

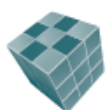


RAPPORTI ISTISAN 17|43

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Metodi analitici per il controllo degli alimenti irradiati

A cura di
E. Bortolin e C. Boniglia



TECNOLOGIE
E SALUTE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Metodi analitici per il controllo
degli alimenti irradiati**

A cura di
Emanuela Bortolin (a) e Concetta Boniglia (b)

*(a) Servizio Grandi Strumentazioni e Core Facilities
(b) Dipartimento Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria*

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

**Rapporti ISTISAN
17/43**

Istituto Superiore di Sanità

Metodi analitici per il controllo degli alimenti irradiati.

A cura di Emanuela Bortolin e Concetta Boniglia

2017, ii, 77 p. Rapporti ISTISAN 17/43

Il rapporto è dedicato alla descrizione dei metodi analitici indicati nel Piano Nazionale di controllo ufficiale sugli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti ed è destinato principalmente ai laboratori deputati al controllo ufficiale. Si articola in quattro capitoli e comprende un'introduzione sullo stato dell'arte dei controlli e una breve descrizione del Piano. Lo sviluppo di ciascun capitolo relativo ai metodi di analisi prevede una prima parte dedicata alla descrizione della tecnica e una seconda parte che riporta le modalità di applicazione dei metodi alle matrici selezionate nel Piano, con particolare attenzione agli aspetti relativi all'analisi dei dati e alla classificazione dei campioni.

Parole chiave: Alimenti irradiati; Metodi di identificazione degli alimenti irradiati; Piano nazionale di controllo degli alimenti irradiati

Istituto Superiore di Sanità

Analytical methods for the control of irradiated food.

Edited by Emanuela Bortolin and Concetta Boniglia

2017, ii, 77 p. Rapporti ISTISAN 17/43 (in Italian)

This report discusses the analytical methods indicated in the National Control Plan on irradiated foods and is mainly intended for the laboratories involved in the official control. It features four chapters, an introduction on the state of the art of controls and a brief description of the Plan. Each chapter devoted to the analytical methods includes a first section describing the technique, and a second section explaining how to apply the method to the matrices contemplated in the Plan, with particular attention to data analysis and sample classification.

Key words: Irradiated food; Methods for the identification of irradiated food; National Control Plan on irradiated foods

Il rapporto è stato redatto nell'ambito del progetto "Sviluppo delle attività del controllo degli alimenti trattati con radiazioni ionizzanti", svolto dall'Istituto Superiore di Sanità in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata e realizzato grazie al finanziamento assicurato dal Ministero della Salute - Direzione generale per l'igiene e la sicurezza degli alimenti e la nutrizione a sostegno del Piano Nazionale di controllo ufficiale sugli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti.

Per informazioni su questo documento scrivere a: emanuela.bortolin@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Bortolin E, Boniglia C (Ed.). *Metodi analitici per il controllo degli alimenti irradiati*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2017. (Rapporti ISTISAN 17/43).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Paola De Castro e Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



INDICE

Introduzione

<i>Emanuela Bortolin, Concetta Boniglia</i>	1
---	---

Controllo degli alimenti irradiati: aspetti normativi e tecnici

<i>Concetta Boniglia</i>	3
Introduzione all'irraggiamento.....	3
Quadro giuridico.....	6
Metodi di identificazione.....	7
Applicazioni della normativa: controlli ufficiali.....	9
Bibliografia.....	12

Piano nazionale per il controllo degli alimenti trattati con radiazioni ionizzanti

<i>Monica Capasso, Gerardo Califano, Virgilio Stillittano</i>	13
---	----

Metodi basati sulla risonanza di spin elettronico

<i>Emanuela Bortolin, Maria Cristina Quattrini, Sara Della Monaca</i>	21
Risonanza di spin elettronico.....	21
Apparato strumentale e misura.....	25
Metodo UNI EN 1786.....	28
Applicazione alle matrici del Piano.....	29
Matrici animali.....	29
Metodo UNI EN 1787.....	30
Applicazione alle matrici del Piano.....	31
Matrici non animali.....	31
Metodo UNI EN 13708.....	37
Applicazione alle matrici del Piano.....	37
Matrici non animali.....	37
Bibliografia di riferimento.....	38

Metodi basati sulla luminescenza stimolata

<i>Emanuela Bortolin, Raffaella Gargiulo, Maria Cristina Quattrini, Concetta Boniglia</i>	41
Luminescenza stimolata.....	41
Apparato strumentale e misura.....	42
Metodo UNI EN 13751.....	44
Applicazione alle matrici del Piano.....	45
Matrici animali.....	46
Matrici non animali.....	46
Metodo UNI EN 1788.....	47
Applicazione alle matrici del Piano.....	50
Matrici animali.....	50
Matrici non animali.....	51
Bibliografia di riferimento.....	52

Metodo basato sul saggio DNA Comet

<i>Michele Mangiacotti, A. Eugenio Chiaravalle, Giuliana Marchesani, Daniela Chirizzi</i>	54
Saggio DNA Comet	54
Metodo UNI EN 13784	56
Applicazione alle matrici del Piano	59
Matrici animali	59
Matrici non animali	61
Bibliografia di riferimento	66

Metodo basato su gascromatografia e spettrometria di massa

<i>A. Eugenio Chiaravalle, Michele Mangiacotti, Maria Campaniello,</i> <i>Giuliana Marchesani</i>	68
Gascromatografia e spettrometria di massa	69
Gascromatografia	69
Spettrometria di massa	70
Modalità di acquisizione dei dati	71
Metodo UNI EN 1785	71
Applicazione alle matrici del Piano	75
Matrici animali	75
Bibliografia di riferimento	76

INTRODUZIONE

Emanuela Bortolin (a), Concetta Boniglia (b)

(a) Servizio Grandi Strumentazioni e Core Facilities, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Dipartimento Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Il trattamento degli alimenti con radiazioni ionizzanti è una tecnologia di conservazione che ha lo scopo di preservare la qualità igienica degli alimenti e di prolungarne la durata di conservazione (*shelf life*). L'uso delle radiazioni ionizzanti è da tempo contemplato dalle maggiori organizzazioni internazionali e tale tecnologia è attualmente applicata su una vasta gamma di prodotti alimentari, specialmente in alcuni paesi, come ad esempio gli Stati Uniti d'America, e in alcune regioni dell'Asia. L'intera materia è regolamentata a livello europeo da due Direttive (1999/2/CE e 1999/3/CE), recepite in Italia con il DL.vo n. 94 del 30 gennaio 2001. In virtù di tali dispositivi normativi in Europa, per garantire il rispetto delle norme di etichettatura, ciascuno Stato Membro è tenuto a pianificare ed effettuare i controlli analitici in fase di commercializzazione, comunicando annualmente i relativi risultati alla Commissione Europea.

