

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



Dottorato di Ricerca in
Scienze Cliniche e Farmaco-Tossicologiche Veterinarie

Ciclo XXV

Tesi di Dottorato

*Aspetti metodologici innovativi nella determinazione quali-quantitativa
di contaminanti ambientali in prodotti della pesca*

Tutor
Prof.ssa Lorella Severino

Candidato
Dr. Francesco Paolo Serpe

Coordinatore
Prof. Paolo Ciaramella

Anno Accademico 2011-2012

INDICE

Abstract/Riassunto.....	pag. 5
Premessa.....	pag. 8
Capitolo I	
1.1 – Introduzione.....	pag. 10
1.2 - Composti bifenilipoliclorurati.....	pag. 13
1.3 – Arsenico.....	pag. 18
Capitolo II	
<i>Sviluppo, ottimizzazione, validazione ed accreditamento di un metodo per la ricerca di composti bifenilipoliclorurati non diossina-simili (NDL-PCB) in prodotti della pesca.....</i>	
	pag. 24
2.1 – Introduzione.....	pag. 24
2.2 - Materiali e metodi.....	pag. 25
2.3 – Risultati.....	pag. 29
2.4 – Discussione.....	pag. 32
Capitolo III	
<i>Sviluppo, ottimizzazione e validazione di un metodo innovativo per la ricerca di composti organici dell'arsenico in prodotti della pesca.....</i>	
	pag. 34
3.1 – Introduzione.....	pag. 34
3.2 – Materiali e metodi.....	pag. 35
3.3 – Risultati.....	pag. 40
3.4 – Discussione.....	pag. 47
Conclusioni.....	pag. 49
Bibliografia.....	pag. 51

ABBREVIAZIONI

AAS-ZETA	Spettrofotometria di Assorbimento Atomico con Effetto Zeeman
AMU	Unità di Massa Atomica
AsB	Arsenobetaina
AsC	Arsenocolina
CCα	Capacità di Quantificazione
CCβ	Capacità di Rivelazione
CE	Comunità Europea
CE	Energia di Collisione
CONTAM	Gruppo di Esperti sui Contaminanti della Catena Alimentare (EFSA)
CUR	Temperatura del gas “Cortina”
CZE	Elettroforesi Capillare
CXP	Potenziale di Uscita dalla Cella di Collisione
DG-SANCO	Direzione Generale della Comunità Europea per la Salute e i Consumatori
DL-PCB	Policlorobifenili Diossina-Simili
DMA	Acido Dimetilarsinico
DP	Potenziale di <i>declustering</i>
ECD	Rivelatore a Cattura di Elettroni
EFSA	Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare
EP	Potenziale di Ingresso
EURL-PT	Europea Union Reference Laboratories - Proficiency Testing
FAO	Organizzazione Europea per l’Alimentazione e l’Agricoltura
FAPAS^R	Food Analysis Performance Assessment Scheme
GF-AAS	Spettrofotometria di Assorbimento Atomico con Fornetto di Grafite
GS1/GS2	Temperatura dei Gas Ausiliari
HPLC	Cromatografia Liquida ad Alte Prestazioni
IARC	Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro
ICP-MS	Spettroscopia di Assorbimento Atomico con Sorgente al Plasma con Rivelatore di Massa
IS	Ion Spray
LC/ESI-QTRAP-	Cromatografia Liquida con Sorgente Electrosrpay e Rivelatore di Massa Tandem

MS/MS	
LOD	Limite di Rivelabilità
LOQ	Limite di Quantificazione
M^{+/-}	Ione Molecolare
MMA	Acido Monometilarsonico
MRL / LMR	Limite Massimo Residuale
MRM	Monitoraggio di Transizioni Multiple
ND	Non Rivelabile
NDL-PCB	Policlorobifenili non Diossina-Simili
PBDE	Polibromodifenileteri
PCB	Policlorobifenili
PCDD	Policlorodibenzodiossine
PCDF	Policlorodibenzofurani
PFP	Fase Pentafluorofenilica
PNAA	Piano Nazionale Alimentazione Animale
PNR	Piano Nazionale Residui
POP	Contaminanti Organici Persistenti
PTWI	Dose Settimanale Tollerabile Provvisoria
Q1/Q3	Transizione di Massa Tandem
R_t	Tempo di Ritenzione
RSD/CV	Coefficiente di Variazione o Deviazione Standard Relativa
SIN	Sito di Interesse Nazionale
S/N	Rapporto Segnale/Rumore
SPE	Estrazione in Fase Solida
TCDD	Tetraclorodibenzodiossina
TEF	Fattore di Tossicità Equivalente
TEM	Temperatura della Sorgente di Ionizzazione
THGA	Atomizzatore a Fornetto di Grafite Trasversale Riscaldato
UE	Unione Europea
ISO	Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione
WHO/OMS	Organizzazione Mondiale della Sanità

ABSTRACT

The legislation on environmental contaminants in food is constantly evolving. Some of these contaminants have already been the subject of official control of the food chain, others, such as polychlorinated biphenyls, are newly added, while others, such as organometallic compounds, are not yet covered. Present work is based on the development of innovative techniques aimed at the implementation of routine analytical methods for the control of substances recently and probable future inclusion in the Official monitoring plans, such as non dioxin-like polychlorinated biphenyls (NDL-PCB) and compounds of arsenic in highly contaminated products such as fishery products.

Regarding the NDL-PCB, this work aims to focus on validation study of an analytical screening method, aimed to detection of polychlorinated biphenyls (PCBs) in fish intended for human consumption, as required by Commission Decision 657/2002/EC. Regarding arsenic, the Committee of Experts of the FAO/WHO defined a tolerable intake only for inorganic arsenic, although it is known the toxicity of some organoarsenic compounds; here we present the validation study of a new method for a rapid and reliable speciation of these compounds in mussels.

This work has allowed us to achieve several goals. Firstly, it has been provided an example, so far not present in the scientific literature, of application of the European requirements for accreditation of the multiresidual screening method for NDL-PCBs determination, whose validity has been proved obtaining the recognition by the Italian accreditation body "Accredia". Moreover, guidance to the regulation has been also provided by the inclusion of substances characterized by overt toxicity and evident presence in foods of animal origin, which are not covered by national and European legislation, such as the various forms of arsenic; moreover, the analytical solutions to laboratories for Official control were provided.

RIASSUNTO

La normativa sui contaminanti ambientali nei prodotti alimentari è in continua evoluzione. Alcuni di questi contaminanti sono già da tempo oggetto del controllo ufficiale degli alimenti, altri, come i policlorobifenili, sono di recente inserimento nella normativa Europea, altri invece, come i composti organometallici, non sono ancora contemplati dalle norme. Il lavoro qui presentato si basa sullo sviluppo di tecniche innovative finalizzate alla realizzazione di metodi analitici di routine per il controllo delle sostanze di recente e prossima inclusione nei piani di controllo ufficiali, come ad esempio i sopracitati policlorobifenili non diossina-simili (NDL-PCB) e i composti dell'arsenico in prodotti a rischio di contaminazione, come i prodotti della pesca.

Per quanto riguarda i NDL-PCB, questo lavoro si focalizza sullo studio di validazione di un metodo analitico di screening per la determinazione di tali sostanze nel pesce destinato al consumo umano, secondo quanto prescritto dalla Decisione della Commissione 657/2002/CE. Per quanto riguarda invece l'arsenico, il Comitato di esperti della FAO/OMS ha definito una dose tollerabile solo per l'arsenico inorganico, anche se è nota la tossicità di alcuni composti organici dell'arsenico. Qui è presentato lo studio di validazione di un nuovo metodo di speciazione rapido e affidabile per la determinazione di diverse forme di arsenico organico nei mitili.

Questo lavoro ha permesso di raggiungere diversi obiettivi. In primo luogo, è stato fornito un esempio, finora non presente nella letteratura scientifica, di applicazione dei requisiti europei per l'accREDITAMENTO di un metodo di screening multiresiduale per la determinazione dei NDL-PCB, la cui validità è stata certificata dall'Ente italiano di accREDITAMENTO "Accredia". Sono state inoltre fornite indicazioni circa l'opportunità di includere alcune sostanze caratterizzate da tossicità conclamata ed evidente presenza negli alimenti di origine animale, che non sono ancora coperti dalla legislazione nazionale ed

europea, come le varie forme di arsenico. Sono state infine fornite ai laboratori di controllo delle soluzioni analitiche utili per la risoluzione delle problematiche connesse con la ricerca di tali contaminanti negli alimenti.

PREMESSA

La disponibilità di alimenti salubri e sicuri è stata ritenuta un diritto fondamentale nella Conferenza Internazionale sulla Nutrizione nel 1992 e nel Summit Mondiale sull'Alimentazione del 1996, in quanto requisito necessario per la promozione e la tutela della salute umana. Nel gennaio 2000 l'Unione Europea ha redatto il "Libro bianco per la sicurezza alimentare" nel quale vengono individuate 19 aree strategiche di intervento con lo scopo di proteggere la salute del consumatore (*from farm to fork*), prima tra queste è quella relativa ai *contaminanti alimentari*.

La normativa in materia di residui di contaminanti ambientali negli alimenti è in continua evoluzione. Alcuni di questi contaminanti sono già da tempo oggetto di Piani di controllo ufficiali della filiera alimentare, come le diossine e il mercurio, altri, come i composti bifenilipoliclorurati, sono di recente inserimento, altri invece, come l'arsenico ed il cromo, non sono ancora contemplati.

Il [Regolamento 882/2004/CE](#) prescrive che i laboratori dei Paesi Membri deputati al controllo ufficiale degli alimenti debbano essere certificati secondo quanto prescritto nella [norma UNI EN ISO/IEC 17025:2005](#) e quindi avere i propri metodi analitici accreditati. Questo requisito cogente si rispecchia in un continuo aggiornamento e sviluppo delle procedure analitiche.

Il presente lavoro di tesi è basato sullo sviluppo di tecniche innovative nella determinazione quali-quantitativa di contaminanti ambientali in prodotti della pesca finalizzate all'implementazione dei metodi analitici di routine per il controllo ufficiale di sostanze già comprese nel Piano Nazionale dei Residui come i **policlorobifenili non diossina-simili** (NDL-PCB) e sostanze di prossimo inserimento come l'**arsenico**.

In particolare, nel capitolo II è illustrato il lavoro sperimentale svolto per lo sviluppo, la validazione e l'accreditamento di un metodo di screening, finalizzato alla determinazione qualitativa e semi-quantitativa di policlorobifenili (PCB) in prodotti della pesca destinati al consumo umano secondo quanto prescritto dalle [Decisione 657/2002/CE](#) in attuazione della [Direttiva 93/99/CE](#); nel capitolo III è, invece, illustrato il lavoro sperimentale svolto per lo sviluppo, l'ottimizzazione e la validazione di un metodo innovativo per la ricerca dei composti organici dell'arsenico in prodotti ittici in considerazione del fatto che la tossicità dell'arsenico per l'uomo è fortemente condizionata dalla sua forma chimica. Il Comitato di esperti della FAO/OMS ha definito una dose settimanale tollerabile soltanto per l'arsenico inorganico a motivo della maggiore tossicità di tale forma. Allo stato attuale non sono stati fissati i limiti per i residui di arsenico negli alimenti essendo l'acqua potabile la maggiore fonte di esposizione per l'uomo. Tra gli alimenti di origine animale, però, sono quelli di origine marina a risultare più contaminati, in particolare molluschi e crostacei, nei quali il 90% del metalloide è presente in forma organica (arsenobetaina, arsenocolina). In vista di un sempre più probabile inserimento dell'arsenico anche nei piani di controllo degli alimenti destinati all'uomo appare pertanto utile poter disporre di metodi rapidi per la speciazione dell'arsenico.

Lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quindi quello di sviluppare metodi analitici rapidi e poco costosi per la ricerca dei sopracitati contaminanti chimici nei prodotti della pesca e di testare le nuove metodologie su prodotti provenienti da aree della Regione Campania comprese fra i Siti di Interesse Nazionale (SIN).

