS. La separazione, identificazione e quantificazione dei singoli ftalati è stata effettuata con uno strumento HPLC(ESI)-MS/MS, con acquisizione degli spettri in MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). (*vedere*: APPENDICE a pag. 25)

8. RISULTATI

In un'etichetta cartacea di un salame tipo Milano sono stati identificati 11 fotoiniziatori diversi, ma nei diversi materiali analizzati il numero medio è 5,5 fotoiniziatori e la quantità media è 12.000 mg/kg. Le migrazioni dai diversi materiali sono modeste: mediamente 1 solo fotoiniziatore e pochi mg/kg (meno dello 0,1% della quantità di fotoiniziatori presenti nel materiale a contatto migra nell'alimento). Le migrazioni sono anche indipendenti dallo stato fisico dell'alimento e/o dal suo contenuto di grassi, come si può dedurre dal confronto dei dati della Tabella 11 con quelli della Tabella 12.
Pur tuttavia, il rischio per la salute umana dovuto all'esposizione ai fotoiniziatori deve essere valutato con più scrupolo ed è urgente mettere a disposizione tutti i dati scientifici indispensabili agli organismi della EU per stabilire, per ciascun fotoiniziatore, le TDIs e i SMLs.

Tabella 11 - Contenuto di fotoiniziatori nel materiale del packaging (ppb)

CONTENITORE	ALIMENTO	IRG 369	IRG 184	IRG 651	BP	4-MBP	TPO	PBP	ITX	ESA 1001	IRG 919	EHA	Σ
Tubo di plastica	1	56	13200	31800	41	11100	483	19400	< LOD	< LOD	< LOD	422	76502
Scatola di plastica	2	298	126	10	6	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	1840	367	< LOD	2647
Scatola di plastica	3	305	125	9	13	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	2660	446	< LOD	3558
Etichetta di carta	4	1150	187	13	188	13	< LOD	40	< LOD	< LOD	6870	< LOD	8461
Etichetta di carta	5	1280	25	24	239	16	< LOD	45	< LOD	< LOD	8090	< LOD	9719
Etichetta di carta	6	793	34	27	430	26	< LOD	115	< LOD	< LOD	4850	< LOD	6275
Etichetta di carta	7	2280	52	33	156	5	546	3170	2290	< LOD	<LOD	3490	12022
Etichetta di carta	8	239	46	27	384	51	542	17800	<LOD	< LOD	106	12700	31895
Etichetta di carta	9	3330	1000	85	81	21	3220	20700	14400	10	1420	17100	61367
Scatola di plastica	10	13	148	492	2	109	< LOD	141	< LOD	17	178	< LOD	1100
Scatola di plastica	11	1080	135	10	5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	1890	< LOD	3120
Scatola di plastica	12	529	16	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	545
Scatola di plastica	13	< LOD	17	7	34	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	58
Scatola di plastica	14	19	3	17	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	39
Scatola di cartone	15	2200	21	< LOD	16	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	333	< LOD	2570
Vasetto di plastica	16	718	25	4	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	248	< LOD	< LOD	995
Brik Tetra Pak	17	428	149	2	53	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	406	< LOD	1038
Brik Tetra Pak	18	6180	23	4	49	< LOD	< LOD	238	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	6494

Tabella 12 - Contenuto di fotoiniziatori negli alimenti (ppb)

ALIMENTO	IRG 369	IRG 184	IRG 651	BP	4-MBP	TPO	PBP	ITX	ESA 1001	IRG 919	EHA
1. Maionese	<LOD	12	14,8	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	30,9	<LOD	<LOD
2. Insalata capricciosa	<LOD	7,2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
3. Insalata Olivier	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
4. Salame Campagnolo	<LOD	5,9	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
5. Salame Milano	<LOD	6,1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
6. Salame Cacciatore	<LOD	5,3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
7. Salame Cacciatore	<LOD	7	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
8. Salame Campagnolo	<LOD	5,5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
9. Salame Milano	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
10. Ricotta	<LOD	5,7	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
11. Ricotta	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
12. Marcarpone	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
13. Formaggio fresco	<LOD	8,7	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
14. Formaggio spalmabile	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
15. Mozzarella	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
16. Yogurt bianco	<LOD	21	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
17. Succo di polpelmo	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
18. Succo di arancia rossa	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
SML	10	10	10	600	600	10	600	50	50	3300	10

NOTA: i valori di SML indicati nella Tabella 12 sono quelli stabiliti dalla Swiss Ordinance RF 817.023.21 del 2005.

ESEMPI DI CALCOLO DEL RISCHIO ALIMENTARE

Escludendo altre fonti di esposizione al benzofenone(BP), quanto salame, contaminato da 900 µg/kg di BP, può mangiare un soggeto del peso di 60 kg per non superare la rispettiva TDI ?

- residuo di BP = 900 µg/kg (> SML = 600 µg/kg - Swiss Ordinance RS)
- essendo la TDI = 30 µg/kg bw/giorno, per il soggetto di 60 kg diventa = (30 x 60) = 1.800 µg;
- per superare la TDI del BP il soggetto dovrebbe mangiare più di 2 kg di salame in un giorno.