In Italia i primi controlli sono stati effettuati nel 2005 dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e dalla Regione Lombardia su erbe, spezie e ingredienti per integratori a base di piante. La causa principale di questo ritardo è rappresentata dalle difficoltà che i laboratori del controllo ufficiale hanno incontrato nella messa a punto dei metodi di identificazione, con particolare riferimento ai metodi di conferma che richiedono apparecchiature costose e personale competente. Nel corso degli anni l'ISS ha messo a disposizione le proprie competenze nel settore e, in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata (IZSPB), ha operato per creare una rete di laboratori in grado di effettuare controlli sulla maggior parte delle matrici alimentari. Ciò è stato realizzato attraverso corsi formativi teorico-pratici, pubblicazione di rapporti tecnici, consulenze tecnico-scientifiche e progetti di ricerca, finanziati dal Ministero della Salute, che hanno visto coinvolti Istituti Zooprofilattici Sperimentali e altri enti di ricerca. Tuttavia, in assenza di una pianificazione, il controllo sugli alimenti trattati con radiazioni ionizzanti non è stato pienamente attuato sull'intero territorio nazionale, pur essendo costantemente cresciuta negli anni la partecipazione regionale/provinciale. Pertanto, al fine di ottimizzare l'attività di controllo ufficiale sugli alimenti irradiati e per consentire la rendicontazione alla Commissione europea dei risultati conseguiti con tutte le informazioni obbligatorie richieste, il Ministero della Salute ha predisposto un "Piano nazionale di controllo ufficiale sugli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti" (di seguito "Piano"), da attuare a partire dal 2015 e per gli anni a venire. A supporto del Piano è stato finanziato, dal Ministero della Salute - Direzione generale per l'igiene e la sicurezza degli alimenti e la nutrizione, il progetto "Sviluppo delle attività del controllo degli alimenti trattati con radiazioni ionizzanti". Tale progetto è stato proposto dall'ISS e dall'IZSPB con l'obiettivo generale di promuovere e migliorare l'attività dei controlli ufficiali sull'intero territorio nazionale mantenendo attiva e potenziando la rete di scambio di informazioni già esistente e favorendo il coinvolgimento di nuove strutture nel controllo degli alimenti irradiati. Tra gli strumenti più idonei individuati per il raggiungimento degli obiettivi è prevista l'elaborazione di un rapporto tecnico per armonizzare a livello nazionale le procedure di campionamento e analisi. Infatti, nonostante a livello europeo (*Comité Européen de Normalisation*, CEN) siano stati sviluppati e standardizzati diversi metodi di analisi, così come riportato anche nei rapporti annuali stilati dalla Commissione europea, si evidenzia ancora un quadro di applicazione dei metodi di identificazione non uniforme, sia rispetto alla scelta del

metodo (screening o conferma) che al campo di applicazione (matrici non ancora validate). È, quindi, forte la necessità di indicare, per ciascuno dei metodi riportati nel Piano, le modalità di applicazione e i criteri di valutazione dei risultati per garantire l'efficacia e la qualità delle analisi di routine.

Il rapporto si articola in quattro capitoli e comprende anche un'introduzione sullo stato dell'arte dei controlli sugli alimenti trattati con radiazioni ionizzanti e una breve descrizione del Piano. Lo sviluppo di ciascun capitolo relativo ai metodi di analisi prevede una prima parte dedicata alla descrizione della tecnica e una seconda parte relativa all'applicazione dei metodi alle matrici selezionate nel Piano, con particolare attenzione agli aspetti relativi alla valutazione dei risultati.

CONTROLLO DEGLI ALIMENTI IRRADIATI: ASPETTI NORMATIVI E TECNICI

Concetta Boniglia

Dipartimento Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione all'irraggiamento

Al giorno d'oggi il mercato alimentare mondiale si trova ancora a dover affrontare due importanti problemi: il deterioramento, con conseguente perdita di enormi quantità di cibo, stimata tra 1/4 e 1/3 della produzione totale, e il continuo aumento di malattie legate alla presenza negli alimenti di microorganismi patogeni. Nel corso della storia sono stati sperimentati e applicati differenti sistemi per prevenire il deterioramento degli alimenti e per garantire loro un più alto grado di sicurezza. Accanto ai metodi di conservazione più tradizionali, quali la pastorizzazione, l'inscatolamento, la refrigerazione, e l'impiego di additivi chimici, l'utilizzo delle radiazioni ionizzanti si è dimostrato un metodo efficace e sicuro. Il processo consiste nel sottoporre l'alimento a dosi ben definite di radiazioni ionizzanti che hanno la capacità di uccidere le cellule microbiche, inibendone la divisione e quindi la moltiplicazione, e di inibire, anche se non totalmente, l'attività degli enzimi che sono causa del deterioramento degli alimenti. Come conseguenza, il trattamento radiante previene la germogliazione, riduce il numero di microorganismi vitali (patogeni e saprofiti), previene il dischiudersi delle uova di insetti e lo sviluppo delle larve e sopprime gli insetti presenti nel prodotto. Le dosi di radiazioni utilizzate nel trattamento dei prodotti alimentari variano da qualche decina di gray a poche decine di kilogray, in dipendenza dal tipo di alimento e dalla finalità che si vuole ottenere.

Nella Tabella 1 vengono riportati i tre campi di dose più comunemente impiegati: dosi basse (minori di 1 kGy), dosi medie (comprese tra 1 e 10 kGy), e dosi alte (superiori a 10 kGy). Dosi superiori a 10 kGy possono essere impiegate solo quando, in casi particolari, è necessaria una completa sterilizzazione del prodotto.

Tabella 1. Dosi impiegate nel trattamento con radiazioni ionizzanti.

Finalità dell'irraggiamento	Dose (kGy)
Inibizione della germogliazione (<i>patate, aglio e cipolle</i>)	0,05-0,15
Disinfestazione e disinfezione (<i>frutta e verdura, carni fresche di maiale</i>)	0,15-0,5
Ritardo della maturazione (<i>frutta e verdura fresca</i>)	0,25-1,0
Riduzione del livello di batteri saprofiti (<i>carni, pollame e pesce</i>)	0,5-1,0
Riduzione di batteri e funghi (<i>carni fresche, pollame, prodotti ittici, fragole</i>)	1,0-3,0
Riduzione di batteri saprofiti e patogeni (<i>prodotti di origine animale</i>)	1,0-7,0
Riduzione di muffe, batteri e spore termoresistenti (<i>erbe e spezie essiccate</i>)	3,0-10,0
Riduzione di microorganismi fino al punto di sterilità (<i>alimenti per immunodepressi, astronauti, personale dell'esercito</i>)	10-50

La storia dell'impiego delle radiazioni ionizzanti in campo alimentare è stata quanto mai varia e complessa. Dopo un iniziale forte interessamento che, negli anni tra il 1945 e il 1965, ha

stimolato la ricerca nel settore, gli studi sulla applicabilità di questa tecnica si sono fortemente diradati, principalmente a causa dello scetticismo e dell'avversione nei confronti di questo tipo di trattamento da parte dei consumatori. Solo dopo 15 anni le potenzialità di un tale approccio sono state riprese in fattiva considerazione in seguito alla prima pubblicazione nel 1981 delle conclusioni scaturite da un comitato congiunto FAO/IAEA/WHO (1) e più recentemente alle opinioni espresse dalla Commissione Scientifica sugli Alimenti nel 2003 (2) e dall'EFSA (*European Food Safety Authority*) nel 2011 (3) in cui si ribadisce che l'irraggiamento delle derrate alimentari non presenta problemi di natura tossicologica, nutrizionale e microbiologica fino ad una dose di radiazione di 10 kGy.