CAPITOLO I

1.1 Introduzione

Nei Paesi tecnologicamente sviluppati, una volta superato il problema della quantità degli alimenti prodotti, ha preso via via maggiore significato il problema della sanità e della qualità degli alimenti. Se in passato le contaminazioni microbiologiche degli alimenti hanno costituito il problema principale, i processi tecnologici realizzati dall'agricoltura, dalla zootecnia e dalle industrie alimentari ne hanno oggi in gran parte minimizzato i rischi. Nello stesso tempo, proprio il progresso tecnologico ha determinato il concretizzarsi di un nuovo problema sanitario, quello della contaminazione chimica degli alimenti che ha assunto proporzioni sempre maggiori.

In questo contesto, l'assenza totale di residui negli alimenti (c.d. residuo zero) richiesta fino a qualche anno addietro è apparsa quanto mai utopistica anche in considerazione del fatto che attualmente esistono strumentazioni analitiche in grado di rilevare quantità di residui di xenobiotici dell'ordine delle parti per trilione (pg/g); dunque, il livello residuale zero significherebbe escludere dal mercato la stragrande maggioranza delle derrate di origine animale. Per questi motivi, la CE, con il [Regolamento 466/2001/CE](#) e poi con il [Regolamento 1881/2006/CE](#) e successive modifiche ha fissato delle *quantità* di residui di alcuni contaminanti ambientali, tollerabili *negli alimenti* (LMR), tali da non rappresentare un rischio apprezzabile per il consumatore. Il controllo sul territorio avviene tramite l'applicazione del Piano Nazionale dei Residui pubblicato ogni anno dal Ministero della Salute. In esso vengono indicate le modalità di campionamento, le metodologie analitiche e i LMR per le diverse molecole, per le diverse specie e per i diversi alimenti.

Il Piano Nazionale Residui (PNR) nasce nel 1988 come Testo nazionale di riferimento per la ricerca di residui di farmaci ad uso veterinario negli

alimenti di origine animale, laddove il termine *residuo* indicava specificatamente un metabolita o catabolita di un farmaco che, metabolizzato dall'animale, residuava nell'alimento rappresentando un rischio per la salute pubblica. Oggi il PNR include tra le sostanze indesiderabili di categoria B (ovvero quelle di cui è consentita la presenza entro un dato limite) anche diversi contaminanti ambientali. A tale proposito, il PNR rappresenta il *trait d'union* tra normativa (Europea e Nazionale) e piani di monitoraggio sul territorio e si espleta mediante l'analisi di campioni prelevati lungo tutta la filiera di produzione degli alimenti di origine animale interessando i diversi settori produttivi. Sulla base dei risultati analitici, in caso di riscontro di residui di sostanze il cui impiego è vietato o quando le concentrazioni di residui di sostanze autorizzate o di contaminanti ambientali sia superiore ai limiti stabiliti, vengono attivati adeguati interventi a tutela della salute pubblica e, eventualmente, di tipo repressivo.

I contaminanti chimici ambientali, cui fa riferimento la normativa Europea e il PNR, che rappresentano un rischio per la salute dei consumatori di alimenti di origine animale, possono essere distinti in due categorie di sostanze: i microinquinanti organici ed i metalli pesanti. Ciascuno di questi due gruppi è caratterizzato da una grande eterogeneità sia che si considerino il tropismo e gli aspetti tossicologici sia che se ne considerino i percorsi ambientali e la persistenza.

Tra i settori zootecnici per i quali la problematica della contaminazione chimica è incentrata principalmente sui contaminanti ambientali è compreso quello delle produzioni ittiche.

In particolare, la problematica della contaminazione dei prodotti ittici assume una connotazione di particolare interesse in Italia dal momento che il pesce costituisce una componente fondamentale dell'alimentazione degli italiani rappresentando una fonte importante di proteine, acidi grassi polinsaturi e

micronutrienti; per cui l'uomo, attraverso il consumo di prodotti ittici, può essere esposto anche a diversi xenobiotici (Russo R. e Severino L., 2007).

Essendo i contaminanti ambientali di natura per lo più antropica, le aree costiere fortemente urbanizzate o industrializzate rappresentano zone ad elevato rischio per la salubrità dei prodotti ittici in esse allevati o pescati. La problematica tuttavia non è solo di interesse nazionale: anche all'interno della Comunità Europea negli ultimi dieci anni, benché la pesca abbia registrato un forte calo, il consumo di pesce ha mostrato un sensibile incremento.

La valutazione del rischio tossicologico per l'uomo quale consumatore di prodotti ittici, allevati o pescati, rientra nel più ampio discorso della sicurezza alimentare che è da tempo l'obiettivo dell'EFSA (European Food Safety Authority). Il gruppo di esperti dell'EFSA sui contaminanti nella catena alimentare (CONTAM), riesaminando un'ampia gamma di contaminanti, ha concluso che i contaminanti per i quali i grandi consumatori di pesce potrebbero superare la dose settimanale tollerabile provvisoria sono metilmercurio, diossine e PCB diossina-simili. Gli alimenti maggiormente a rischio sono quelli che derivano da organismi predatori (tonno, pesce spada) date le capacità di bioaccumulo e biomagnificazione dei contaminanti chimici (Russo R. e Severino L., 2007). Spesso però sono trascurati altri organismi, come i molluschi bivalvi, che per le loro caratteristiche contribuiscono fortemente all'apporto all'uomo di contaminanti chimici in particolare in determinate aree geografiche, come la costa campana. I molluschi bivalvi, infatti, sono molluschi filtratori che si nutrono trattenendo il particolato in sospensione presente nel loro intorno, laddove la parte edibile del prodotto è costituita dall'organismo intero, incluso l'organo di accumulo (epato-pancreas).

La scelta delle aree di provenienza dei campioni è ricaduta sui cosiddetti Siti di Interesse Nazionale (SIN), aree ad elevato rischio chimico oggetto di misure di controllo addizionali rispetto alle zone a basso rischio; tra queste aree

ritroviamo alcune zone campane ([Piano Regionale Integrato 2011-2014](#)). Un lungo tratto costiero della Campania, situato in corrispondenza dell'area urbana di Napoli, è incluso infatti fra i SIN ([Accordo di programma Napoli 15/11/07 del Ministero dell'Ambiente, della tutela del Territorio e del Mare](#)) e nonostante questo è destinato alla pesca ed alla molluschicoltura. La produzione di molluschi bivalvi in Campania è mirata quasi esclusivamente alla produzione di mitili (*Mytilus galloprovincialis*), mediante la tecnica dei filari *long line*.

1.2 – Composti bifenilipoliclorurati

I microinquinanti organici sono un numero difficilmente stimabile di sostanze tossiche ubiquitarie e persistenti nell'ambiente e negli alimenti. Tra queste, alcune sono già da tempo contemplati dalla normativa Europea. Negli ultimi anni infatti, la presenza dei contaminanti ambientali negli alimenti di origine animale e le emergenze sanitarie ad essa correlate hanno indotto il quadro normativo comunitario e nazionale ad evolversi.

Tra i microinquinanti organici di maggiore rilevanza ambientale e tossicologica ritroviamo i policlorobifenili (PCB). I PCB sono composti di sintesi provenienti dalla clorurazione del bifenile e caratterizzati dalla presenza di un numero di atomi di cloro variabile da 1 a 10. I PCB, sintetizzati intenzionalmente dall'uomo, comprendono 209 congeneri, distinti in 12 diossina-simili e 197 non-diossina simili, dei quali soltanto un centinaio ha trovato impiego nella formulazione di miscele industriali, solitamente denominate con nomi commerciali, quali arochlor, kanechlor ed altri. Tali miscele hanno trovato largo impiego in numerosi settori; sono state impiegate ad esempio come fluidi dielettrici per trasformatori industriali o per condensatori (sistemi chiusi), come plastificanti per la sintesi di resine e gomme, come additivi nella produzione di pesticidi, inchiostri, vernici e in lubrificanti (sistemi aperti). In Italia l'impiego di tali miscele ebbe inizio nel 1936 ed è proseguito

fino agli anni '80, epoca in cui la produzione di tali composti è stata vietata e l'utilizzo è stato limitato ai soli sistemi chiusi, in quanto l'uso indiscriminato dei sistemi aperti comportava un massivo rilascio nell'ambiente di tali sostanze provocando un rischio aggiuntivo di contaminazione che andava a sommarsi ad altre fonti di rilascio tra le quali annoveriamo l'incompleto incenerimento dei rifiuti e la cattiva combustione di prodotti contenenti cloro (Wania F. et al., 1996).

Il controllo dei livelli dei PCB non diossina-simili (NDL-PCB) negli alimenti ha assunto negli ultimi anni un'importanza crescente rispetto ai più noti PCB diossina-simili. Per quanto riguarda i livelli di NDL-PCB, sono di recente pubblicazione studi che ne documentano gli effetti carcinogenici ed in generale ne caratterizzano gli aspetti tossicologici (Strathmann J. et al., 2006; Tharappel J.C. et al., 2008; Machala M. et al., 2009), la cui conoscenza era rimasta un passo indietro rispetto al gruppo dei composti diossina simili. Tuttavia, oltre a DL-PCB e NDL-PCB, esiste una ulteriore categoria di PCB, quella dei PCB "indicatori", ovvero quei PCB caratterizzati da una maggiore presenza nell'ambiente. La ricerca dei PCB di maggiore interesse tossicologico (come i DL-PCB), infatti, parte molto spesso dalla ricerca dei PCB più diffusi nell'ambiente e quindi negli alimenti, i PCB "indicatori" appunto, i quali non necessariamente rientrano tra i PCB più dannosi per la salute.

1.2.1 Diffusione ambientale e cinetica

I PCB sono scarsamente biodegradabili, sono insolubili in acqua e si presentano oleosi, trasparenti e con viscosità variabile, sono poco volatili e sulle superfici acquose sono evidenziabili come pellicole estese; tali sostanze sono solubili nei grassi e nei solventi organici. Una volta immessi nell'ambiente formano interazioni più o meno stabili con sedimenti organici, cosa che li rende ancor meno suscettibili alla degradazione (Nancy J. et al., 2004). Il ciclo dei

PCB nell'ecosistema è simile a quello delle diossine e come queste sono soggetti a fenomeni di bioaccumulo e biomagnificazione lungo la catena alimentare. Una volta assunti, i PCB vengono assimilati a livello gastrico e previo assorbimento giungono al sangue, dove formano legami stabili con le proteine seriche per poi essere distribuiti a organi e tessuti bersaglio. A seguito di un'esposizione prolungata, i meccanismi di escrezione di tali sostanze sono insufficienti a smaltire le quantità introdotte con la dieta, per cui questi si accumulano; essendo sostanze lipofile, il tessuto bersaglio è innanzitutto quello adiposo (dal 30 al 70% della quota assorbita). Le concentrazioni di PCB in organi e tessuti bersaglio aumentano con il tempo in ragione dell'età dell'individuo e al crescere (in termini di frequenza) dell'assunzione di tali contaminanti. Le principali vie d'escrezione, previa biotrasformazione epatica, sono la via biliare, la via urinaria e il latte materno. L'esposizione prolungata a basse dosi di PCB presenti negli alimenti determina tossicità cronica che si manifesta con disturbi neurocomportamentali e psicomotori, sia negli animali da laboratorio che nell'uomo; i PCB sono inoltre responsabili di gravi danni al sistema endocrino (interferenti endocrini) e al sistema immunitario (IARC, 2001). Per quanto riguarda la cancerogenicità di tali composti, la Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) ha ritenuto opportuno classificare i PCB diossina-simili come *probabili cancerogeni nell'uomo e cancerogeni certi negli animali* (IARC, 2001).

1.2.2 Presenza negli alimenti e legislazione

Nel luglio del 2010 l'European Food Safety Authority (EFSA, <http://www.efsa.europa.eu/it/>) ha pubblicato sull'EFSA Journal i risultati di un importante lavoro di monitoraggio dei PCB non-diossina simili in alimenti e mangimi di 18 Paesi dell'Unione Europea, Norvegia ed Islanda nel periodo 1995-2008. Nel report sono contenuti i risultati delle determinazioni effettuate su

più di 12.000 campioni tra alimenti e mangimi. Il documento, nella parte introduttiva, fa riferimento ad una nota del CONTAM Panel (Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain of EFSA) secondo cui la somma delle concentrazioni dei sei NDL-PCB rappresenta circa il 50% del totale dei NDL-PCB negli alimenti. Il monitoraggio dell'EFSA si va a collocare in un periodo di transizione (1995-2008) perchè la normativa e le misure attuative da parte della Comunità Europea in quegli anni sono state in continuo divenire. È del 2002 infatti la Raccomandazione 201/CE in cui la Commissione Europea ha prescritto una serie di azioni da intraprendere per ridurre la presenza di diossine e PCB diossina-simili in alimenti e mangimi, prevedendo in seguito un piano di monitoraggio da parte degli Stati Membri comprendente, ove possibile, anche i PCB non diossina-simili.