CONCLUSIONI FINALI

Sono stati illustrati i risultati di alcune ricerche sulla contaminazione degli alimenti dovuta alla migrazione di ftalati, BPA e BADGE, fotoiniziatori. Nonostante gli effetti nocivi delle sostanze migranti dipendano da molti fattori, tra cui è preminente la dose, anche le modalità d'impiego del packaging dell'alimento confezionato (usa e getta, permenente, a caldo, a freddo, ecc.) hanno molta importanza. Bisogna tenere presente che, sovente, non è breve il periodo che trascorre tra la produzione di alimenti e bevande e il momento del loro consumo. Specialmente per gli ftalati e le resine del bisfenolo A i competenti organismi nazionali ed internazionali (EFSA, FDA, WHO, ecc.) hanno la responsabilità di imporre l'eliminazione o, più realisticamente, la consistente riduzione dei loro SMLs nei FCMs, ed anche una seria revisione delle loro TDIs.
Per maggiore completezza d'informazione riteniamo doveroso citare altri contaminanti che la comunità scientifica ha messo sotto osservazione già da alcuni anni.

- Resine melamminiche
  Utilizzate per la fabbricazione di piatti, bicchieri, posate e contenitori cavi, dalle resine possono migrare negli alimenti e nelle bevande i due componenti base: *melammina* e *formaldeide*.

- PET
  È il più diffuso polimero per la fabbricazione di bottiglie per bevande, dal quale possono migrare *acetaldeide* e *formaldeide*.

- PTFE (Teflon)
  È lo strato antiaderente delle padelle, il cui costituente PFOA (*acido perfluoroottanoico*) appartiene alla categoria dei PFAS (*sostanze polifluoroalchiliche*). Con le PFAS si impermealizza la carta del packaging di numerosi alimenti (pop corn, burro, sandwich, ecc.). Il quadro tossicologico del PFOA e delle PFAS è molto allarmante (riduzione dell'efficacia dei vaccini, riduzione della ferilità maschile e femminile, ecc.).

Concludiamo con una domanda: quali effetti producono più contaminanti presenti contemporaneamente in un alimento o in una bevanda ?
Una risposta, ragionevole, potrebbe essere:
La tossicologia degli alimenti è una scienza relativamente "giovane": essa ha fatto notevoli progressi nello studio sistematico dei singoli xenobiotici (esposizione, fase tossicocinetica, fase tossicodinamica, studi epidemiologici, limiti di sicurezza, ecc.), ma oggi deve approfondire le conoscenze sulla complessità che deriva dalla frequente presenza contemporanea di più sostanze (*effetto cocktail*). Le soluzioni non sono facili, perché il numero di combinazioni è potenzialmente illimitato e gli effetti antagonisti e sinergici tra le sostanze chimiche - unitamente alla possibilità che la loro reattività produca anche sostanze di neoformazione - generano sistemi molto complessi. Un primo approccio potrebbe essere proprio quello di approfondire le conoscenze a partire da sistemi modello reali, ma semplici, per introdurre successivamente, in base alle evidenze scientifiche, ulteriori elementi di complessità. Ma, subito, perché è già tardi, bisogna cercare di eliminare o ridurre sensibilmente le fonti di ftalati e di bisfenolo A.

APPENDICE

La procedura analitica utilizzata in queste tre ricerche si articola in 2 fasi:
1) estrazione/purificazione
2) separazione ed identificazione degli analiti.
L'estrazione/purificazione è stata effettuata con il metodo QuEChERS, una procedura relativamente recente (Anastassiades et al., 2003), detta anche "estrazione in fase solida dispersa" (dSPE) che comporta steps veloci, facili, economici, efficaci, vigorosi e sicuri. La separazione degli analiti è stata realizzata con una *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). L'identificazione e quantificazione degli analiti è stata fatta mediante *Spettrometria di Massa a triplo quadrupolo* (QqQ) con una sorgente ionica *ElectroSpray Ionization* (ESI).

1. METODO DI ESTRAZIONE/ PURIFICAZIONE QuEChERS

Il metodo QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe) è una tecnica di estrazione/purificazione che negli ultimi anni, per versatilità, facilità d'impiego, tempi ridotti e costi contenuti, si è molto diffusa in molteplici settori di applicazione della chimica analitica, sovente in alternativa alle più diffuse SPE (*Solid Phase Extraction*) e SPME (*Solid Phase Micro Extraction*).
Il QuEChERS prevede un Dispersive Sample Preparation Kit costituito da un *DisQue 1 extraction* (tube 1) e da un *DisQue clean-up* (tube 2). I protocolli del metodo QuEChERS consistono in una serie di operazioni molto semplici a cui viene sottoposta la matrice. Si parla di protocolli perché la flessibilità del metodo consiste proprio nella possibilità di modificare il protocollo standard in funzione del tipo di matrice e di analiti.
Il protocollo standard, comunque, prevede l'estrazione con un solvente miscibile in acqua (abitualmente acetonitrile), in presenza di sali (NaCl e $MgSO_4$) e di sostanze tampone (citrati), allo scopo di favorire la separazione delle fasi e la stabilizzazione del pH della soluzione. La diffusione dell'acetonitrile dipende essenzialmente da due motivi: è un solvente con un ridotto potere estraente nei confronti della frazione lipidica della matrice e consente anche una più efficace rimozione dell'acqua residua in seguito all'aggiunta dei sali.