Sulla base di tali elementi di giudizio, attualmente, su scala mondiale, il trattamento degli alimenti con radiazioni ionizzanti è effettuato in circa 80 impianti distribuiti in poco più di 40 paesi e sempre più numerose sono le tipologie di alimenti che sono state autorizzate al trattamento.

Da una indagine pubblicata nel 2009 da Kume *et al.* (4) è risultato che nel 2005 sono state irradiate in tutto il mondo circa 405.000 tonnellate di alimenti: la suddivisione in percentuale delle tipologie alimentari è riportata nella Figura 1.

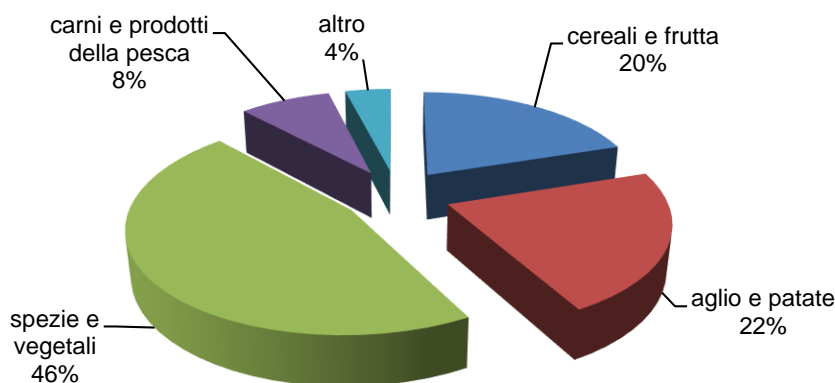


Figura 1. Tipologie di alimenti irradiati nel 2005 in tutto il mondo espresse in percentuale rispetto al totale

Dai dati riportati dagli autori risulta inoltre che il paese maggior produttore di alimenti irradiati nel 2005 è stato la Cina: insieme agli Stati Uniti d'America e all'Ucraina, la Cina ha irraggiato circa i $\frac{3}{4}$ del totale degli alimenti irradiati in tutto il mondo.

Nei paesi della comunità europea, nel 2005 sono state irradiate circa 15.000 tonnellate di alimenti pari a 3,7% degli alimenti trattati in tutto il mondo: gli alimenti più irradiati sono state le cosce di rana seguite da pollame e da erbe e spezie (Figura 2). Il Paese europeo che ha prodotto il maggior volume di alimenti irradiati nel 2005 è stato il Belgio (48%) seguito dai Paesi Bassi e dalla Francia (Figura 3). I grafici riportati nelle Figure 2 sono stati ricavati dai dati riportati annualmente nelle relazioni della Commissione Europea (disponibili da https://ec.europa.eu/food/safety/biosafety/irradiation/reports_en).

Nel 2010 gli stessi autori Kume e Teodsotiki (5) hanno condotto una ulteriore indagine dalla quale è emerso un aumento sensibile del volume di alimenti irradiati in alcuni stati, quali gli Stati Uniti d'America e alcune regioni dell'Asia, accompagnato invece da un forte decremento dell'applicazione dell'irraggiamento nei paesi europei pari a circa il 40% (da 15000 tonnellate nel 2005 a 9200 tonnellate nel 2010).

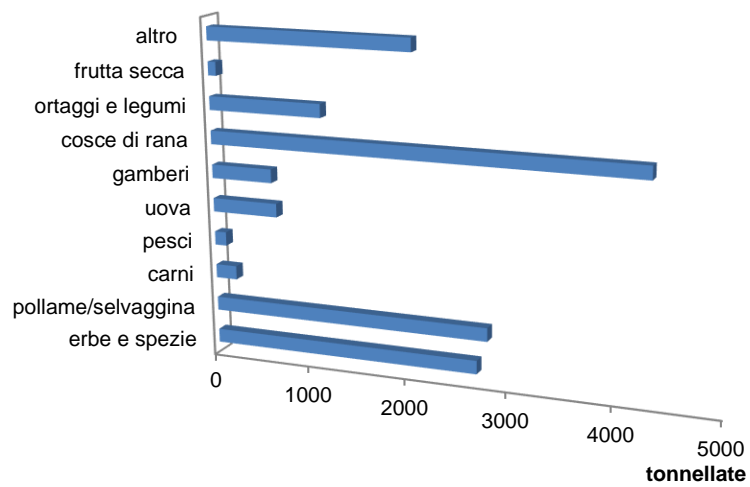


Figura 2. Quantità (in tonnellate) degli alimenti irradiati in Europa nel 2005 per ciascuna tipologia di alimenti

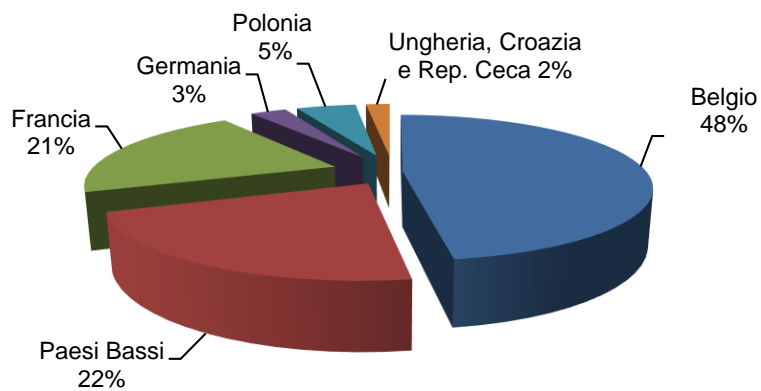


Figura 3. Distribuzione percentuale degli alimenti irradiati nei diversi Paesi europei nel 2005

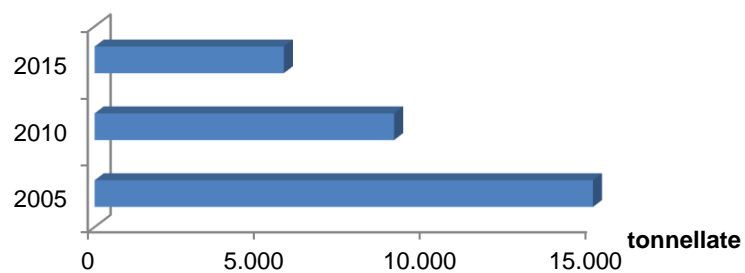


Figura 4. Volume (in tonnellate) di alimenti irradiati in Europa nel 2005, 2010 e 2015

I dati relativi ai volumi di alimenti irradiati in Europa riportati dalla Commissione Europea indicano, negli anni successivi al 2010, una continua e graduale diminuzione della quantità di alimenti trattati con radiazioni ionizzanti (Figura 4). Le ragioni che continuano a limitare l'impiego delle radiazioni ionizzanti in Europa rispetto al resto del mondo, sono legate essenzialmente ad una scarsa fiducia dei consumatori in questa tecnologia per la quale c'è una forte percezione di pericolo per la salute e per l'ambiente e all'emanazione di norme che ne restringono l'utilizzo, tra cui l'obbligo di etichettatura e il controllo in fase di commercializzazione.