I risultati del monitoraggio EFSA riportano gli esiti delle analisi effettuate su 11.214 alimenti e 1.349 mangimi raccolti fra il 1995 ed il 2008 in 18 Paesi Membri, l'Islanda e la Norvegia. Il 18.8% delle determinazioni dei singoli congeneri è risultato "non rivelabile". I NDL-PCB che maggiormente hanno contribuito invece alla determinazione della somma dei sei indicatori sono stati il 153 ed il 138 (che insieme costituiscono circa il 50% del totale), seguiti dal 180, 28, 101 e 52 con variazioni dipendenti dal tipo di alimento o di mangime.

Gli alimenti più contaminanti dai sei PCB indicatori sono risultati i prodotti della pesca, seguiti dagli altri alimenti di origine animale, in particolare latte e derivati. Analogamente, tra le matrici maggiormente contaminate da PCB ritroviamo l'olio di pesce. I dati riportati hanno permesso infine di stimare che la somma dei sei NDL-PCB è circa cinque volte più abbondante negli alimenti della somma dei dodici DL-PCB, con alcune eccezioni legate all'origine dell'alimento o del mangime e alla fonte di contaminazione.

La norma quadro in materia è il [Regolamento 1881/2006/CE](#), che presenta i livelli massimi consentiti di diversi contaminanti ambientali nei prodotti di origine animale; tuttavia, negli ultimi due anni sono stati emessi alcuni Regolamenti Comunitari in materia di sicurezza alimentare, a modifica ed integrazione del Regolamento 1881/2006/CE, che aggiornano i livelli massimi consentiti di taluni contaminanti e ne introducono di nuovi, a testimonianza del grande interesse verso tali sostanze. In particolare, nel [Regolamento 1259/2011/CE](#), sono stati aggiornati i limiti per policlorodibenzo-*p*-diossine (PCDD), policlorodibenzofurani (PCDF) e policlorobifenili diossina-simili (DL-PCB) negli alimenti, a seguito dell'aggiornamento dei rispettivi fattori di tossicità relativi alla TCDD (OMS-TEFs), e sono stati introdotti limiti per i 6 PCB di maggiore rilevanza ambientale, rispetto al Regolamento 1881/2006/CE, facendo luce su questa controversa categoria di sostanze. Basti pensare infatti che il PNR, nel 2000, definiva i PCB indicatori come un gruppo di sette PCB (28, 52, 101, 138, 153 e 180 ed un DL, il 118), mentre dal 2004 in poi ha preso a considerarne diciotto (28, 52, 95, 99, 101, 105, 110, 118, 138, 146, 149, 151, 153, 170, 177, 180, 183, 187 comprendendo due DL-PCB, il 105 ed il 118). Infine, negli ultimi tempi il *trend* è stato di un ritorno ai “sette indicatori”, o meglio a sei, in quanto dal gruppo di sette è stato escluso quell'unico DL-PCB, che facendo parte dei 12 DL, è già di per sé oggetto di indagine. Il sopraccitato Regolamento 1259/2011/CE fa infatti riferimento a tali sei NDL-PCB indicatori (28, 52, 101, 138, 153 e 180).

Nella sostanza, il Regolamento 1259/2011/CE non è altro che la formalizzazione della bozza di Regolamento DG SANCO “Possible harmonized levels of non dioxin-like PCBs (NDL-PCBs) in food of animal origin” emessa nel 2009, da cui è nata l'esigenza di sviluppare e validare il relativo metodo analitico nell'ambito del presente lavoro di tesi, per consentire al Laboratorio l'operatività al momento dell'imminente emissione di tale Regolamento.

1.3 Arsenico

L'arsenico è un metalloide che esiste in vari stati di ossidazione. È abbondante nella crosta terrestre e nel suolo (concentrazione media 1.8 mg/kg) ed è presente nelle acque ed in quasi tutti i tessuti vegetali ed animali. La sua concentrazione nell'acqua dolce in genere è inferiore a 5 µg/L, anche se in alcune zone del pianeta (ad esempio la Provincia di Cordoba in Argentina e diverse zone del Giappone) si possono raggiungere livelli molto elevati, rispettivamente di 3.4 e 1.7 mg/L; nell'aria la concentrazione varia da pochi ng/m³ a qualche decina di µg/m³, a seconda che si tratti di aree incontaminate o di zone industrializzate. Le acque marine contengono circa 0.3 µg/L di arsenico. Benché la diffusione di tale metalloide tenda a diminuire, una grande quantità di arsenico (stimabile intorno alle 40000 tonnellate/anno) in varie forme può riversarsi nell'ambiente, sia per effetto dell'erosione che per le attività antropiche, quali l'utilizzo in elettronica, nella produzione di pigmenti per smalti, nell'industria pesante e in seguito alla combustione del carbone. È stato del tutto abbandonato nei Paesi Occidentali l'impiego in agricoltura quale componente di fitofarmaci, mentre nelle specie da reddito l'uso degli arsenicali organici derivati dell'acido arsanilico e dell'acido-4-nitrofenilarsenico, vietato nella UE, è tuttora autorizzato negli Stati Uniti. In un passato non lontano, l'anidride arseniosa si trovava come componente di preparazioni galeniche "ricostituenti" destinate agli animali da carne, che, in caso di sovradosaggi, potevano determinare intossicazioni acute ad esito letale (Lucisano A. e Severino L., 2009).

1.3.1 Diffusione ambientale e cinetica

Nelle acque e nei suoli i composti dell'arsenico vanno incontro a fenomeni di ossido-riduzione, metilazione e demetilazione. Questi processi, che dipendono dalle specie microbiche presenti nel terreno e dal potenziale di ossido-

riduzione di quest'ultimo, fanno sì che si formino composti alchilici volatili che permettono la mobilitazione dal suolo ed il trasferimento nell'aria. L'assunzione da parte dei vegetali dipende dalla specie botanica presente e dalla concentrazione nel terreno. Nell'ambiente acquatico il processo di metilazione e demetilazione porta alla formazione di composti di diverso potenziale tossico. Nei monogastrici i composti inorganici trivalenti e pentavalenti vengono facilmente assorbiti dal tratto gastro-intestinale e trasportati ad organi e tessuti. Dopo 24 ore la concentrazione negli organi comincia a decrescere per l'eliminazione con l'urina, mentre nella cute e negli annessi cutanei si può avere accumulo. Nei ruminanti, la biodisponibilità sembra essere decisamente inferiore e, di conseguenza, la via di escrezione predominante è quella fecale. Quantità modeste e dell'ordine di grandezza dei $\mu\text{g}/\text{kg}$ vengono eliminate attraverso l'emuntorio mammario. È stata anche dimostrata l'escrezione attraverso le uova, nelle quali il metalloide si concentra soprattutto nell'albumine, ricco di gruppi sulfidrilici. L'arsenico pentavalente, dopo essere stato ridotto alla forma trivalente, viene successivamente metilato ad opera della s-adenosilmetionina trasferasi originando metil- e dimetil- derivati; sebbene fino a qualche anno fa le opinioni in merito fossero discordanti, attualmente si ritiene che tali metaboliti abbiano proprietà citotossiche e cancerogene superiori a quelle del metalloide. I composti organici, meno tossici rispetto ai composti inorganici sono meno assorbiti e vengono rapidamente eliminati con l'urina sostanzialmente immutati ([Lucisano A. e Severino L., 2009](#)).

La genesi di tali composti organoarsenici avviene a partire dall'arsina (AsH_3) da cui si formano RAsH_2 , RAsH e R_3As , per sostituzione dell'atomo di idrogeno. Per riduzione e metilazione successiva dell'acido arsenico (H_3AsO_4) si possono ottenere l'acido monometilarsonico $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$ (MMA) e l'acido dimetilarsonico $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$ (DMA). Molti sistemi biologici sono in grado di effettuare queste trasformazioni; le specie fitoplanctoniche possono trasformare $\text{As}(\text{V})$ in MMA o in DMA e liberare questi composti nell'acqua; questo spiega la loro presenza in soluzione, soprattutto nella zona eufotica. In realtà, quello

descritto è un meccanismo di detossificazione in quanto per il fitoplancton i composti organici hanno tossicità minore del As(V). Tra le varie forme chimiche presenti nelle acque vi è l'arsenocolina $((\text{CH}_3)_3\text{AsCH}_2\text{CH}_2\text{OH})^+$, ritrovata nei gamberetti e nelle dafnie. L'arsenobetaina $((\text{CH}_3)_3\text{AsCH}_2\text{CO}_2\text{H})$ è stata ritrovata dapprima nei crostacei e successivamente in molti animali marini, dove rappresenta il composto organoarsenicale più abbondante. Più recentemente nei molluschi bivalvi è stato isolato lo ione tetrametilarsonio, che è il principale composto arsenicale dei tessuti branchiali. Nell'alga bruna *Eklonia radiata* sono stati identificati degli arsenoribosidi. L'ossido di trimetilarsina, la trimetilarsina e alcuni arsenozuccheri sono stati identificati come componenti minori della frazione di arsenico totale in un numero limitato di organismi animali marini (Momplaisir G.M. et al., 1991).

Queste osservazioni hanno portato all'ipotesi che i processi biochimici che conducono a tali composti, implicano la presenza di arsenoetanolammina e arsenocolina come prodotti di transizione essenziali mentre le caratteristiche enzimatiche possono spiegare la predominanza degli arsenozuccheri nelle macroalghe e dell'arsenobetaina negli organismi marini di livello trofico superiore (Phillips D.J.H. et al., 1985; Campanini G. et al., 1998).

1.3.2 Meccanismo di azione e pericolosità

Si ritiene che l'azione tossica dei composti organici trivalenti, notevolmente più tossici di quelli pentavalenti, sia dovuta al legame con i gruppi sulfidrilici di alcuni enzimi e cofattori, in particolare dell'acido lipoico, con conseguente alterazione di numerosi processi metabolici d'importanza vitale. L'arsenico inibisce in particolare l'attività della succinico deidrogenasi e della citocromo ossidasi e disaccoppia la fosforilazione ossidativa. Entrambe le forme sarebbero implicate nella genesi di stress ossidativo, che si traduce in un aumento dell'apoptosi particolarmente significativo a livello dei neuroni cerebrali. L'avvelenamento acuto è caratterizzato da dilatazione dei capillari, incremento della loro permeabilità specialmente a livello intestinale, grave

ipotesione ed alterazioni epatiche e renali. Quello cronico si manifesta con calo dell'appetito, perdita di peso, disturbi gastrointestinali e cardiovascolari, congiuntiviti, ipercheratosi; sono inoltre descritti spiccati fenomeni neurotossici, soprattutto in seguito all'esposizione a taluni arsenicali organici. L'assunzione prolungata di arsenico con la dieta, segnatamente attraverso l'acqua inquinata, è stata associata ad un aumento dell'incidenza di neoplasie vescicali nelle popolazioni di Taiwan. L'arsenico inorganico è stato classificato dalla IARC (International Agency for Research on Cancer) tra le sostanze cancerogene certe per l'uomo (gruppo 1) (Lucisano A. e Severino L., 2009).

1.3.3 Presenza negli alimenti e legislazione

Le contaminazioni accidentali e l'inquinamento industriale possono incrementare i livelli di arsenico negli alimenti e nelle bevande. La fonte principale di esposizione non professionale è rappresentata dagli alimenti, soprattutto, come già più volte accennato, dall'acqua potabile. Nell'ambito dei prodotti di origine animale, l'apporto più significativo è fornito dal consumo di alimenti di origine marina, nei quali tuttavia, oltre il 90% del metalloide è contenuto in forma organica e relativamente poco tossica. Tra i prodotti ittici, l'accumulo maggiore si riscontra nei molluschi e nei crostacei, specialmente se provenienti da acque contaminate. Relativamente inferiore appare, di norma, il contributo di carni, visceri e latte, anche se in uno studio condotto nel 2004 nel nostro Paese sono stati evidenziati, in campioni di latte vaccino, tenori di arsenico totale intorno a 40 µg/kg (Licata et al., 2004).