DisQue 1, tube (50 ml)

4 g ± 0,2 g di $MgSO_4$ anidro

1 g ± 0,05 g di NaCl

1 g ± 0,05 g di citrato trisodico diidrato

0,5 g ± 0,03 g di idrogeno citrato disodico sesquiidrato

DisQue, tube (2 ml)

25 mg di $MgSO_4$ anidro

150 mg di PSA

Nel caso di matrici a scarso contenuto di acqua, per ottimizzare l'estrazione è necessario aggiungere acqua in misura dipendente dal peso di campione sottoposto all'estrazione. I sali, in funzione del solvente utilizzato nell'estrazione, influiscono anche sulla ripartizione degli analiti. Dopo la miscelazione e la

centrifugazione, un'aliquota della fase organica viene sottoposta alla fase di purificazione mediante dSPE (*dispersive Solid Phase Extraction*). Dopo centrifugazione il surnatante può essere prelevato e analizzato direttamente per Gascromatografia (GC) o per Cromatografia Liquida (HPLC).

A) Fase di estrazione:

1. Pesare 10 g di campione omogeneo in tubo da centrifuga;
2. Aggiungere 10 ml di solvente ed uno standard interno e agitare vigorosamente per 1 minuto;
3. Aggiungere:
   4,0 g di $MgSO_4$ anidro;
   1,0 g di NaCl
   1,0 g di citrato trisodico diidrato;
   0,5 g di idrogenocitrato disodico sesquiidrato;
4. Agitare vigorosamente per 1 minuto e centrifugare per 5 minuti a 3000 rpm/min

NOTA: il $MgSO_4$ anidro, ad una concentrazione prossima alla saturazione, consente un notevole incremento delle percentuali di recupero perché favorisce la ripartizione degli analiti nella fase organica. Il NaCl esalta l'affinità del solvente di estrazione verso gli analiti L'azione tamponante dei citrati consente il controllo del pH.

B) Fase di clean-up:

5. Trasferire 1 ml di surnatante in un tubo da centrifuga contenente 25 mg di ammine primarie e secondarie e 150 mg di $MgSO_4$ anidro;
6. Agitare vigorosamente per 30 secondi e centrifugare per 5 minuti a 3000 rpm/min;
7. Trasferire 1 ml di surnatante in un vial e iniettare nel sistema HPLC

NOTA: le ammine primarie e secondarie (*Primary and Secondary Amines* = PSA) hanno la funzione di rimuovere le eventuali impurezze presenti nella matrice. In commercio sono disponibili i kit per l'applicazione del metodo QuEChERS e la scelta del kit dipende dal protocollo che si intende utilizzare e dalla natura degli analiti.

In estrema sintesi il QuEChERS, rispetto l' Estrazione in Fase Solida (SPE), impiega meno solvente di estrazione (-75%), riduce il tempo di preparazione del campione (-75%) ed i costi (-75%), senza penalizzare la resa di estrazione (> 90%). Dovendo analizzare un numero consistente di campioni questi vantaggi diventano determinanti.

2. CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE (HPLC)

I più diffusi metodi cromatografici per separare i componenti di un estratto ottenuto da matrici biologiche sono la Gascromatografia (*Gas Chromatography* = GC) e la Cromatografia Liquida ad Alta Prestazione (*High Performance Liquid Chromatography* = HPLC). La maggiore diffusione, fino a qualche anno fa, della GC non è più attuale, perché oggi la

HPLC può disporre di colonne di piccolo diametro, di nuove fasi stazionarie e di sofisticati dispositivi per il rigoroso controllo del flusso della fase mobile.
Inoltre, la HPLC opera a temperatura relativamente bassa, una condizione che preserva le sostanze termolabili da quelle possibili decomposizioni che sono invece frequenti alle comuni temperature di esercizio della GC.
Infine, nell'accoppiamento con la spettrometria di massa, la HPLC attuale consente di utilizzare delle sorgenti ioniche "*soft*" (ESI, APCI, ecc.) che producono degli ioni gassosi a pressione atmosferica e a temperature relativamente basse, due condizioni che sono particolarmente adatte all'analisi dei costituenti, sovente termolabili, delle matrici biologiche e dei polimeri sintetici.
Un cromatografo HPLC è riportato nella Figura 1.