Un esempio è rappresentato dall'Italia dove, nonostante l'irraggiamento di aglio, patate e cipolle sia stato consentito già dal 1973 (6) e quello delle erbe e spezie nel 1996 (7), esiste allo stato attuale un solo impianto autorizzato (Gammarad Italia) che ha dichiarato di aver effettuato il trattamento su 2,4 tonnellate di erbe e spezie nell'anno 2004 e di non aver ricevuto da allora più commissioni.

Quadro giuridico

Nei paesi della comunità europea il trattamento degli alimenti e dei loro ingredienti con radiazioni ionizzanti è disciplinato dalle direttive comunitarie 1999/2/CE e 1999/3/CE (8, 9) nate dalla esigenza di armonizzare le diverse legislazioni nazionali vigenti che condizionano la libera circolazione dei prodotti alimentari sul mercato.

Nel nostro Paese, il DL.vo 30 gennaio 2001, n. 94 (10), rispettando quindi quanto dettato dalle direttive comunitarie, stabilisce il campo di applicazione dell'irraggiamento, le finalità e le condizioni del trattamento, ivi comprese le sorgenti di radiazioni che possono essere utilizzate, le dosi che possono essere applicate, i requisiti igienici dei prodotti alimentari da sottoporre al trattamento stesso e le categorie di alimenti che possono essere irradiate.

A maggiore garanzia della corretta applicazione del processo tecnologico, viene anche stabilito che il trattamento dei prodotti con radiazioni ionizzanti debba avvenire solo in impianti muniti di autorizzazione e che per ogni impianto deve essere designato un responsabile dell'osservanza di tutte le condizioni di irraggiamento.

A tutela della libera scelta del consumatore, viene inoltre sancito che i prodotti trattati con radiazioni ionizzanti debbano essere correttamente etichettati, cioè riportare la dicitura "irradiato" in etichetta, se venduti confezionati, o su un cartello in prossimità del recipiente che li contiene, se venduti sfusi. Lo stesso obbligo vige se un prodotto irradiato è utilizzato come ingrediente, cioè la stessa dicitura deve accompagnare la sua denominazione nell'elenco degli ingredienti a prescindere dalla percentuale con cui esso è presente. Le norme relative all'etichettatura prevedono inoltre che i prodotti alimentari, se irradiati, debbano riportare l'indicazione della denominazione e dell'indirizzo dell'impianto che ha effettuato il trattamento o il suo numero di riferimento.

Per quanto riguarda gli alimenti irradiati in paesi terzi, essi possono essere importati solo se soddisfano le condizioni stabilite dalla normativa europea. In particolare essi devono essere accompagnati da documenti che precisino la denominazione e l'indirizzo dell'impianto che ha effettuato il trattamento. Gli impianti, inoltre, devono essere riconosciuti dalla Comunità europea e inseriti in un elenco che viene periodicamente aggiornato e pubblicato sulla *Gazzetta Ufficiale della Unione europea*. Gli elenchi aggiornati degli impianti europei ed extraeuropei sono disponibili sul sito della Commissione Europea (https://ec.europa.eu/food/safety/biosafety/irradiation/approved_establishments_en).

Relativamente agli alimenti che possono essere trattati, la direttiva comunitaria 1999/3/CE ha previsto l'adozione di una lista positiva di prodotti. Attualmente è stato stabilito un primo elenco che autorizza il trattamento di una sola categoria di prodotti: le erbe, le spezie e i condimenti

vegetali alla dose massima di 10 kGy. Il Consiglio e il Parlamento Europeo si sono accordati su erbe, spezie e condimenti vegetali considerando che sono frequentemente contaminate da numerose specie di muffe, batteri e loro spore termoresistenti e che le radiazioni ionizzanti sostituiscono il trattamento con fumiganti quali l'ossido di etilene i cui residui sono tossici e quindi potenzialmente pericolosi per l'uomo e l'ambiente.

In attesa che tale elenco comunque venga completato, la direttiva prevede che ogni stato membro possa mantenere le autorizzazioni nazionali vigenti, purché l'irradiazione e l'immissione sul mercato siano effettuate in conformità alle disposizioni dettate dalla direttiva e che ogni stato membro possa altresì autorizzare il trattamento dei prodotti alimentari per i quali un altro stato della comunità europea ha mantenuto le autorizzazioni.

In seguito al parere favorevole espresso nel 1986, 1992 e 1998 dal Comitato Scientifico per l'Alimentazione (*Scientific Committee on Food, SCF*) diversi sono gli alimenti e gli ingredienti alimentari che sono autorizzati nell'ambito della Comunità Europea: frutta, vegetali, cereali, tuberi, spezie e condimenti, prodotti ittici, carne fresca, pollame, cosce di rana, camembert, gomma arabica, uova, farina di riso. La lista degli alimenti autorizzati negli stati membri viene periodicamente aggiornata e pubblicata sulla *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea*. L'elenco delle autorizzazioni degli Stati Membri è disponibile sul sito della Commissione Europea (https://ec.europa.eu/food/safety/biosafety/irradiation/legislation_en).

L'estensione e l'inclusione nella lista positiva di altre matrici alimentari è ancora oggi argomento di ampio dibattito all'interno della Comunità Europea. A livello comunitario esiste una opinione comune e condivisa dalla maggior parte dei paesi che le norme in materia di igiene, se scrupolosamente rispettate, siano sufficienti da sole a garantire la sicurezza delle derrate alimentari e che l'uso del trattamento debba essere ristretto solo a quegli alimenti o ingredienti alimentari che, in ragione di limiti inerenti il loro processo di produzione, possano rappresentare un rischio microbiologico residuo che non può essere ridotto attraverso l'utilizzo di altre tecniche di conservazione.

Al fine di assicurare la conformità dei prodotti alle disposizioni vigenti, proteggere gli interessi del consumatore, tra cui quelli inerenti la corretta informazione, e assicurare la lealtà delle transazioni commerciali, la direttiva comunitaria 1999/2/CE pone infine l'accento sulla necessità da parte di ogni stato membro di effettuare controlli, sia sugli impianti di irraggiamento che sui prodotti in fase di commercializzazione. I risultati di tali controlli devono essere comunicati annualmente alla Commissione delle Comunità Europee.

Il decreto di recepimento stabilisce, in base alle normative nazionali relative al controllo ufficiale degli alimenti, che tali controlli vengano effettuati dalle autorità sanitarie territorialmente competenti. All'Istituto Superiore di Sanità (ISS), quale organo tecnico-scientifico del Ministero della Salute, è stato invece demandato il compito istituzionale di individuare i metodi analitici atti a rilevare il trattamento con radiazioni ionizzanti e di fornire il supporto tecnico-scientifico ai laboratori deputati al controllo ufficiale.