L'Expert Committee della FAO/OMS ha definito una PTWI (Provisional Tolerable Weekly Intake) di 15 µg/kg p.c. considerando soltanto l'arsenico inorganico. In base ai dati disponibili, appare improbabile che gli alimenti di origine animale contribuiscano in modo significativo al raggiungimento di tale soglia. La ricerca sistematica di tale metalloide era

prevista in passato nel PNR (Piano Nazionale Residui) utilizzando il cuore quale matrice.

Al momento non sono stati fissati i limiti per i residui di arsenico negli alimenti; tuttavia, le concentrazioni relativamente alte riscontrate da alcuni anni soprattutto nei molluschi e nei crostacei hanno contribuito ad elevare la soglia di attenzione della UE e ad avviare piani di monitoraggio negli alimenti di origine animale. Il PNAA (Piano Nazionale Alimentazione Animale) include l'arsenico fra i contaminanti e le sostanze indesiderabili e prevede controlli sistematici sugli alimenti destinate alle galline ovaiole (Lucisano A. e Severino L., 2009).

I metalli pesanti che si ricercano di routine negli alimenti di origine animale sono mercurio, piombo, cadmio e cromo, oltre all'arsenico. È ben noto infatti che tali metalli sono presenti comunemente nei prodotti ittici, tuttavia esiste un limite massimo consentito nel Regolamento 1881/2006/CE solo per i primi tre.

In generale, la ragione della presenza di un limite massimo di legge per una sostanza è legata alla tossicità per l'uomo, ragione per cui, nello specifico, il contenuto totale di cromo e di arsenico non forniscono di per sé alcuna indicazione di rischio dell'alimento, in quanto sia per il cromo che per l'arsenico la tossicità dipende criticamente dalla forma in cui essi sono presenti nell'alimento. A questo punto però, ci si chiede il perché le forme altamente tossiche di questi metalli, ovvero il cromo(VI) e l'arsenico inorganico, cancerogeni certi per l'uomo, non siano incluse come tali nel Regolamento 1881/2006/CE.

L'inserimento di queste sostanze nella normativa Europea è sicuramente ostacolato dalla difficoltà dal parte dei Laboratori di controllo di effettuare la *speciazione* del metallo in questione, ovvero quel processo analitico che consente di isolare e quantificare le singole forme chimiche nelle quali una

sostanza è presente nel campione, nel caso specifico, arsenico inorganico e le numerose forme di arsenico organico.

Uno degli scopi del presente lavoro di tesi è stato appunto lo sviluppo di un metodo di prova affidabile per la speciazione dei composti organici dell'arsenico.

CAPITOLO II

SVILUPPO, OTTIMIZZAZIONE, VALIDAZIONE ED ACCREDITAMENTO DI UN METODO PER LA RICERCA DI PCB-NDL IN PRODOTTI DELLA PESCA.

2.1 Introduzione

I prodotti alimentari di origine animale, come il pesce, sono stati riconosciuti come una delle principali cause di esposizione umana ai PCB ([EC SCF, 2000](#); [EFSA, 2005](#); [EFSA, 2010](#)). Il rischio per la popolazione generale legato a questo gruppo di sostanze chimiche persistenti attraverso il consumo di prodotti della pesca, è in genere riferito ai composti diossina-simili, nonostante i composti non diossina-simili siano analiticamente predominanti nei tessuti animali ([Fattore et al., 2008](#); [Serpe et al., 2010](#)). I PCB sono associati a diversi effetti negativi sugli esseri umani, comunemente attribuiti ai DL-PCB, sebbene anche per i NDL-PCB esistano delle evidenze di tossicità ([Seegal, 1998](#); [Strathmann et al., 2006](#); [Al-Anati et al., 2008](#); [Machala et al., 2009](#)).

Uno degli scopi della tesi di Dottorato è stato quello di sviluppare e validare un metodo di screening per la determinazione quantitativa di NDL-PCB nei prodotti della pesca (come merluzzo, orata, pesce gatto, tonno, polpi, seppie, calamari e cozze), seguendo il testo di riferimento della Comunità Europea per la validazione dei metodi di analisi interni che è la [Decisione 657/2002/CE](#).

Secondo le prescrizioni della [Decisione 657/2002/CE](#) per i metodi di screening, è stata determinata la capacità di rivelazione ($CC\beta$) del metodo in sostituzione del classico limite di rivelazione (LOD). La $CC\beta$ è un parametro che verifica l'idoneità del metodo per quanto riguarda la frequenza dei falsi negativi dove l'errore β , che è la probabilità di un falso negativo, deve essere inferiore al 5%. Oltre alla $CC\beta$, sono state determinate la precisione, la

selettività/specificità e la applicabilità/robustezza/stabilità (come riportato in tabella n.9 della Decisione). Il presente metodo può essere facilmente convertito in un metodo di conferma attraverso lo studio di alcuni altri parametri aggiuntivi (CC α e accuratezza), secondo la procedura descritta di seguito.

2.2 - Materiali e metodi

Reagenti. Salvo diversa indicazione, tutti i reagenti sono stati acquistati da Carlo Erba (Milano, Italia). Sono stati utilizzati dietiletere, etere di petrolio e isoottano per analisi di pesticidi, Na₂SO₄ anidro e H₂SO₄ al 96%. Gli standards di PCB e di polibromodifenileteri (PBDE) sono stati acquistati dalla Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germania).

Raccolta dei campioni. I campioni di pesce (tutti prelevati sul mercato italiano) sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'analisi. I campioni di pesce (merluzzo, orata, pesce gatto, tonno, polpi, seppie e calamari) sono stati scongelati, eviscerati e le parti edibili omogeneizzate; i campioni di mitili sono stati scongelati, sgusciati e la parte edibile omogeneizzata.

Metodo di estrazione per i pesci e molluschi. Ogni campione (5.00 \pm 0.01 g) è stato omogeneizzato e successivamente estratto sotto agitazione per 12 h con 20 mL di dietiletere in 25 mL in vetro pyrex. L'estratto è stato filtrato su Na₂SO₄, portato a secco sotto flusso di azoto e ricostituito con 2 mL di etere di petrolio.

Idrolisi di estratti. Un supporto solido inerte, ovvero una terra di diatomee (Extrelut NT3, Merck, Darmstadt, Germania), è stato condizionato con 3 mL di H₂SO₄. L'estratto è stato caricato sul supporto solido acidificato e la mineralizzazione è stata fatta durare per un massimo di 20 minuti a temperatura

ambiente. I campioni sono stati eluiti con 20 mL di etere di petrolio, purificati attraverso una colonnina per l'estrazione in fase solida da 6 mL (SPE florisisil cartridge, ISOLUTE, Uppsala, Svezia), portati a secco in evaporatore rotante (Büchi, Assago, Milano) con bagno settato a 40°C e ricostituiti con 1.000 ± 0.002 mL di isoottano.

Determinazione strumentale. Il campione è stato filtrato su membrana di nylon da 0.45 micron (Millipore) e iniettato al gascromatografo (Perkin Elmer Autosystem XL, Waltham, Massachusetts) equipaggiato con rivelatore a cattura di elettroni (ECD) e colonna capillare da 30 m x 0.25 mm x 0.25 micron (silice fusa al 35%-fenil-65% dimetilpolisilossano, Zorbax, Phenomenex, Torrance, California). I parametri strumentali sono stati: volume di iniezione di 0.5 µL, iniettore a 250°C, detector a 380°C; il programma termico ha previsto: 100°C a 250°C ad una velocità di 15°C/minuto, 250°C per 300°C ad una velocità di 5°C/minuto, *hold* per 1 minuto. Le condizioni cromatografiche sono state testate anche per la possibile interferenza da polibromodifenil etero 47 (PBDE 47, soluzione stock a 10 ng/mL), congenere predominante in ambiente, al R_t del PCB 180. La finestra di identificazione degli analiti è stata fissata al $R_t \pm 0.5\%$ e la quantità di ciascun composto è stata determinata mediante standardizzazione esterna con una curva a tre punti (1.0, 10.0, 20.0 ng/g di miscela di PCB in isoottano).

Fortificazione dei campioni. La miscela (50 µL) dei sei congeneri di interesse (PCB 28, 52, 101, 138, 153 e 180) a concentrazione 0.100 mg/L è stata aggiunta a n = 8 campioni di cozze, a n = 6 campioni di pangasio e a n = 6 campioni di seppie, tutti PCB-free. La miscela è stata preparata mediante diluizione con isoottano della soluzione a 10 ng/mL di ogni congenere. Questi campioni sono stati sottoposti ad estrazione, purificazione e determinazione

strumentale in tre giorni diversi (tabella n.1), come richiesto dalla Decisione 657/2002/CE.

Procedura di validazione. Lo studio di validazione è stato condotto in conformità con la [Direttiva 99/93/CE](#) e quindi secondo i criteri stabiliti nella [Decisione 657/2002/EC](#). La $CC\beta$ è stata determinata per la parte edibile, laddove la $CC\beta$ è la concentrazione di analita inferiore alla quale l'errore β , ovvero la percentuale di falsi negativi, è inferiore al 5%. L'errore β è stato calcolato come descritto di seguito: 20 campioni di pesce PCB-free sono stati fortificati a 1.0 ng/g (peso umido) con i sei NDL-PCB di interesse ($\Sigma = 6.0$ ng/g), la presenza del picco (segnale maggiore del triplo del rumore di fondo, in termini di concentrazione) è stata verificata al R_t di ogni congenero. La frequenza dei falsi negativi è considerata superiore al 5% se uno o più replicati riporta un segnale minore del triplo del rumore ($1/20 = 5\%$) per ogni congenero. Viceversa, se tutti i 20 replicati riportano un segnale maggiore del triplo del rumore di fondo, si può affermare che la frequenza degli esiti falsi negativi è minore del 5%. La precisione è stata valutata sugli stessi 20 replicati, fortificati a 1.0 ng/g (peso umido) con la mix dei sei NDL-PCB indicatori ($\Sigma = 6.0$ ng/g) applicando i criteri di cui alla [Decisione 657/2002/CE](#) in cui è riportato che, per un valore inferiore a 100 ng/g, la RSD% (CV% o deviazione standard relativa) deve essere la più bassa possibile (Tabella n.3 della [Decisione 657/2002/CE](#)), non prevedendo, in altre parole, un requisito specifico. La selettività/specificità è stata determinata in via sperimentale con 20 replicati PCB-free non fortificati di ogni pesce studiato (tabella n.1), verificando l'assenza di segnali (maggiori del triplo del rumore) al R_t di ogni congenero.

L'applicabilità/robustezza/stabilità del metodo è stata determinata sui 20 PCB-free fortificati a 1.0 ng/g (peso umido) con la mix di NDL-PCB indicatori ($\Sigma = 6.0$ ng/g) attraverso l'approccio delle piccole variazioni ([punto 3.1.1.3 della](#)

[decisione 657/2002/EC](#)), in cui le variabili selezionate sono state l'uso di differenti lotti di produzione di acido solforico e di diversi lotti di produzione di colonne SPE florisil. Come ulteriore parametro, previsto dalla [Decisione 657/2002/EC](#) solo per i metodi di conferma, è stata verificata l'accuratezza con il materiale di riferimento certificato fornito dal National Institute of Standards and Technology (NIST 2977, Gaithersburg, MD, USA) attraverso la conformità del risultato ottenuto con quanto riportato dal NIST, laddove il raffronto tra il campione liofilizzato e i campioni umidi è stato possibile considerando un contenuto medio di acqua per le cozze dell'80% (w/w), ottenuto sperimentalmente per via ponderale dopo liofilizzazione. Infine, allo scopo di ottenere l'accreditamento da parte dell'ente "Accredia", il metodo è stato testato anche attraverso la partecipazione ad un circuito interlaboratorio EURL-PT (European Union Reference Laboratories - Proficiency Testing) nel 2011, consistente nella ricerca della somma dei sei NDLCB di interesse in salmone e olio di pesce.