Fig. 1 - Cromatografo HPLC

3. SPETTROMETRIA DI MASSA

La massa e le radiazioni elettromagnetiche sono le due "*qualità fondamentali*" dell'universo. Numerosi metodi spettroscopici (UV, IR, RAMAN, RAGGI X, NMR, ecc.) studiano l'interazione tra le frequenze delle radiazioni elettromagnetiche e la materia, ma una sola

tecnica è in grado di rivelare la massa della materia: la spettrometria di massa (MS). Le fasi dell'analisi MS possono essere così riassunte:

1. le molecole gassose o rese gassose di un analita (separate da quelle degli altri analiti per via GC o HPLC) entrano nello spettrometro di massa;
2. nella sorgente ionica (***ion source***) le molecole vengono ionizzate e gli ioni molecolari che si formano si frammentano in ioni positivi o negativi stabili con valori m/z, ovviamente, inferiori a quello dello ione molecolare;
3. tutti gli ioni prodotti in sorgente (ioni molecolari, se stabili, e ioni frammento) vengono accelerati e focalizzati nell'analizzatore di massa (***mass analyzer***) magnetico, quadrupolare, a tempo di volo, ecc., nel quale vengono separati in base al rapporto m/z;
4. gli ioni separati nell'analizzatore vengono focalizzati sul collettore del detector (***electromultiplier***) e trasformati in segnali che, nel loro insieme, costituiscono lo spettro di massa (*Mass Spectrum*) della molecola dell'analita;
5. i segnali e l'abbondanza dello ione molecolare e dei diversi ioni frammento consentono di identificare la struttura molecolare e di quantificare l'analita.

Lo schema di uno spettrometro di massa è riportato nella Figura 2.

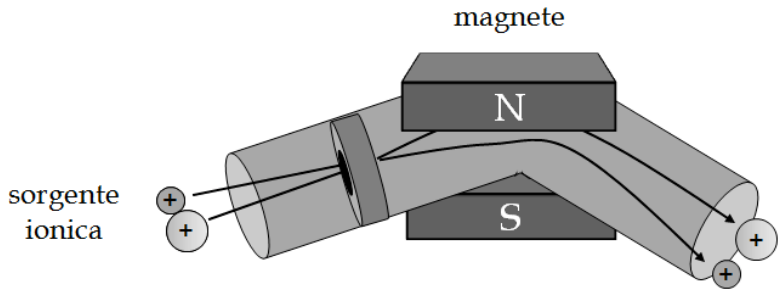


Fig. 2 - Schema di uno spettrometro di massa (analizzatore magnetico)

a) **Sorgente ioniche: electrospray (ESI)**

Nella spettrometria di massa, essendo numerose le modalità di ionizzazione delle molecole, è ampia la disponibilità sul mercato di differenti sorgenti ioniche (*ion source*).
La *ElectroSpray Ionization* (ESI) è il sistema di *soft ionization* più diffuso nell'accoppiamento LC-MS, perché produce ioni gassosi a pressione atmosferica, due condizioni molto favorevoli nell'analisi di biomolecole e di polimeri sintetici, sovente termolabili. Nella sorgente ESI avviene un processo di *electrospraying* che può essere così descritto: la soluzione del campione proveniente dalla LC (analiti + solventi) è convogliata in un ago capillare di acciaio inossidabile mantenuto ad una tensione di 5-10 kVolt. Si formano delle goccioline (~1μm) che, in seguito all'evaporazione del solvente ad opera di un *nebulizer gas* (N_2), si riducono di dimensione. Incrementando il voltaggio si accentua l'effetto del campo elettrico e di conseguenza la forza esercitata sulla gocciolina porta alla formazione di un cono (cono di Taylor), come illustrato nella Figura 3.

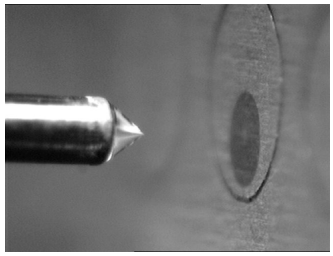


Fig. 3 - Immagine ad alta risoluzione di un cono di Taylor.

Quando si raggiunge una tensione di soglia, ovvero quando la tensione superficiale eguaglia la repulsione elettrostatica (*limite di Rayleight*), le goccioline iniziali si frammentano in goccioline più piccole (3-10 nm) per effetto della *fissione coulombiana* (la repulsione delle cariche dello stesso segno supera la tensione superficiale). Il processo di fissione si ripete fino a quando il solvente non viene completamente rimosso dagli analiti, con produzione di ioni positivi o negativi a carica multipla in fase gassosa. La sorgente ESI è costituita essenzialmente da due elettrodi; l'estremità dell'ESI "*capillary*" e il "*curtain plate*. Gli ioni accelari dallo "*skimmer electrode*", entrano nell'analizzatore di massa, come schematizzato nella Figura 4.