Metodi di identificazione

La disponibilità di metodi atti ad identificare gli alimenti irradiati è un prerequisito richiesto da molti paesi per l'autorizzazione all'irraggiamento. Tali metodi devono offrire la possibilità di verificare inequivocabilmente se un alimento sia stato trattato o meno con radiazioni ionizzanti e devono poter essere applicati sull'alimento in fase di commercializzazione per tutta la durata di conservazione. L'applicazione di tali metodi rappresenta uno strumento essenziale per verificare la corretta etichettatura, per controllare gli scambi commerciali e per informare i consumatori e le aziende. Le ricerche sui metodi di identificazione degli alimenti irradiati hanno portato fino ad

ora all'emanazione da parte del CEN (*Comité Européen de Normalisation*, CEN) di protocolli di utilizzo di metodi sviluppati in ambito comunitario, alla cui validazione hanno contribuito anche i ricercatori dell'ISS attraverso la partecipazione a progetti europei e internazionali. Tali protocolli sono stati recepiti dall'Ente Nazionale Italiano di Unificazione, UNI (Tabella 2). Nonostante i notevoli sforzi e i progressi ottenuti nello sviluppo di metodi di identificazione attendibili, i risultati hanno mostrato che non esiste, fino ad ora, un metodo generale applicabile a tutti i tipi di alimenti irradiati. Infatti, gli alimenti che possono essere trattati con radiazioni ionizzanti presentano uno spettro di caratteristiche chimico-fisiche estremamente ampio: da alimenti a basso contenuto d'acqua, come le spezie, ad alimenti ricchi di acqua, di proteine e di lipidi. Per questa ragione, molti metodi sono stati studiati per singoli gruppi di matrici alimentari sulla base del principio di "commonality and similarity". I metodi di identificazione sono in genere suddivisi, in base al tipo di modifiche radio-indotte nell'alimento, in metodi fisici, chimici e biologici. Alcuni dei metodi riportati nella Tabella 2, in particolare il *DNA comet assay*, la conta diretta su filtro in epifluorescenza/conta in piastra (*Direct Epifluorescent Filter Technique/Aerobic Plate Count*, DEFT/APC) e la luminescenza fotostimolata (*PhotoStimulated Luminescence*, PSL), sono da considerarsi come metodi di screening. Tali metodi offrono diversi vantaggi tra i quali semplicità di esecuzione, bassi costi, velocità delle misure rispetto ai metodi di conferma che sono invece più costosi, meno veloci, richiedono apparecchiature specializzate e personale competente per l'interpretazione dei risultati. È importante sottolineare che i metodi finora standardizzati sono di tipo qualitativo essendo l'esigenza primaria di un metodo di identificazione stabilire, in presenza di una norma che autorizza il trattamento, se un alimento è stato sottoposto a radiazioni ionizzanti o no; i controlli sulla corretta applicazione delle dosi consentite sono parte della verifica delle buone pratiche di irraggiamento degli impianti, durante la quale vengono fatti controlli di dosimetria dai quali si può risalire direttamente alla dose applicata. Attualmente l'attività di ricerca in tale settore è finalizzata anche alla verifica dell'applicabilità di alcuni dei metodi di identificazione per una valutazione quantitativa attraverso la quale è possibile risalire alla dose di trattamento. I metodi che si prestano di più a questo tipo di analisi sono quelli basati sulla termoluminescenza (*ThermoLumiscence*, TL), la gascromatografia con spettrometria di massa (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS) e la risonanza di spin elettronico (*Electron Spin Resonance*, ESR).

Tabella 2. Metodi di identificazione degli alimenti irradiati recepiti dall'UNI

Norma UNI	Tipologie alimentari	Metodo
EN 1784:2004	pollo, maiale e manzo, camembert, avocado, papaya e mango	GC degli idrocarburi
EN 1785:2004	pollo, maiale, uova, camembert e salmone	GC/MS dei 2-alchilciclobutanoni
EN 1786:1997	pollo, manzo, trote contenenti osso	ESR dell'idrossiapatite
EN 1787:2000	pistacchi, paprika, fragole	ESR della cellulosa
EN 1788:2002	erbe, spezie, gamberetti, patate, frutta e vegetali	TL
EN 13708:2002	fichi, mango e papaya secchi, uvetta	ESR degli zuccheri
EN 13751:2009	erbe, spezie, molluschi e crostacei	PSL
EN 13783:2002	erbe e spezie	DEFT/APC
EN 14569:2005	pollo	LAL/GNB
EN 13784:2002	vari tipi di carne, semi, frutta secca e spezie	<i>DNA comet assay</i>

I metodi di identificazione, sopra riportati, sono stati individuati dall'ISS come i metodi che devono essere applicati, nell'ambito del controllo ufficiale, dagli organismi territorialmente

competenti, alle condizioni e nei limiti descritti nei relativi protocolli. Una prima descrizione dei metodi (principi, limiti e applicabilità) è riportata nel *Rapporto ISTISAN 04/21 del 2004* (11).

Tali metodi, come appare evidente dalla Tabella 2, sono stati inizialmente validati per un numero ristretto di matrici alimentari. Essi continuano ad essere oggetto di continue verifiche e implementazioni al fine di testare l'efficacia e la qualità delle analisi di routine attraverso la definizione del loro campo di applicazione e delle condizioni opportune per una loro corretta applicazione.

A questo scopo, l'ISS in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata (IZSPB) svolge da anni un'attività di ricerca che ha come obiettivo principale l'estensione e la validazione dei metodi di identificazione del trattamento con radiazioni ionizzanti a nuove matrici alimentari. Tale attività di ricerca è svolta prevalentemente attraverso progetti finanziati dal Ministero della Salute cui partecipano i laboratori coinvolti nel controllo degli alimenti irradiati. Nell'ambito di tali progetti viene svolta anche un'attività di supporto ai laboratori per la messa a punto e il corretto utilizzo dei metodi di analisi per l'identificazione del trattamento.

Applicazioni della normativa: controlli ufficiali

In applicazione alla normativa, la Commissione delle Comunità Europee ogni anno, in base ai dati forniti da ciascuno stato membro, pubblica sulla *Gazzetta Ufficiale* una relazione relativa ai controlli effettuati sia sugli impianti di irraggiamento che sui prodotti in fase di commercializzazione. Per quanto riguarda i controlli effettuati sul prodotto in fase di commercializzazione ogni stato membro comunica alla Commissione il numero di campioni analizzati, suddivisi per categorie alimentari, i metodi analitici utilizzati nei controlli e l'esito delle analisi. Alcuni Paesi della Unione Europea (UE) hanno incominciato ad effettuare i controlli previsti per legge già dal 2001.

Nella Figura 5 vengono riportati il numero dei controlli effettuati nei paesi della comunità europea negli ultimi anni (2010-2015) e le percentuali di non conformità riscontrate.