2.3 - Risultati

Le procedure per la preparazione dei campioni per analisi multiresiduali in matrici complesse utilizzate tradizionalmente sono particolarmente laboriose, soprattutto per quanto riguarda l'idrolisi acida degli estratti lipidici. L'uso di supporti solidi come le terre di diatomee, permette, grazie alla dispersione del campione, un'idrolisi acida della durata di pochi minuti, sostituendo la più lenta procedura *overnight*, con il vantaggio di poter eseguire il processo in un solo giorno.

Come richiesto dalla [Decisione 657/2002/CE](#), sono state determinate la capacità di rilevazione (CC β), la selettività/specificità e l'applicabilità/robustezza/stabilità. I risultati dello studio di validazione hanno mostrato che tutti i replicati fortificati con la miscela di PCB sono risultati

positivi (tabella n.1), con una precisione in termini di recupero tra il 67% e il 125%. L'errore β è risultato inferiore al 5%, secondo la teoria di calcolo sopra descritta, e la $CC\beta$ è stata fissata a 1.0 ng/g (peso umido) per ogni composto. Questo metodo è risultato selettivo/specifico per ogni PCB indicatore perché non è stata osservata la presenza (segnale minore del triplo del rumore, in termini di concentrazione) di interferenze della matrice al tempo di ritenzione degli analiti di interesse (figura n.1). In particolare, per quanto riguarda la possibile interferenza da PBDE, è stata verificata l'assenza di co-eluzione del contaminante ambientale PBDE 47 con il PCB 180. Per quanto riguarda la precisione, la RSD% (CV % o deviazione standard relativa) è risultata compresa tra 9 e 18 (tabella n.1). Il metodo è risultato applicabile/robusto/stabile perché nessuna variabile ha influenzato significativamente i risultati tra i due gruppi di 10 campioni negli stessi 20 campioni fortificati utilizzati per calcolare la $CC\beta$. Per quanto riguarda l'esattezza, il parametro aggiuntivo a quelli richiesti per i metodi di screening, tutte le concentrazioni, ottenute come media di tre replicati, sono risultate comprese negli intervalli di conformità previsti dal materiale di riferimento certificato NIST 2977, in particolare, 5.17 ± 0.36 ng / g per il PCB 28, 8.02 ± 0.56 ng / g per il PCB 52, 10.6 ± 0.9 ng / g per il PCB 101, 7.94 ± 0.63 ng / g per il PCB 138, 14.1 ± 1.3 ng / g per il PCB 153 g e 2.74 ± 0.25 ng / g per il PCB 180. Infine, la partecipazione al circuito interlaboratorio EURL-PT, ha dato risultati soddisfacenti sia per il salmone (z-score = -1.8) che per olio di pesce (z-score = -1.1).

Il metodo per la determinazione dei sei NDL-PCB indicatori si è rivelato adatto per l'esecuzione di saggi di screening sui prodotti della pesca, in quanto è in grado di rilevare gli analiti studiati con un errore β inferiore al 5% a livelli maggiori o uguali a 1.0 ng/g (peso umido) per ogni composto, conformemente alla [Decisione 657/2002/CE](#). Il vantaggio principale del metodo descritto è proprio la conformità con la [Decisione 657/2002/EC](#), il testo di riferimento

europeo. Pertanto, le prestazioni di questo metodo sono state inequivocabilmente dimostrate e quest'ultimo può essere quindi impiegato per l'attività di controllo degli alimenti. Nel triennio 2010-2012, il metodo è stato testato nel controllo di routine di 18 campioni pervenuti al laboratorio (tabella n.2). Durante le sessioni analitiche, sono stati ulteriormente verificate la conformità alla [norma ISO/IEC 17025:2005](#) e la qualità dei risultati con l'inserimento di uno o più campioni fortificati per sessione analitica, i cui recuperi sono stati registrati in carte di controllo Shewart-like, fornendo sempre esito soddisfacente (dati non mostrati). Infine, il metodo è stato accreditato dall'Ente Italiano di Accreditamento "Accredia".

	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 138	PCB 153	PCB 180	Σ
Recupero medio	0.85	0.93	0.85	0.88	0.90	0.91	5.3
SD	0.14	0.14	0.15	0.14	0.15	0.12	0.5
CV % intra-die	17	15	18	15	17	13	9
Minimo	0.67	0.73	0.69	0.72	0.69	0.7	4.7
Massimo	1.2	1.21	1.17	1.23	1.25	1.19	6.4
ML Regolamento 1259/2011/CE	-	-	-	-	-	-	75 ng/g

Tabella 1 – Studio di validazione su prodotti ittici PCB-free fortificati a 1.0 ng/g.

N.	Anno	Regione	Città	Tipologia commerciale	Campione (parte edibile)	Σ PCB 28, 52, 101, 138, 153, 180 (ng/g)
1	2010	Campania	Napoli	Allevamento	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	3.2
2	2010	Campania	Napoli	Campione importato	<i>Mugil cephalus</i>	7.7
3	2010	Campania	Napoli	Pescheria	Pesce in scatola	5.2
4	2010	Lazio	Latina	Mercato ittico	Cefalopodi	2.0
5	2010	Campania	Salerno	Mercato ittico	<i>Fistularia commersonii</i>	0.6
6	2010	Campania	Napoli	Mercato ittico	Cefalopodi	1.8
7	2010	Lazio	Roma	Mercato ittico	Filetti misti	1.7
8	2011	Campania	Mugnano di Napoli	Mercato ittico	Pescato	n.d.
9	2011	Campania	Battipaglia	Mercato ittico	Pescato	0.1
10	2012	Calabria	Mangone	Mercato ittico	Pescato	0.1
11	2012	Calabria	Mangone	Mercato ittico	Pesce in scatola	3.9
12	2012	Calabria	Cosenza	Pescheria	Pescato	0.1
13	2012	Calabria	Mangone	Pescheria	Pesce semilavorato	0.4
14	2012	Calabria	Cosenza	Mercato ittico	Pescato	n.d.
15	2012	Calabria	Rogliano	Pescheria	Pesce in scatola	0.3
16	2012	Campania	Pastorano	Mercato ittico	<i>Oncorhynchus gorboscha</i>	2.0
17	2012	Calabria	Rende	Mercato ittico	Pesce semilavorato	0.4
18	2012	Campania	Gricignano di Aversa	Mercato ittico	Pesce surgelato	0.6

Tabella 2 – Campioni pervenuti al Laboratorio per la determinazione dei 6 NDL-PCB con il presente metodo.

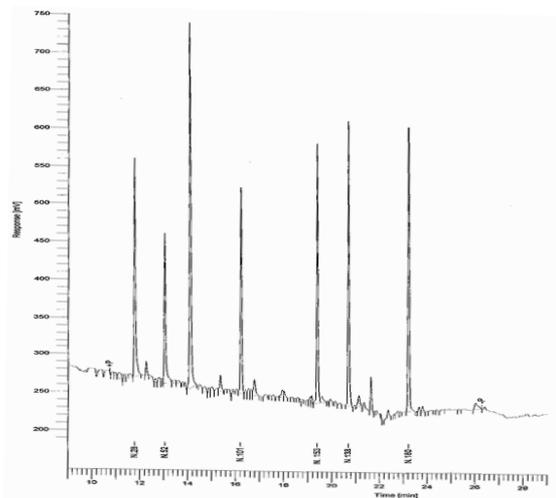


Figura 1 – Cromatogramma di un campione di mitili PCB-free fortificato a 1.0 ng/g con la mix dei sei NDL-PCB indicatori.

2.4 – *Discussione*

I PCB non diossina simili, come accennato, rientrano tra le sostanze indesiderabili nei prodotti alimentari ([Regolamento 1259/2011/CE](#)). Appare, pertanto, utile validare metodi per la ricerca di tali sostanze, laddove i metodi precedentemente pubblicati per la determinazione dei NDL-PCB negli alimenti non sono conformi alle norme europee vigenti. Inoltre, la procedura presentata, rispetto ad altri metodi simili riportati in letteratura, ha la caratteristica di essere rapida nell'esecuzione, con il vantaggio di una riduzione dei tempi di risposta e il beneficio di permettere un intervento immediato ed efficace da parte delle autorità sanitarie locali a tutela della salute dei consumatori.

A causa della natura di screening del metodo, le analisi dei campioni positivi al test devono essere ripetute mediante un metodo quantitativo (di conferma), al fine di confermare l'eventuale superamento dei limiti di legge riportati nel [Regolamento 1259/2011/CE](#) per alcuni tipi di prodotti alimentari, compresi quelli oggetto dello studio di validazione, restando valida la possibilità del metodo qui presentato di dichiarare conformi, in tempi rapidi, le derrate alimentari, talora deperibili, che risultano negative al controllo.

CAPITOLO III

SVILUPPO, OTTIMIZZAZIONE E VALIDAZIONE DI UN METODO INNOVATIVO PER LA RICERCA DEI COMPOSTI ARSENORGANICI IN PRODOTTI ITTICI.

3.1 Introduzione

Le biotrasformazioni metaboliche dell'arsenico nella fauna marina, dovute al processo di escrezione da parte di questi organismi, portano alla formazione di una vasta gamma di composti arsenorganici. Anche se il Comitato di esperti della FAO/OMS ha definito una dose settimanale tollerabile provvisoria di 0.015 mg/kg di peso corporeo per il solo arsenico inorganico (WHO, 2010), è stato dimostrato che almeno 32 forme di arsenico organico sono normalmente presenti in un alimento di grande consumo come il pesce (Mc Sheehy et al., 2003). Arsenobetaina (AsB) e acido dimetilarsinico (DMA) sono le specie di arsenico più abbondanti nei molluschi (Francesconi et al., 1999; Molin et al., 2012), insieme all'acido monometilarsinico (MMA) e altre specie come l'arsenocolina (AsC) (Argese et al., 2002; Molin et al., 2012). Queste forme sono tradizionalmente considerate meno tossiche delle forme inorganiche, anche se alcuni studi indicano che l'acido dimetilarsinico è potenzialmente cancerogeno per l'uomo (Yamamoto et al., 1995).

Qui è descritto un metodo nuovo, semplice e affidabile per la speciazione di arsenico organico in mitili mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa electrospray tandem triplo quadrupolo (LC/ESI-MS/MS); il metodo è stato validato e le performances del metodo sono state valutate in termini di recuperi medi degli analiti, precisione, specificità, limiti di quantificazione (LOQs) e limiti di rivelazione (LODs). I livelli di arsenico totale sono stati determinati mediante spettrofotometria di assorbimento

atomico con fornetto di grafite (GF-AAS). Il metodo è stato testato nella determinazione dei composti organici dell'arsenico in campioni di campo provenienti dal Sud Italia, un'area caratterizzata dall'elevata produzione e consumo di mitili.

3.2 – Materiali e metodi

Reagenti. L'acqua deionizzata è stata prodotta da un sistema di deionizzazione Milli-Q™ (Millipore, USA). L'acetonitrile di grado HPLC, l'acido nitrico 70% w/v e il perossido di idrogeno al 30% v/v per analisi di metalli in tracce sono stati acquistati da Carlo Erba (Milano, Italia); il nitrato di magnesio e il diidrogenofosfato di ammonio sono stati acquistati da Perkin Elmer (Milano, Italia) e sono stati usati come modificanti di matrice per spettrofotometria di assorbimento atomico con fornetto di grafite. La soluzione madre standard di arsenico a 995 ± 5 mg/L in acqua deionizzata è stata fornita da Merck (Milano, Italia). La diluizione dei campioni è stata eseguita utilizzando acqua Milli-Q. Tutta la vetreria di laboratorio è stata lavata prima dell'uso con 10% w/v di acido nitrico acquoso, risciacquata con acqua Milli-Q ed asciugata in essiccatore al riparo dalla polvere atmosferica. Le soluzioni standard di riferimento di arsenobetaina a 0.518 ± 0.015 mmol/g (92.2 mg/g), bromuro di arsenocolina a 0.374 ± 0.015 mmol/g (91.6 mg/g), acido monometilarsonico a 0.335 ± 0.015 mmol/g (46.2 mg/g), acido dimetilarsinico a 0.706 ± 0.024 mmol/g (97.4 mg/g) in acqua sono state acquistate dall'Istituto Nazionale di Metrologia (Pechino, Cina). Le soluzioni di lavoro sono state ottenuti pesando volumi noti di ogni soluzione contenenti 10 mg di MMA e 20 mg di AsB, AsC e DMA; dopo aver portato a secco sotto un leggero flusso di azoto, ciascuno standard è stato ricostituito con 200 μ L di acetonitrile ottenendo delle soluzioni alle concentrazioni finali di 50.0 mg/ml per MMA e 100.0 mg/ml per AsB, AsC

e DMA. La mix di lavoro contenente AsB, AsC, DMA e MMA a 2000 ng/mL è stata preparata di volta in volta mediante diluizione in acetonitrile.