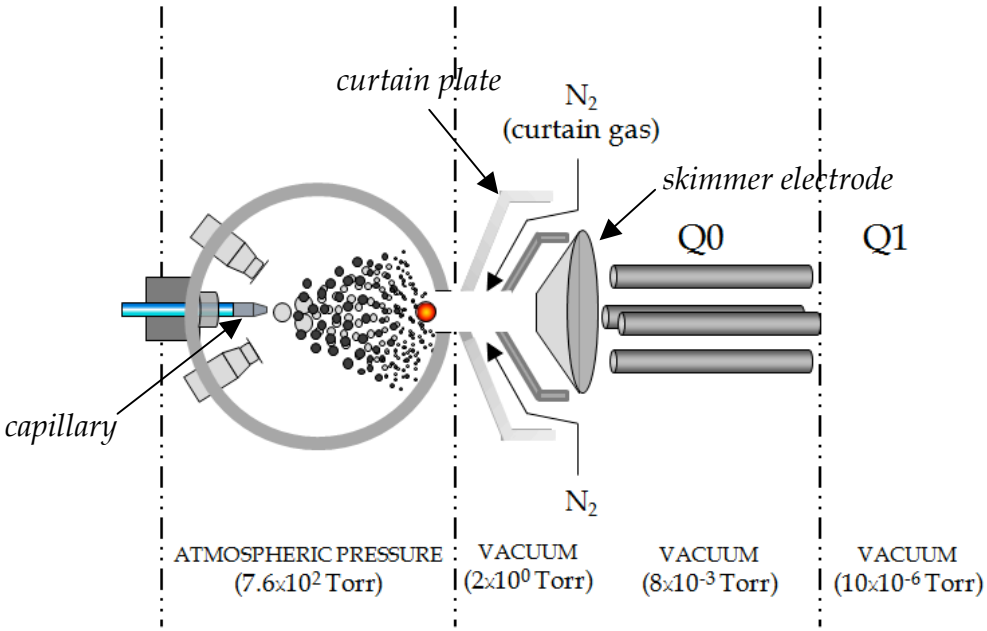


Fig. 4 - Sorgente ionica ESI.

Non essendoci frammentazione degli ioni, gli spettri di massa ottenuti con l'accoppiamento LC(ESI)-MS non forniscono informazioni strutturali, ma identificano il peso molecolare dell'analita.
Per ottenere informazioni strutturali la sorgente ESI può essere utilmente accoppiata con la spettrometria di massa "*tandem*" (MS/MS), anche con i meno costosi analizzatori a quadrupolo (Q). Infatti, con la formazione di ioni positivi o negativi a carica multipla, i valori di m/z da separare sono tali da richiedere uno spettrometro con un *mass range* di 1500 Dalton, caratteristico degli attuali Q *mass analyzer*. Gli ioni dello spettro di massa sono in realtà ioni *quasimolecolari*, ossia ioni positivi $[M + nH]^{n+}$ quando lo ione molecolare

acquista rispettivamente "n" protoni, oppure ioni negativi $[M - nH]^{n-}$ quando lo ione molecolare perde "n" protoni.

b) Analizzatori di massa: filtro a quadrupolo (Q)

Gli analizzatori di massa separano gli ioni prodotti nella sorgente ionica in base al rapporto m/z. I principi che governano la separazione degli ioni sono numerosi, ma gli analizzatori di massa più comuni negli accoppiamenti GC (GC-MS) e HPLC (LC-MS) sono:

- analizzatore magnetico (M = *magnetic*)
- analizzatore a tempo di volo (TOF = *time-of-flight*)
- analizzatore (filtro) a quadrupolo (Q = *quadrupole*)

Nella Figura 5 è schematizzano un analizzatore di massa a quadrupolo.

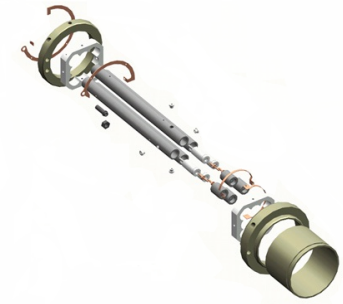


Fig. 5 - Analizzatore a quadrupolo (Q).

L'analizzatore di massa a quadrupolo è costituito da 4 barre cilindriche parallele che funzionano da elettrodi. Le barre opposte sono collegate tra loro, una coppia al polo positivo e una coppia al polo negativo di un generatore variabile in corrente continua (DC o U). Ad ogni coppia di barre è applicato anche un potenziale variabile in corrente alternata a radiofrequenza (V o RF), con uno sfasamento di 180°.

Gli ioni vengono accelerati nel canale (campo quadrupolare) risultante dalla geometria delle barre applicando una differenza di potenziale di 5-10 V, mentre i potenziali sulle barre in corrente continua e in radiofrequenza vengono aumentati simultaneamente mantenendo costante il loro rapporto (RF/U = ~6).

Ad un determinato istante, tutti gli ioni presenti nel campo quadrupolare collidono con le barre e si neutralizzano, tranne quelli il cui valore m/z produce traiettorie stabili ai potenziali di RF e U (a rapporto costante) di quel preciso momento e che, attraversato il campo quadrupolare, possono raggiungere il trasduttore (o detector). In sintesi, il campo quadrupolare agisce da filtro di massa, sulla base dei potenziali in RF e in U rispetto i valori m/z degli ioni, tanto che è comune definire il quadrupolo un *filtro di massa* piuttosto che un *analizzatore di massa*.

Per comprendere le proprietà del quadrupolo occorre considerare l'effetto dei potenziali in RF e in U sulla traiettoria degli ioni che percorrono il canale tra le barre.

Prendiamo in considerazione le barre positive nel piano *xz* in presenza di un potenziale in RF: se non c'è potenziale in U gli ioni positivi che traslano lungo il canale tenderanno a convergere verso il centro durante il semiciclo positivo del potenziale in RF e a divergere durante il semiciclo negativo, come mostra la Figura 6.

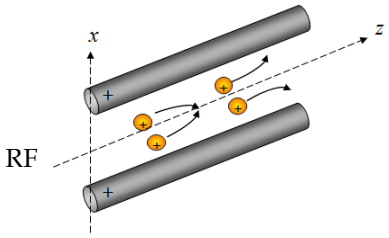


Fig. 6 - Focalizzazione degli ioni nel piano *xz*.