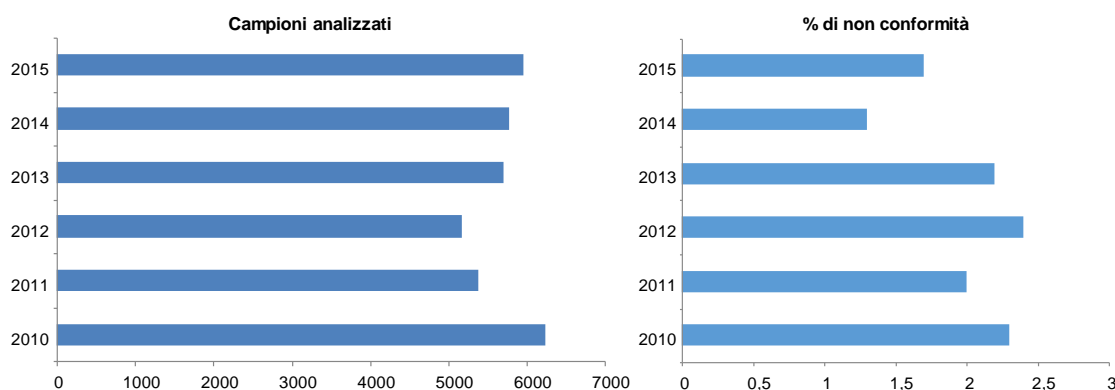


Figura 5. Controlli effettuati nella Comunità europea negli anni 2010-2015 e relative non conformità riscontrate

In genere le due ragioni principali di non conformità dei campioni analizzati sono una etichettatura non corretta e l'irraggiamento di alimenti per i quali il trattamento non è autorizzato. Un'altra non conformità è dovuta all'irraggiamento effettuato in impianti non autorizzati dalla UE. Nel 2015 circa l'1,7% dei campioni analizzati in Europa è risultato non conforme.

In Italia i primi controlli sono stati effettuati nel 2005; la causa principale di questo ritardo è rappresentata dalle difficoltà che i laboratori del controllo ufficiale hanno incontrato nella messa a punto dei metodi di identificazione, con particolare riferimento ai metodi di conferma, che richiedono apparecchiature costose e personale competente.

I primi dati forniti alla Commissione delle Comunità Europee riguardano i risultati di analisi effettuate dall'ISS e dalla Regione Lombardia su erbe e spezie. In particolare l'ISS nel 2005 ha condotto, di concerto con il Ministero della Salute, un'indagine conoscitiva su spezie ed erbe, comprese quelle utilizzate negli integratori alimentari, provenienti da paesi terzi: sono state analizzate 52 partite di erbe, spezie ed estratti vegetali, che vengono normalmente utilizzati come componenti degli integratori alimentari, utilizzando come tecnica di screening il metodo basato sulla luminescenza fotostimolata (EN 13751) e come metodo di conferma il metodo basato sulla termoluminescenza (EN 1788). I risultati di tali controlli hanno evidenziato un 10% di prodotti irradiati non accompagnati da una dichiarazione attestante il trattamento subito (12, 13). La regione Lombardia tramite la ASL di Milano ha analizzato attraverso il metodo di screening DEFT/APC (EN 13783) 60 campioni di erbe e spezie prelevate sul proprio mercato: nessun campione è risultato positivo.

Nel corso degli anni, l'ISS ha messo a disposizione le proprie competenze nel settore e, in collaborazione con l'IZSPB, ha operato per creare una rete di laboratori in grado di effettuare controlli sulla maggior parte delle matrici alimentari.

Ciò è stato realizzato attraverso corsi formativi teorico-pratici, pubblicazione di rapporti tecnici, consulenze tecnico-scientifiche e progetti di ricerca finanziati dal Ministero della Salute che hanno visto coinvolti diversi Istituti Zooprofilattici Sperimentali e altri enti di ricerca.

Nella Figura 6 si riporta il numero dei campioni analizzati in Italia dal 2010 al 2015: il numero dei controlli effettuati nel nostro paese dal 2011 è fortemente aumentato attestandosi intorno a un valore di 550 campioni in media negli ultimi tre anni. Attualmente l'Italia è il secondo paese dopo la Germania che effettua il maggior numero di controlli sui prodotti in fase di commercializzazione: la Germania nel 2015 ha analizzato 3344 campioni corrispondenti al 56% del totale, l'Italia ha contribuito analizzando il 9% dei campioni esaminati in tutta Europa.

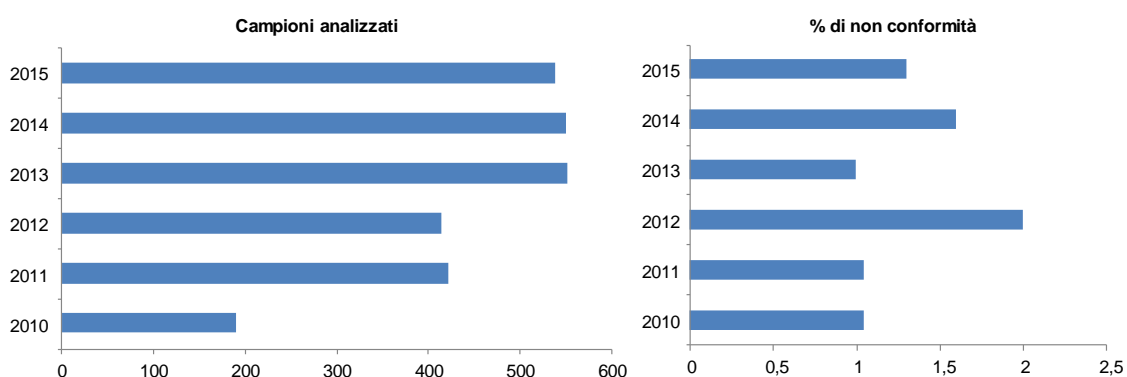


Figura 6. Controlli effettuati in Italia negli anni 2010-2015 e relative non conformità riscontrate

Nel 2015 in Italia, il campionamento e i controlli sui prodotti presenti sul mercato sono stati effettuati secondo quanto predisposto dal Piano nazionale per il controllo ufficiale degli alimenti trattati con radiazioni (di seguito “Piano”). Il Piano, con validità quadriennale 2015-2018, rappresenta il primo piano, frutto di collaborazione tra il Ministero della Salute, l’ISS e l’IZSPB, proposto e approvato dal Coordinamento interregionale.

Attualmente sono disponibili per il controllo ufficiale sette laboratori, distribuiti sul territorio nazionale; la lista dei laboratori con i metodi accreditati, è riportata nell’allegato 6a del Piano. Tra i metodi accreditati sicuramente i metodi di tipo fisico (TL, PSL e ESR) sono quelli più largamente utilizzati nel controllo, seguiti dal metodo biologico del *DNA comet assay* e dal metodo chimico GC/MS.

Ad eccezione dell’IZSPB, che ha accreditato metodi sia di screening che di conferma per la maggior parte delle matrici alimentari, gli altri laboratori sono in grado di eseguire controlli su un numero più limitato di matrici e non sempre con metodi di conferma.

A supporto dell’attività dei laboratori deputati al controllo, accanto alle tipologie di alimenti selezionati vengono inoltre indicati per ciascuna matrice i metodi da applicare nel controllo (allegato 6b del Piano).

Nel 2015 in Italia sono state analizzate 539 campioni costituiti dal 47,9% di alimenti di origine vegetale (erbe e spezie, patate, aglio e cipolle, cereali, frutta fresca e secca, legumi ecc.), dal 28,6% da prodotti della pesca (crostacei, molluschi e pesci), dal 13,7% da carne e prodotti della carne incluse le cosce di rana, e da un restante 9,8% da integratori alimentari, materie prime per integratori alimentari, preparazioni gastronomiche (Figura 7).