LC/ESI-QTRAP-MS/MS. La determinazione dei composti organici dell'arsenico è stata effettuata mediante un sistema HPLC Agilent 1200 (Darmstadt, Germania) accoppiato ad uno spettrometro di massa 4000 QTrap, interfacciato al sistema cromatografico mediante una sorgente electrospray Turbo-ion (Applied Biosystems/MDS Sciex, Foster City, USA). La cromatografia è stata eseguita utilizzando una colonna Kinetex PFP dalle dimensioni 100 mm × 3.0 mm × 2.6 μm (Phenomenex, Torrence, USA) al flusso di 0.3 mL/min alla temperatura di 25°C. L'eluizione in gradiente è stata effettuata utilizzando acqua Milli-Q come fase mobile A e acetonitrile per HPLC come fase mobile B secondo il seguente programma: 90% A al tempo 0, 50% A a 8 minuti, 90% A a 13 minuti, *hold* per 2 minuti per riequilibrare la colonna. Sono stati fissati i seguenti parametri di sorgente ESI: risoluzione Q1/Q3: unitaria; temperatura del gas “cortina” (CUR): 40°C, temperatura della sorgente (TEM): 400°C; GS1/GS2: 20°C; arsenobetaina e arsenocolina sono state analizzate in modalità di ionizzazione positiva a 4500 V (IS), gli acidi monometilarsonico e dimetilarsinico sono stati analizzati in modalità di ionizzazione negativa a -4500 V (IS). La determinazione in spettrometria di massa tandem è stata effettuata in modalità “multiple reaction monitoring” (MRM), il potenziale di *declustering* (DP), il potenziale di ingresso (EP), il potenziale di uscita dalla cella di collisione (CXP), l'energia di collisione (CE) e i rapporti m/z per le singole transizioni sono stati ottimizzati per ogni composto mediante infusione (*flow injection*) nel sistema HPLC delle soluzioni standard a 50.0 ng/ml (tabella n.1). Per MMA è stato osservato un segnale stabile per l'addotto molecolare con Na⁺ (sodiato), pertanto, lo ione precursore [M²⁻ + Na⁺] è stato selezionato per la frammentazione MS/MS, gli ioni precursori selezionati

per gli altri composti sono stati $[M + H]^+$ per AsB e AsC, $[MH]^+$ per DMA (figura n.1). La frammentazione MS/MS di arsenobetaina e arsenocolina ha prodotto due ioni figlio stabili ciascuna, mentre un solo ione figlio stabile è stato rilevato per ciascun acido dell'arsenico. In tabella n.1 sono riportati i parametri di frammentazione precursore e ioni figlio diagnostici per ciascun composto. Gli ioni figlio scelti per l'analisi quantitativa sono stati: m/z 120.0 (AsB), m/z 121.3 (AsC), m/z 106.8 (DMA), m/z 90.8 (MMA). L'analisi quantitativa è stata effettuata mediante standardizzazione esterna, calcolata mediante regressione lineare di soluzioni standard in miscela in acetonitrile, ciascuna contenente tutti composti a concentrazioni crescenti, ovvero 50.0, 100.0, 200.0, 500.0, 1000 e 2000 ng/mL.

Spettrometria di assorbimento atomico (AAS-ZETA). Il contenuto di arsenico totale è stato determinato mediante ZETA-AAS con uno spettrofotometro ad assorbimento atomico modello Aanalyst 800, equipaggiato con atomizzatore a fornetto di grafite trasversale riscaldato (THGA) ed effetto Zeeman per la correzione del fondo (Perkin Elmer, Milano, Italia). I parametri strumentali sono stati i seguenti: pressione dell'argon a 3.5 bar, pressione dell'aria a 4.0 bar, risoluzione a 0.7 amu e tempo di scansione di 4 secondi. Per la determinazione quantitativa dell'arsenico totale, sono state costruite delle curve di taratura esterne con soluzioni standard a 5.0, 15.0, 30.0 e 60.0 ng/mL. La gestione dello spettrofotometro e l'acquisizione dei dati sono state eseguite con l'ausilio del software WINLAB 32 versione 6.2 (Perkin Elmer).

Preparazione del campione. Tutti i campioni di mitili sono stati raccolti negli impianti di mitilicoltura dislocati sulle coste della Campania. Le cozze, una volta pervenute al laboratorio, sono state scongelate, sgusciate ed omogeneizzate mediante omogeneizzatore a lame. Per ogni campione sono stati

prelevati 0.25 ± 0.01 g e 0.75 ± 0.01 g per essere analizzati mediante LC/ESI-QTRAP-MS/MS e AAS-ZETA, rispettivamente.

Analisi LC/ESI-MS-QTRAP/MS. Il campione è stato pesato in una provetta di vetro da 10.0 mL e liofilizzato; a questo sono stati aggiunti 2 mL di metanolo per HPLC, dopodichè il campione è stato sonicato per 15 minuti e centrifugato a 3000 g per 10 minuti. Una volta prelevato il supernatante, l'estrazione è stata ripetuta con 2 altri mL di metanolo; gli estratti riuniti, filtrati su filtro in nylon da 0.22 micron e portati a secco a 50°C in corrente di azoto. Il residuo è stato infine ripreso con 1.000 ± 0.002 mL di metanolo di grado HPLC, centrifugato a 9500 g per 2 minuti e poi analizzato mediante LC/ESI-QTRAP-MS/MS.

Analisi AAS-ZETA. Il campione è stato posto in un contenitore di teflon resistente ad alte pressioni e temperature cui sono stati aggiunti 5.0 mL di acido nitrico 70%, 2.5 mL di perossido di idrogeno al 30% e 2.5 mL di acqua MilliQ, per la mineralizzazione per via umida. Il recipiente è stato chiuso e trasferito in forno a microonde Ethos E (Milestone, FKV, Milano); la mineralizzazione in microonde è stata gestita da un programma che ha previsto una incubazione di 10 minuti a 190°C (temperatura costante). Al termine, dopo raffreddamento del contenitore fino al raggiungimento della temperatura ambiente, il campione è stato trasferito in un matraccio tarato di classe A da 50.00 ± 0.06 mL e portato a volume con acqua MilliQ.

Prestazioni del metodo. Per valutare l'accuratezza e la precisione del metodo LC/ESI-MS-QTRAP/MS, tre replicati di un campione mitili *As-free* sono stati fortificati a tre livelli di concentrazione ciascuno mediante aggiunta di AsB, AsC, DMA, MMA a 500.0 - 1000 - 2000 ng/g.

Per la determinazione dell'arsenico totale mediante ZETA-AAS, tre replicati di un campione mitili *As-free* sono stati fortificati a tre livelli di concentrazione ciascuno mediante aggiunta di 100.0 – 200.0 – 400.0 ng/g da una soluzione standard madre di arsenico inorganico a 1000 ng/mL.

L'accuratezza del metodo è stata calcolata in termini di recupero medio a diversi livelli di fortificazione; la precisione del metodo è stata valutata in termini di deviazione standard relativa (% RSD) *inter-die*. La linearità della risposta dello spettrometro di massa è stata valutata per AsB, AsC, DMA e MMA utilizzando la regressione lineare a partire da curve di taratura esterna costruite con la miscela di standard a 6 livelli, ovvero 50.0, 100.0, 200.0, 500.0, 1000 e 2000 ng/ml, analizzati in triplicato.

Per l'arsenico totale la linearità della risposta del rivelatore è stata valutata utilizzando la regressione lineare a partire da curve di taratura esterna costruite con la miscela di standard a 4 livelli, ovvero 5.0, 15.0, 30.0 e 60.0 ng/mL, analizzati in triplicato. I limiti di rilevazione (LOD) sono stati calcolati analizzando cinque repliche di un campione di mitili *As-free*, come le concentrazioni corrispondenti a 3/1:segnale/rumore in termini di concentrazione; i limiti di quantificazione (LOQ) sono stati calcolati, sullo stesso campione, come le concentrazioni corrispondenti a 5/1:segnale/rumore, in termini di concentrazione. Inoltre, le prestazioni del metodo per la determinazione del contenuto totale di arsenico sono state valutate attraverso la partecipazione ad un circuito interlaboratorio Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS).

3.3 – Risultati

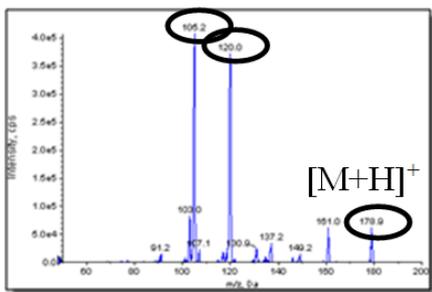
LC/ESI-QTRAP-MS/MS. Le condizioni sperimentali per la ionizzazione e la frammentazione ESI-MS/MS sono state ottimizzate per tutti i composti organici dell'arsenico studiati; in figura n.1 sono riportate tutte le

transizioni MS/MS utilizzate: AsB e AsC mostrano due ioni prodotto significativi in modalità di ionizzazione positiva mentre MMA e DMA mostrano solo uno ione prodotto in modalità di ionizzazione negativa. In figura n.2 sono riportati i cromatogrammi dei composti organici dell'arsenico di interesse, acquisiti in modalità MRM; la colonna HPLC utilizzata, ovvero la Kinetex PFP, ha consentito una separazione soddisfacente e un tempo rapido di analisi. Non sono state osservate interferenze di matrice significative in campioni di mitili *As-free*, a dimostrazione della specificità del metodo. La linearità della risposta del rivelatore di massa (figura n.3) è stata soddisfacente ($R^2 = 0.9656$ per AsB, $R^2 = 0.9869$ per AsC; $R^2 = 0.9770$ per MMA; $R^2 = 0.9714$ per DMA). L'accuratezza del metodo in termini di recupero medio e la ripetibilità calcolata come RSD% a tutti i livelli di fortificazione, sono risultate soddisfacenti (tabella n.2). La media dei recuperi oscilla dal 76% al 125% per AsB, AsC e MMA, mentre il DMA ha mostrato dei recuperi medi leggermente inferiori (45-64%). I valori di RSD% oscillano tra 2.5 e 27.5 e, come prevedibile, decrescono all'aumentare del livello di fortificazione (tabella n.2). I limiti di rivelazione (LOD), di quantificazione (LOQ) nonché l'interferenza di matrice, sono stati valutati mediante l'analisi di cinque replicati di un campione di mitili in cui i composti organoarsenici sono assenti. Le concentrazioni corrispondenti ai rapporti segnale/rumore $S/N = 3/1$ e $S/N = 5/1$ sono state calcolate per estrapolazione dalle curve di taratura esterne costruite per ciascun composto ai tempi di ritenzione di AsB, AsC, DMA, MMA (tabella n.2). Non sono state osservate interferenze di matrice.

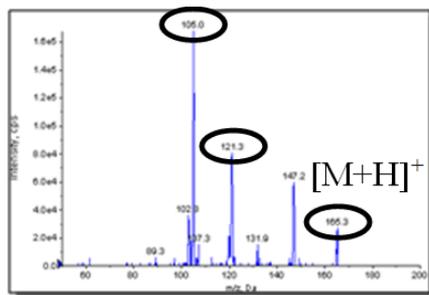
Analisi ZETA-AAS. Il LOD (60 ng/mL), il LOQ (100 ng/g) e le interferenze di matrice sono state valutate mediante l'analisi di cinque replicati di un campione di mitili *As-free*. Non sono state osservate interferenze di matrice. La risposta lineare del rivelatore è stata comprovata dal valore $R^2 \geq 0.9976$.