Se durante il semiciclo negativo del potenziale in RF uno ione positivo collide con la barra, la sua carica positiva verrà neutralizzata. Uno ione collide o non collide con una delle barre in funzione della sua velocità di traslazione lungo l'asse *x*, del suo rapporto m/z, della frequenza e del valore del potenziale in RF. Consideriamo ora l'effetto di un potenziale positivo in U sovrapposto al segnale in RF. Dalla fisica newtoniana è noto che il momento della quantità di moto di ioni di uguale energia cinetica è direttamente proporzionale alla $\sqrt{m}$. E' dunque più difficile deviare uno ione più pesante rispetto uno ione più leggero. Se uno ione positivo ha un valore m/z elevato o la frequenza del potenziale in RF è elevata, lo ione non risente in modo apprezzabile del potenziale in RF, ma sarà influenzato prevalentemente dal potenziale in U, rimanendo confinato nel canale tra le barre (stabilizzazione della traiettoria per effetto di U). Viceversa, se uno ione positivo ha un valore di m/z basso o la frequenza del potenziale in RF è bassa, lo ione colliderà con la barra è sarà neutralizzato nel semiciclo negativo del potenziale in RF, come mostra la Figura 7. La coppia di barre positive agisce dunque da *filtro di massa passa-alto*.

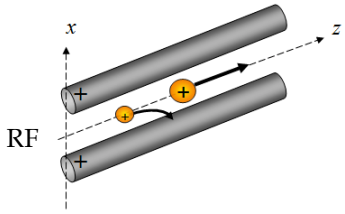


Fig. 7 - Filtro *passa-alto* nel piano *xz*.

Prendiamo ora in considerazione le barre negative nel piano *yz* in presenza di un potenziale in U: in assenza del potenziale in RF tutti gli ioni positivi vanno a collidere con le barre e si neutralizzano. Nel semiciclo positivo di un potenziale in RF, invece, gli ioni positivi a valori m/z bassi compensano il potenziale in U, rimanendo confinati nel canale tra le barre (stabilizzazione della traiettoria per effetto di RF), mentre gli ioni positivi a valori m/z elevati vengono neutralizzati, come mostra la Figura 8. La coppia di barre negative agisce dunque da *filtro di massa passa-basso*.

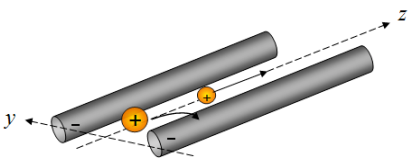


Fig. 8 - Filtro *passa-basso* nel piano *yz*.

Per attraversare il canale del quadrupolo e collidere con il detector (rivelatore) uno ione deve avere una traiettoria stabile in entrambi i piani *xz* e *yz*, ovvero deve avere un valore m/z sufficientemente elevato da non essere eliminato dal filtro *passa-alto* nel piano *x-z* e sufficientemente basso da non essere eliminato dal filtro *bassa-basso* nel piano *y-z*. L'effetto totale del campo quadrupolare è quello di farsi attraversare soltanto da ioni con un limitato intervallo di valori m/z. La scansione consiste nell'incremento lineare, da 0 ad un valore massimo, dei potenziali in RF (0-1500 V) e in U (0-250 V), mantenendo costante il rapporto RF/U ~ 6, in modo che i diversi valori dei potenziali RF e U possano separare tutti gli ioni prodotti in sorgente in base al loro rapporto m/z.
Gli spettrometri di massa a quadrupolo hanno un *mass range* comunemente compreso tra 1000-1200 Dalton, con una risoluzione (R) pari a 1000-1200. Significa che possono analizzare molecole fino a 1200 Dalton di peso molecolare, con differenze di massa fino a 1/1000 di Dalton (tre decimali).
La frequenza con cui vengono interfacciati con le principali tecniche cromatografiche (GC-MS e LC-MS) dipende essenzialmente da due fattori: 1) il *cycle time* della scansione (incremento dei valori di potenziale in RF e U da 0 al massimo e ritorno al valore 0 dei potenziali), deve essere compatibile con le minime differenze dei tempi di ritenzione degli analiti separati con le più avanzate tecniche GC e HPLC; 2) i filtri a quadrupolo hanno costi sensibilmente inferiori a quelli degli altri analizzatori di massa.

C) Frammentazione delle molecole
La frammentazione delle molecole in fase gassosa è il processo fondamentale della spettrometeria di massa. La frammentazione può avvenire nella sorgente (*in-source fragmentation*) o dopo la sorgente ionica (*post-source fragmentation*).

1. Frammentazione *in-source*
L'energia di ionizzazione trasferisce agli ioni prodotti un'energia interna che ne determina la frammentazione. Se gli ioni permangono nel loro stato di *non-equilibrio* per breve tempo prima della loro ulteriore frammentazione, il processo è definito frammentazione *metastabile*. Negli strumenti accoppiati con l'elettrospray la frammentazione *in-source* è favorita dall'aumento di potenziale dello *skimmer electrode*. La frammentazione *in-source* non è una MS/MS, a meno che gli ioni metastabili vengano sottoposti a scansione alla massa prima della loro frammentazione e successivamente vengano analizzati anche i loro frammenti.