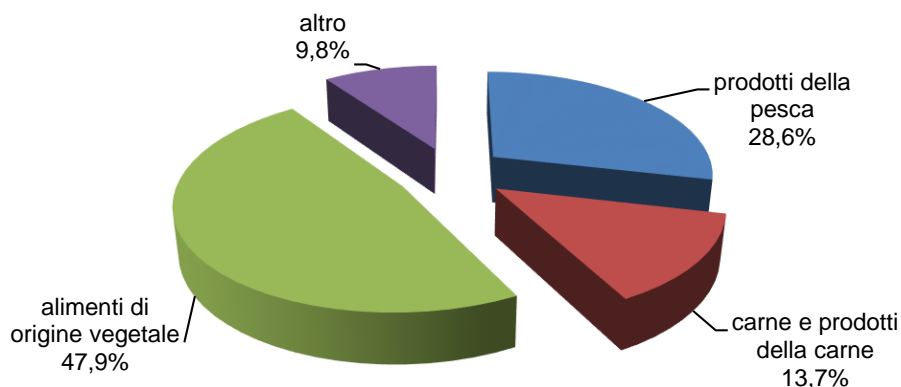


Figura 7. Categorie alimentari analizzate nel 2015 in Italia

Le non conformità riscontrate (1,3% del totale dei campioni controllati) sono per la maggior parte relative a materie prime per integratori alimentari (estratti vegetali) e integratori alimentari, il cui trattamento nell’ambito della comunità europea non è autorizzato; i campioni risultati irradiati non erano inoltre correttamente etichettati.

Al fine del potenziamento delle strutture coinvolte nel controllo ufficiale e per una maggiore efficacia e implementazione del Piano, nel presente rapporto sono riportati e discussi i principi, l’applicabilità, i limiti e gli sviluppi futuri dei metodi di identificazione indicati per il controllo ufficiale.

L'ISS, sulla base di quanto stabilito dalla normativa vigente, è continuamente impegnato nell'implementazione del controllo degli alimenti irradiati sul nostro territorio, attraverso lo svolgimento di attività di formazione, consulenza, ricerca per lo sviluppo e l'estensione dei metodi di identificazione e valutazione critica dei metodi al fine di elaborare documenti utili per indirizzare i laboratori deputati al controllo ufficiale alla scelta e all'utilizzo dei metodi di analisi più idonei.

Bibliografia

1. World Health Organization. *Wholesomeness of irradiated food. Report of a Joint FAO/IAEA/WHO expert Committee*, Geneva: WHO; 1981. (WHO Technical Report Series No. 659).
2. European Commission. *Revision of the opinion of the Scientific Committee on Food on the irradiation of food*. Bruxelles: European Commission; 2003. (SCF/CS/NF/IRR/24 Final 24 April 2003). Disponibile all'indirizzo: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_out193_en.pdf; ultima consultazione dicembre 2017.
3. EFSA (European Food Safety Authority). *Scientific Opinions on the Chemical Safety of Irradiation of Food adopted by the BIOHAZ and CEF Panels*. *EFSA Journal* 2011;9(4):1930.
4. Kume T, Furuta M, Todoriki S, Uenoyama N, Kobayashi Y. Status of food irradiation in the world. *Radiation Physics and Chemistry* 2009;78:222-6.
5. Kume T, Todoriki S. Food irradiation in Asia, the European Union, and the United States: a status update. *Radioisotopes* 2013;62(5):291-9.
6. Italia. Decreto Ministeriale 30 agosto 1973. Autorizzazione al trattamento mediante radiazioni gamma, a scopo anti-germogliativo di patate, cipolle e aglio. *Gazzetta Ufficiale* n. 254, 1° ottobre 1973.
7. Italia. Decreto Ministeriale 18 luglio 1996. Regolamento riguardante il trattamento con radiazioni ionizzanti di erbe aromatiche essiccate, spezie e condimenti a base di erbe aromatiche essiccate e di spezie. *Gazzetta Ufficiale* n. 204, 31 agosto 1996.
8. Europa. Direttiva 1999/2/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 febbraio 1999 relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti gli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* n. L 66/16 del 13 marzo 1999.
9. Europa. Direttiva 1999/3/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 febbraio 1999 che stabilisce un elenco comunitario degli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* n. L 66/24 del 13 marzo 1999.
10. Italia. Decreto legislativo 30 gennaio 2001, n.94. Attuazione delle direttive 1999/2/CE e 1999/3/CE concernenti gli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti. *Gazzetta Ufficiale* n. 79, supplemento ordinario, 4 aprile 2001.
11. Boniglia C, Onori S, Sapore O. *Trattamento degli alimenti con radiazioni ionizzanti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2004. (Rapporti ISTISAN 04/21).
12. Aureli P, Boniglia C, Bortolin E, Onori S. *Indagine conoscitiva all'importazione su spezie ed erbe irradiate, incluse quelle usate negli integratori alimentari*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/4).
13. Boniglia C, Aureli P, Bortolin E, Onori S. Verification of imported food upon import for radiation processing: dried herbs, including herbs used in food supplements, and spices by PSL and TL. *Radiation Physics and Chemistry* 2009;78:679-81.

PIANO NAZIONALE PER IL CONTROLLO DEGLI ALIMENTI TRATTATI CON RADIAZIONI IONIZZANTI

Monica Capasso, Gerardo Califano, Virgilio Stillitano
Direzione generale per l'igiene e la sicurezza degli alimenti, Ministero della Salute, Roma

Dal 2005 in Italia si effettuano controlli nelle fasi di commercializzazione e di importazione degli alimenti per verificarne la conformità ai requisiti di autorizzazione ed etichettatura, in applicazione della normativa di riferimento dell'Unione europea per l'attività di controllo sull'impiego delle radiazioni ionizzanti nei prodotti alimentari. Inviando i propri risultati alla Commissione europea, l'Italia contribuisce alla realizzazione del "Report annuale al Parlamento europeo e al Consiglio sugli alimenti e loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti". Tuttavia, in assenza di una pianificazione, pur essendo costantemente cresciuta negli anni la partecipazione regionale/provinciale, il controllo sugli alimenti trattati con radiazioni ionizzanti non è stato pienamente attuato sull'intero territorio nazionale.

Pertanto, al fine di ottimizzare l'attività di controllo ufficiale sugli alimenti irradiati e per consentire la rendicontazione alla Commissione europea dei risultati conseguiti con tutte le informazioni obbligatorie richieste, il Ministero della Salute ha predisposto un "Piano nazionale di controllo ufficiale sugli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti" (di seguito "Piano"), attuato a partire dal 2015 con conclusione nel 2018.

Il Piano ha lo scopo di:

- organizzare in maniera unitaria e armonizzata le attività di controllo svolte in questo settore dalle autorità sanitarie regionali/provinciali e dagli Uffici periferici del Ministero della Salute;
- standardizzare il flusso delle informazioni dalle Autorità territoriali all'Autorità centrale e, successivamente, alla Commissione europea;
- fornire a tutti gli attori coinvolti una visione complessiva dei risultati conseguiti, sia regionali che nazionali, ai fini delle successive programmazioni.