Nella tabella n.3 sono riportati i parametri per la stima dell'accuratezza e della ripetibilità del metodo su 3 livelli di fortificazione; i recuperi medi sono risultati nell'intervallo 95-104% e la $RSD\% \leq 16\%$, ad attestare l'affidabilità e la precisione del metodo. Il metodo è stato utilizzato per l'analisi di un campione nell'ambito di una prova interlaboratorio Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS); lo z-score è risultato -1.5, laddove l'intervallo di conformità è 0 – 2.

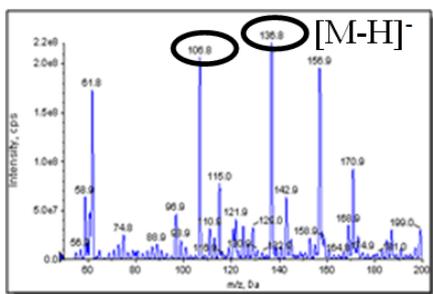
Monitoraggio sui mitili. I metodi sviluppati sono stati utilizzati per testare 13 campioni di mitili provenienti dalle coste della Campania (Italia). In tabella n.4, sono riportati, per ciascun campione, l'arsenico totale organico e inorganico, nonché le concentrazioni relative di ciascun composto arsenorganico. Il contenuto di arsenico totale è variato da 1.38 – 12.79 mg/kg; la gran parte, ed in molti casi la totalità, dell'arsenico (89.9-100%) è risultata presente in forma organica, soprattutto come AsB e DMA, rilevati in tutti i campioni oggetto del monitoraggio. I livelli di AsC e MMA sono risultati inferiori (0.20 – 1.53 mg/kg, ovvero il 5-13% dell'arsenico totale, rispettivamente) e sono stati rilevati solo in 4 dei 13 campioni studiati (30.8%).



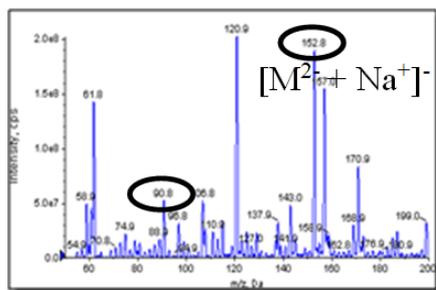
a)



b)



c)



d)

Figura 1 – Spettri MS/MS in LC/ESI di: a) arsenobetaina Q1/Q3 (ionizzazione positiva), b) arsenocolina Q1/Q3 (ionizzazione positiva), c) acido dimetil-arsinico Q1/Q3 (ionizzazione negativa) e d) acido monometil-arsinico Q1/Q3 (ionizzazione negativa).

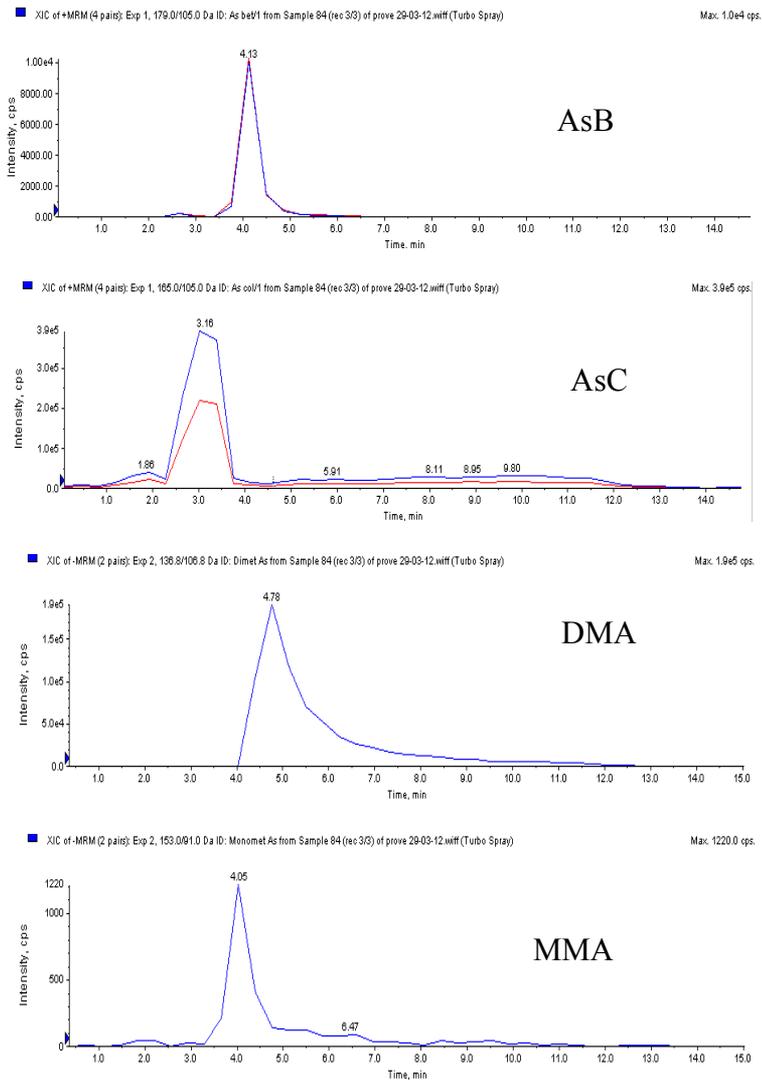


Figura 2 – Cromatogrammi LC/ESI-QTRAP-MS/MS di arsenobetaina, arsenocolina, acido dimetilarsinico e monometilarsonico di un campione di mitili fortificato a 1000 ng/g.

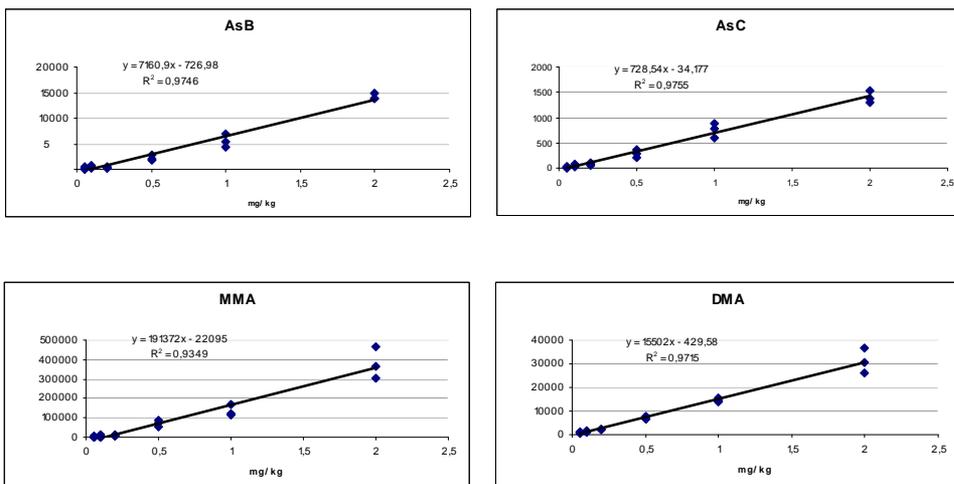


Figura 3 – Curve di taratura LC/ESI-QTRAP-MS/MS ottenute mediante iniezione di tre replicati per sei concentrazioni di standard, rispettivamente a 50.0 – 100.0 – 200.0 – 500.0 – 1000 – 2000 ng/mL.

	Ione precursore (amu)	Ione prodotto (amu)	DP (declustering potential, V)	CE (collision energy, V)	EP (entrance potential, V)	CXP (cell exit potential, V)
AsB	178.9	105.2	40.00	35.00	10	42
AsB	178.9	120.0	40.00	35.00	10	42
AsC	165.3	105.0	70.00	32.00	10	42
AsC	165.3	121.3	70.00	32.00	10	42
MMA	152.8	90.8	- 70.00	- 25.00	- 10	- 42
DMA	136.8	106.8	- 70.00	- 35.00	- 10	- 42

Tabella 1 – Parametri MS/MS.

	Fortificazione a 500 ng/g (n=3)		Fortificazione a 1000 ng/g (n=3)		Fortificazione a 2000 ng/g (n=3)		LOD (ng/mL)	LOQ (ng/g)
	Recupero, %	RSD %	Recupero, %	RSD %	Recupero, %	RSD %		
AsB	125	20.4	84	21.5	99	2.5	58	97
AsC	86	27.5	81	22.5	79	7.2	188	312
MMA	76	16.1	86	22.7	125	3.0	75	125
DMA	62	14.6	45	10.0	48	8.2	38	62

Tabella 2 – Prestazioni del metodo LC/ESI-QTRAP-MS/MS in termini di recuperi medi e deviazione standard relative a differenti livelli di fortificazione.

	Fortificazione a 100 ng/g (n=3)		Fortificazione a 200 ng/g (n=3)		Fortificazione a 400 ng/g (n=3)		LOD (ng/mL)	LOQ (ng/g)
	Recupero, %	RSD %	Recupero, %	RSD %	Recupero, %	RSD %		
As tot.	96	16	104	13	95	10	60	100

Tabella 3 – Prestazioni del metodo ZETA-AAS per la determinazione dell'arsenico totale in termini di recuperi medi e deviazione standard relative a differenti livelli di fortificazione.

Campione	As totale (mg/kg)	As organico (mg/kg)(%)	AsB mg/kg (%)	AsC mg/kg (%)	MMA mg/kg (%)	DMA mg/kg (%)
1	2.18	2.03 (93.1)	1.29 (59)	ND	ND	0.74 (34)
2	4.41	4.36 (98.9)	3.13 (71)	0.57 (13)	ND	0.66 (15)
3	3.95	3.91 (99.0)	3.28 (83)	ND	ND	0.63 (16)
4	1.51	1.46 (96.7)	0.98 (65)	ND	ND	0.48 (32)
5	5.89	5.77 (98.0)	5.30 (90)	ND	ND	0.47 (8)
6	12.79	12.79 (100)	10.36 (81)	ND	1.53 (12)	0.90 (7)
7	5.15	4.99 (96.9)	3.91 (76)	ND	ND	1.08 (21)
8	2.76	2.74 (99.3)	2.46 (89)	ND	ND	0.28 (10)
9	1.38	1.24 (89.9)	0.72 (52)	ND	ND	0.52 (38)
10	4.66	4.52 (97.0)	3.73 (80)	ND	ND	0.79 (17)
11	4.82	4.83 (100)	4.10 (85)	0.34 (7)	ND	0.39 (8)
12	3.91	3.84 (98.2)	3.09 (79)	ND	0.20 (5)	0.55 (14)
13	8.06	8.06 (100)	7.33 (91)	ND	ND	0.73 (9)
Belgium [Ruttens, 2012]	2.33 (media)	Non pubbl.	0.240 - 1.47	Non pubbl.	0.001 - 0.036	0.010 - 0.059
Chinese seafood [Li, 2003]	0.18 - 0.58	Non pubbl.	0.11 - 0.48	Non pubbl.	Non pubbl.	Non pubbl.
Venice lagoon [Argese, 2002]	11.9 - 39.3	Non pubbl.	4.5 - 14.6	0.14 - 0.50	Non pubbl.	0.25 - 1.6

Tabella 4 – Livelli di arsenico organico e totale, espresso come somma di AsB, AsC, MMA e DMA, per 13 campioni di cozze provenienti da allevamenti campani e confronto con i livelli di contaminazione di molluschi di altre aree geografiche riportati in studi similari.