2. Frammentazione *post-source*
Le specie ioniche nello stato vibrazionale eccitato ricevono energia *post-source* da:

a) collisioni con atomi neutri o con molecole;
b) cessione od acquisto di elettroni da uno ione a trasferimento di carica;
c) assorbimento di radiazioni.

a) Nella "dissociazione indotta dalla collisione" (*Collision Induced Dissociation* o CID) detta anche "dissociazione collisionale attivata" (*Collision Activated Dissociation* o CAD) è l'urto tra lo ione e una molecola neutra che determina la frammentazione, secondo la reazione generica:

$$AB^+ + M \rightarrow A + B^+ + M$$

b) La cessione od acquisto di elettroni possono realizzarsi in tre modalità:

- Nella "disossociazione a cattura di elettroni" (*Electron Capture Dissociation* o ECD), la cattura di un elettrone da parte di uno ione positivo multicarica produce una specie metastabile ad elevata energia che si frammenta facilmente, secondo la reazione generica:

$$[M + nH]^{n+} + e^- \rightarrow [[M + (n-1)H]^{(n-1)+}]^* \rightarrow \text{frammenti}$$

- Nella "dissociazione a trasferimento elettronico" (*Electron Transfer Dissociation* o ETD) lo ione positivo multicarica acquista un elettrone da un reagente anionico (A^-), con formazione di uno ione metastabile ad elevata energia che si frammenta facilmente, secondo la reazione generica:

$$[M + nH]^{n+} + A^- \rightarrow [[M + (n-1)H]^{(n-1)+}]^* + A \rightarrow \text{frammenti}$$

- Nella "dissociazione a trasferimento elettronico negativo" (*Negative Electron Transfer Dissociation* o NETD) lo ione negativo multicarica (deprotonato) cede un elettrone ad un reagente cationico (B^+), con formazione di uno ione metastabile ad elevata energia che si frammenta facilmente, secondo la reazione generica:

$$[M - nH]^{n-} + B^+ \rightarrow [[M - nH]^{(n-1)+}]^* + B \rightarrow \text{frammenti}$$

c) L'assorbimento di fotoni con successiva fotodissociazione dello ione può essere rappresentata dalla reazione generica:

$$AB^+ + h\upsilon \rightarrow A + B^+$$

Mentre i raggi laser ultravioletti determinano un eccessiva frammentazione delle biomolecole, i raggi laser infrarossi producono il riscaldamento degli ioni e soltanto una dose elevata di fotoni assorbiti è in grado di produrre la frammentazione dello ione. Per questo processo, detto "dissociazione infrarossa multifotonica" (*Infrared Multiphoton Dissociation* o IRMPD), si utilizza un laser a biossido di carbonio ed uno spettrometro di massa a trasformata di Fourier (*Fourier Transform Mass Spectrometry* o FTMS) con analizzatore a trappola ionica.

D) MS/MS tandem: triplo quadrupolo (QqQ)

Con i metodi MS/MS uno ione (*precursor ion*), selezionato nel primo spettrometro di massa (Q1), viene trasmesso in una cella di collisione (q2) nella quale, per urto con molecole neutre (CAD) si frammenta ed i suoi frammenti (*reaction ions*) vengono trasmessi e separati dal terzo spettrometro di massa (Q3), come sintetizzato nel diagramma di Figura 9.

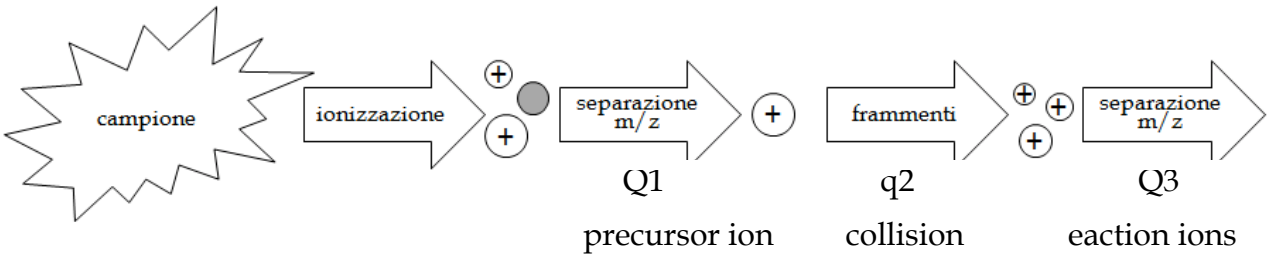


Fig. 9 - Diagramma di una MS/MS tandem (QqQ).