3.4 – *Discussione*

I metodi per la speciazione dell'arsenico presenti in letteratura prevedono normalmente la tecnica separativa (HPLC) accoppiata a rivelatore con sorgente al plasma (ICP-MS) o, in alternativa l'elettroforesi capillare (CZE) e la cromatografia ionica. Tali approcci sono complessi, costosi e complicati dall'uso di tamponi acquosi e dalla separazione su più colonne (Francesconi et al., 1999; Li et al., 2003; McSheehy et al., 2003; Pizarro et al., 2003; Ruttens et al., 2012). L'uso di HPLC accoppiato ad uno spettrometro di massa versatile come il triplo quadrupolo, consente un'analisi più semplice oltre ad essere una tecnica di largo uso per molte applicazioni analitiche. In questo studio è stato quindi introdotto il sistema LC/ESI-QTRAP-MS/MS per effettuare la separazione e la determinazione quantitativa delle diverse forme di arsenico organico con una sola colonna cromatografica. Il metodo descritto, data l'estrema selettività del triplo quadrupolo, permette inoltre una rapida preparazione del campione. L'estrazione del campione di mitili con metanolo al 100% è stata introdotta per sostituire l'acqua e le miscele acqua/diclorometano, con lo scopo di migliorare la stabilità chimica dei composti organici dell'arsenico e ridurre la possibile conversione di AsB in DMA (Pizarro et al., 2003). Per la validazione del metodo, i livelli di fortificazione sono stati scelti sulla base dei dati disponibili in letteratura riguardanti le concentrazioni naturali di composti organici dell'arsenico (Argese et al., 2002; Li et al., 2003; Ruttens et al., 2012); si è considerata inoltre la PWTI di 0.015 mg/kg (WHO, 2010) fissata per la forma inorganica, relativa all'assunzione con la dieta da parte di un soggetto di 70 kg di 20 mitili da 500 mg ciascuno, a settimana. L'indagine effettuata sui mitili prodotti e commercializzati al Sud Italia, in Campania in particolare, consente un confronto con gli analoghi dati riportati in letteratura per *Mytilus galloprovincialis* e *Mytilus edulis* (tabella n.4). I livelli di contaminazione dei mitili campani sono paragonabili a quelli riscontrati nei

mitili provenienti dalla laguna di Venezia ([Argese et al., 2002](#)), anche considerando i singoli composti arsenorganici, laddove i livelli di contaminazione più bassi presenti in letteratura sono stati rilevati in mitili provenienti dal Belgio ([Ruttens et al., 2012](#)) e in frutti di mare commercializzati in Cina ([Li et al., 2003](#)).

CONCLUSIONI

Il [Regolamento 882/2004/CE](#) prescrive che i Laboratori dei Paesi Membri deputati al controllo ufficiale degli alimenti debbano essere certificati secondo quanto prescritto nella [norma UNI EN ISO/IEC 17025:2005](#) e quindi avere i propri metodi analitici accreditati. Questo requisito cogente si rispecchia in un continuo aggiornamento e sviluppo delle procedure analitiche.

Gli obiettivi raggiunti nel presente lavoro di tesi sono diversi. Per ciò che concerne gli analiti di recente inserimento nelle norme Europee, come i PCB non diossina-simili, è stato fornito un esempio di applicazione delle prescrizioni Europee ai fini dell'accreditamento di un metodo di screening multiresiduale. Tale metodo è risultato veloce nell'esecuzione ed affidabile, come comprovato dall'ottenimento del riconoscimento da parte dell'Ente di accreditamento italiano "Accredia". La velocità nell'esecuzione della prova ha il vantaggio di permettere risposte rapide consentendo di stabilire la conformità delle derrate alimentari, spesso deperibili, nel più breve tempo possibile e/o in caso contrario di passare al metodo di conferma per un eventuale immediato intervento delle Autorità Sanitarie Locali a tutela della salute dei consumatori.

Sono state inoltre fornite indicazioni in merito all'inserimento di sostanze dalla tossicità conclamata e dall'evidente presenza in alcuni alimenti di origine animale ma non ancora contemplate dalla normativa Nazionale ed Europea, come le diverse forme dell'arsenico. Più in particolare, sono state fornite ai Laboratori deputati al controllo degli alimenti le soluzioni analitiche per la risoluzione di problemi tecnico-pratici legati alla speciazione dell'arsenico, finora affrontati con l'utilizzo di strumentazioni complesse ed estremamente costose. Il metodo qui presentato per la determinazione dei composti organici dell'arsenico mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem elettrospray QTRAP 4000 (LC/ESI-QTRAP-

MS/MS) è, infatti, un metodo nuovo, rapido e affidabile e consente di effettuare la speciazione di composti arsenorganici in mitili.

L'obiettivo finale, auspicabile, è che le metodiche messe a punto e illustrate nel presente lavoro di tesi possano essere di utilità, a vari livelli, agli operatori e ricercatori impegnati nel Controllo Ufficiale degli alimenti di origine animale e nell'attuazione dei principi fondamentali della Medicina Preventiva.

BIBLIOGRAFIA

Al-Anati, L., Högberg, J., and Stenius, U. 2008. Non-dioxin-like PCBs interact with benzo[a]pyrene-induced p53-responses and inhibit apoptosis. *Chemosphere* 73:278–283.

Argese, E., Bettioli, C., Rigo, C., Bestini, S., Gobbo, L., Colomban, S.. Studio della distribuzione delle specie di arsenico in molluschi bivalvi della laguna di Venezia. XII Congresso Nazionale della Società Italiana di Ecologia - S.It.E.- Atti 26, Urbino 16-18 settembre 2002, *La Complessità in Ecologia*.

Buck W.B. (1978) Toxicity of inorganic and aliphatic organic arsenicals. In: Toxicity of Heavy Metals in the Environment. Ed. Oheme F.W., M. Dekker, New York, 357-369.

Cabras Paolo, Martelli Aldo (2004). *Chimica degli alimenti*, Piccin, Cap. 29, 1, p. 698.

Campanini, G., Delbono G., Ghidini S. L'arsenico negli alimenti. Università degli Studi di Parma. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria*, Vol. XVIII – 1998.

Commission Regulation (EC) N. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union*, L 364, 5-24.

Commission Regulation (EC) N. 1259/2011 of 2 December 2011 amending Regulation (EC) N. 1881/2006 as regards maximum levels for dioxins, dioxin-like PCBs and non dioxin-like PCBs in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union*, L 320, 18-23.

Commission Regulation (EC) N. 835/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) N. 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union*, L 215, 4-8.

Commission Regulation (EC) N. 882/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare.

Commission Decision (EC) N. 657/2002 of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Off. J. Eur. Union*, L 221: 8-36.

Council Directive 93/99/EEC of 29 October 1993 on the subject of additional measures concerning the official control of foodstuffs. *Off. J. Eur. Union*, L 290, 14-17.

EC SCF, 2000. Opinion of the scientific committee on food on the risk assessment of dioxins and dioxin-like PCBs in food. Scientific Committee on Food, Health and Consumer Protection Directorate-General, European Commission (Brussels). Retrieved January 10, 2011 from: http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out78_en.pdf

European Food Safety Authority (EFSA), 2005. Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain of EFSA (CONTAM Panel). EFSA Journal, 284:1-137.

European Food Safety Authority (EFSA) Report, 2010. Scientific Report of EFSA. Results of the monitoring of non dioxin-like PCBs in food and feed. EFSA Journal, 8(7), 1701:1-35.

Fattore, E., Fanelli, R., Dellatte, E., Turrini, A., and Di Domenico, A. 2008. Assessment of the dietary exposure to non-dioxin-like PCBs of the Italian general population. *Chemosphere*, 73:278–283.

Francesconi, K.A., Gailer, J., Edmonds, J.S., Goessler, W., Irgolic, K.J. 1999. Uptake of arsenicobetaines by the mussel *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 122:131-137.

F.W. (JECFA), WHO Food Addit. Ser.. 1983, 18:176.

International Agency for Research on cancer (IARC) monograph, 1973.

International Agency for Research on cancer (IARC) monograph, 2009.

ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. International Standard, second edition, 5-15.

Joint FAO/WHO, 1988, Allegato 1, riferimento 84.

Licata P., Trombetta D., Cristiani M., Giofrè F., Martino D., Calò M., Naccari F. 2004. Levels of “toxic” and “essential” metals in samples of bovine milk from various dairy farm in Calabria, Italy. *Environ. Int.* 30(1):1-6.

Li, W., Wei, C., Zhang, C., Van Hulle, M., Cornelis, R., Zhang, X. 2003. A survey of arsenic species in Chinese seafood. *Food Chem. Toxicol.* 41:1103-1110.

Lucisano A., Severino L. 2009. Da: “Residui di farmaci e contaminanti ambientali nelle produzioni animali”, EdISES – Capitolo 21 “Metalli pesanti”.

Machala, M., Simeckova, P., Al-Anati, L., Stenius, U., Pencikova, K., Prochazkova, J., Kremer, P., Slavik, J., and Vondracek, J. 2009. Effects of non dioxin-like PCBs (NDL-PCBs) on signalling pathways contributing to liver tumor promotion and carcinogenesis. *Toxicol. Lett.* 189:137.

McSheehy, S., Szpunar, J., Morabito, R., Quevauviller, P. 2003. The speciation of arsenic in biological tissues and the certification of reference materials for quality control. *Trends Anal. Chem.* 22(4):191-209.

Molin, M., Ydersbond, T.A., Ulven, S.M., Holck, M., Dahl, L., Sloth, J.J., Fliegel, D., Goessler, W., Alexander, J., Meltzer, H.M. 2012. Major and minor arsenic compounds accounting for the total urinary excretion of arsenic following intake of mussels (*Mytilus edulis*): A controlled human study. *Food Chem. Toxicol.* 50:2462-2472.

Momplaisir G.M., Blais J.S., Quinteiro M., Marshall W. (1991) Determination of Arsenobetaine, Arsenocholine, and Tetramethylarsonium Cations in Seafood and Human Urine by High-Performance Liquid Chromatography-Thermochemical Hydride Generation-Atomic Absorption Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 39, 1448-1451.

Pizarro, I., Gómez, M., Cámara, C., Palacios, M.A. 2003. Arsenic speciation in environmental and biological samples – Extraction and stability studies. *Anal. Chim. Acta* 495:85-98.

Phillips D.J.H., Depledge M.H. (1985) Metabolic pathway involving arsenic in marine organism: a unifying hypothesis. *Mar. Environ. Res.*, 17, 1-12.

Piano Regionale Integrato 2011-2014. Disponibile su: <http://www.orsacampania.it/wp-content/uploads/2011/08/PRI-2011-20141.pdf>

Reilly C. (1991) *Metal Contamination of Food*. 2nd ed., Elsevier, Essex, 152-175.

Russo R., Severino L, *Impatto di contaminanti ambientali nel pesce allevato e pescato*. 2007. Disponibile su: www.veterinario2.it/Contaminazione_pesce.pdf

Ruttens, A., Blanpain, A.C., De Temmerman, L., Waegeneers, N. 2012. Arsenic speciation in food in Belgium - Part 1: Fish, molluscs and crustaceans. *J. Geochem. Explor.* 121:55-61.

Seegal, R.F. 1998. Neurochemical effects of co-planar and non-coplanar polychlorinated biphenyls. *Neurotoxicol. Teratol.* 20:349–350.

Serpe, F.P., Esposito, M., Gallo, P., Salini, M., Maglio, P., Hauber, T., and Serpe, L. 2010. Determination of heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in *Mytilus galloprovincialis* from Campania coasts, Italy. *Fresenius Environ. Bull.* 19:2292-2296.

Stockholm Convention On Persistent Organic Pollutants (POPs). Stockholm, 22 May 2001.

Strathmann, J., Schwarz, M., Tharappel, J.C., Glauert, H.P., Spear, B.T., Robertson, L.W., Appel, K.E., and Buchmann, A. 2006. PCB 153, a non-dioxin-like tumor

promoter, selects for beta-catenin (Catnb)-mutated mouse liver tumors. *Toxicol. Sci.* 93:34–40.

Tharappel, J.C., Lee, E.Y., Robertson, L.W., Spear, B.T., Glauert, H.P., 2002. Regulation of cell proliferation, apoptosis, and transcription factor activities during the promotion of liver carcinogenesis by polychlorinated biphenyls. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 179, 172–184.

Yamamoto, S., Konishi, Y., Matsuda, T., Murai, T., Shibata, M.A., Matsui, Y.I., Otani, S., Kuroda, K., Endo, G., Fukushima, S.. Cancer induction by an organic arsenic compound, dimethylarsinic acid (cacodylic acid), in F344/DuCrj rats after pretreatment with five carcinogens. *Cancer Res.* 1995, 55, 1271-76.

WHO technical report series, 959 (2010). Evaluation of certain contaminants in food, p.21.