Con la MS/MS si possono ottenere tipi differenti di spettri di massa, in funzione della modalità di funzionamento dell'analizzatore Q1 e dell'analizzatore Q3:

PRODUCT ION SCAN
- potenziale costante in Q1 → seleziona il *precursor ion*
- scansione in Q3 → fornisce lo spettro dei *product ions*

2) PRECURSOR ION SCAN
- scansione in Q1 → fornisce lo spettro del *precursor ion*
- potenziale costante in Q3 → fornisce lo spettro di un dato *reaction ion*

3) NEUTRAL LOSS SCAN
- scansione in Q1
- scansione in Q3

→ fornisce lo spettro di perdite neutre (con differenza costante di m/z tra Q1 e Q2)

4) FULL SCAN
- scansione in Q1
- scansione in Q3

→ fornisce lo spettro dei *reaction ions* di tutti i *precursor ions* (tridimensionale)

- In *Singol Ion Monitoring* (SIM) *scan mode* Q1 seleziona il valore m/z di un *precursor ion* e Q3 fa la scansione di un solo *reaction ion*.

- In *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) *scan mode* Q1 seleziona il valore m/z di un *precursor ion* e Q3 fa la scansione dei *reaction ions* prodotti nella cella di collisione (q2).

Gli spettrometri di massa tandem possono essere accoppiati nello spazio (MS/MS *tandem-in-space*) o accoppiati nel tempo (MS/MS *tandem-in-time*).
Tra quelli accoppiati nello spazio, il più comune è lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo (QqQ), schematizzato nella Figura 10.
Gli ioni, provenienti da una sorgente a ionizzazione *soft* (ESI) entrano nella zona del vuoto dove un quadrupolo di sola focalizzazione Q0 (soltanto potenziale in RF) gli accelera nel Q1. La scansione RF/U del Q1 seleziona uno ione m/z (*precursor ion*) che passa velocemente nel q2 (cella di collisione) sulle cui barre è imposto soltanto un potenziale in RF. In questo modo q2 intrappola il *precursor ion* ed il gas (N_2) opera una *collision activated dissociation* (CAD) con formazione dei *reaction ions*. Il Q3 è il secondo filtro a quadrupolo che effettua la scansione dei potenziali RF/U dei *reaction ions*.

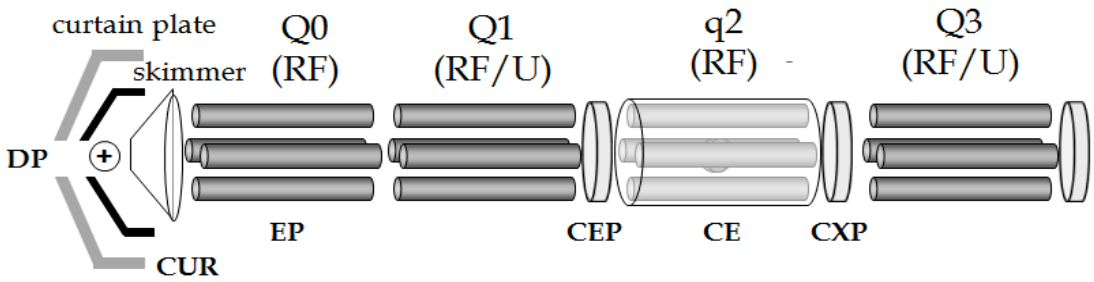


Fig. 10 - Spettrometro di massa QqQ.

E) Parametri MS/MS

Per rivelare e quantificare gli analiti con una buona sensibilità strumentale occorre ottimizzare i parametri spettrometrici, classificabili in *compound-dependent* e *source-dependent*.

a) Parametri *source-dependent*
   1. *Declustering Potential* (DP): voltaggio (in Volt) applicato al foro del piatto di ceramica attraverso il quale passano le goccioline di fase mobile;
   2. *Entrance Potential* (EP): potenziale (in Volt) dello *skimmer electrode* che accelera gli ioni, focalizzati dal quadrupolo Q0, verso l'analizzatore Q1;
   3. *Collision Energy* (CE): differenza di potenziale (in Volt) tra Q0 e q2 (cella di collisione) che accelera il *precursor ion* selezionato in Q1 nella cella di collisione q2;
   4. *Collision cell Exit Potential* (CXP): differenza di potenziale (in Volt) tra q2 e Q3 che accelera gli ioni, prodotti per CAD nel q2, nell'analizzatore Q3

b) Parametri *compound-dependent*
   1. *Curtain gas* (CUR): flusso di N_2 (in psig) che produce la desolventazione degli ioni e che li focalizza nel Q0;
   2. *Collision gas* (CAD): pressione (in psig) del gas di collisione nella cella q2;
   3. *IonSpray voltage* (IS): voltaggio (in Volt) applicato all'estremità del capillare ESI per produrre l'*electrospraying*;
   4. *Temperature* (TEM): temperatura (in °C) del sistema Turbo V Ionspray;
   5. *Nebulizer gas* (GS1): flusso di N_2 (in psig) all'estremità del capillare che produce la nebulizzazione della fase mobile;
   6. *Heated gas* (GS2): flusso d'aria (in psig) per l'evaporazione del solvente che incrementa la ionizzazione. Quanto maggiore è il flusso liquido o la percentuale di acqua della fase mobile tanto maggiore e più caldo deve essere il flusso di gas e la temperatura richiesti, rispettivamente. Una temperatura molto elevata può causare un'evaporazione prematura del solvente che si traduce in un incremento del disturbo (*noise*), così come un flusso troppo elevato di gas produce un incremento del *noise* o un segnale instabile.