Il Piano è frutto di un lavoro di collaborazione fra il Ministero della Salute, l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e il Centro di Referenza Nazionale per la Radioattività (CRNR) dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) di Puglia e Basilicata, ha validità quadriennale (periodo 2015-2018) ed è parte integrante del Piano Nazionale Integrato pluriennale di controllo (PNI) previsto all'art. 41 del Regolamento (CE) 882/2004.

Il Piano si articola in più parti, definisce ruoli e obiettivi per tutti i soggetti coinvolti (Autorità competenti, Laboratori di analisi, Istituti scientifici), individua le principali matrici alimentari da sottoporre al controllo e i criteri che ogni Regione/Provincia autonoma deve tener presente per l'effettuazione dei campionamenti e delle analisi e per l'elaborazione dei Piani di controllo regionali/provinciali.

La pianificazione delle attività di controllo sul territorio e all'importazione è stata sviluppata sulla base di una valutazione del rischio e con frequenza appropriata in funzione dei rischi identificati, secondo quanto stabilito dal Regolamento (CE) 882/2004. La tipologia e la relativa quantità delle matrici alimentari oggetto di irraggiamento a livello mondiale, i flussi all'importazione dai Paesi che hanno l'autorizzazione ad irraggiarle, le non conformità riscontrate nei precedenti controlli effettuati a livello europeo, le problematiche generali e specifiche emerse durante l'attuazione dei controlli effettuati negli anni passati nelle fasi di commercializzazione e

di importazione, rappresentano gli aspetti più rilevanti che sono stati presi in considerazione per la valutazione del rischio e la definizione delle procedure di controllo.

Relativamente a ruoli e ambiti territoriali di competenza, l'attuazione del Piano è affidata a:

- Regioni/Province Autonome per la pianificazione, il coordinamento e il controllo delle attività delle Aziende Sanitarie Locali (ASL) sul territorio di propria competenza;
- ASL per l'esecuzione delle attività locali di vigilanza;
- Uffici di Sanità Marittima, Aerea e di Frontiera (USMAF) per i controlli sugli alimenti di origine non animale provenienti da Paesi terzi;
- Posti di Ispezione Frontaliera (PIF) per i controlli sugli alimenti di origine animale provenienti da Paesi terzi;
- IZS, Agenzie Regionali per la Protezione Ambientale (ARPA), Laboratori pubblici delle ASL e altri Laboratori designati dalle Autorità competenti per il controllo ufficiale, per l'effettuazione delle analisi di laboratorio;
- ISS per il supporto tecnico-scientifico e le revisioni di analisi su campioni di alimenti non conformi;
- IZS di Puglia e Basilicata (Centro di Referenza Nazionale per la Ricerca della Radioattività, CRNR), per il supporto tecnico-scientifico e per la conferma di risultati dubbi o positivi.

Il Piano ha stabilito un numero minimo di campioni da prelevare per i controlli analitici sia in fase di commercializzazione (300 campioni/anno) che di importazione (90 campioni/anno). Per i controlli sul territorio, i campioni da prelevare sono stati distribuiti a livello regionale/provinciale in proporzione alla popolazione residente (fonte ISTAT 2012), prevedendo un minimo di 3 campioni/anno per le Regioni/Province a più bassa densità di popolazione. Per i controlli all'importazione, i campioni da sottoporre ad analisi sono stati ripartiti tra gli Uffici periferici del Ministero della Salute (USMAF e PIF) in base alla consistenza dei flussi in entrata delle merci. Le matrici alimentari da campionare, sia di origine animale che non animale, sono state scelte tra le categorie di alimenti che vengono solitamente irradiate a livello mondiale e in base alla possibilità di effettuare sul nostro territorio le analisi per la rilevazione del trattamento con radiazioni ionizzanti. La selezione delle matrici è stata altresì dettata dal rischio di non conformità riportate nei documenti pubblicati dalla Commissione europea.

Nelle Tabelle 1 e 2 sono riportate le matrici alimentari selezionate per il Piano 2015-2018 e i metodi da utilizzare per le analisi.

Tabella 1. Matrici alimentari e relativi metodi di analisi: alimenti di origine animale

Categoria alimentare/alimento	Descrizione alimento	Metodi
Molluschi (Cefalopodi e/o Molluschi bivalvi)	Vongole, cozze e ostriche con guscio	EN 13751 S EN 1788 C
	Seppie con osso	EN 1788 C EN 1786 C
	Calamari, polpi e seppie non eviscerati	EN 1788 C
Cosce di rana	Cosce di rana con ossa	EN 1786 C
Crostacei	Gamberi, gamberetti e scampi non eviscerati	EN 13751 S EN 1788 C
Pesci	Pesci con lisca	EN 1786 C EN 13784 S
		EN 1786 C EN 1785 C EN 13784 S

S: metodo di screening; C: metodo di conferma

Tabella 2. Matrici alimentari e relativi metodi di analisi: alimenti di origine non animale

Categoria alimentare/alimento	Descrizione alimento	Metodi
Aglio, patate e cipolle	Aglio e patate con buccia	EN 13751 S EN 1788 C EN 13784 S
	Cipolle con buccia	EN 13751 S EN 1788 C
Cereali in grani	Mais, frumento, riso	EN 1788 C
Erbe e spezie		EN 13751 S EN 1788 C EN 1787 C* EN 13784 S
Frutta fresca	Fragole, mirtilli, ribes, more, papaya, avocado, mango	EN 1788 C EN 1787 C* EN 13784 S
Frutta a guscio	Pistacchi, noci, arachidi, nocciole, castagne, mandorle	EN 1788 C EN 1787 C* EN 13784 S
Frutta secca	Fichi, uvetta	EN 1788 C EN 13708 C*
Funghi essiccati		EN 13751 S EN 1788 C EN 1787 C*
Legumi secchi		EN 13751 S EN 1788 C EN 13784 S
Ingredienti di origine vegetale per la produzione di integratori alimentari	Piante e parti di piante (foglie, radici, semi, frutti, ecc.)	EN 13751 S EN 1788 C EN 1787 C* EN 13784 S
	Estratti vegetali	EN 1788 C

S: metodo di screening; C: metodo di conferma; C*: metodo da intendersi di conferma solo nel caso di risultato analitico positivo, altrimenti necessita di un altro metodo

Nelle Tabelle 3 e 4 è indicata la ripartizione percentuale da rispettare nel campionamento delle matrici, sempreché la stessa sia effettivamente realizzabile in forza del numero di campioni da prelevare. In ogni caso la ripartizione percentuale, puramente indicativa, fornisce un orientamento per l'attribuzione della priorità nella scelta delle categorie alimentari da campionare.

Tabella 3. Ripartizione delle matrici alimentari di origine animale da campionare

Categoria alimentare/alimento	Descrizione alimento	Ripartizione% dei campioni*
Molluschi (Cefalopodi e/o Molluschi bivalvi)	Vongole, cozze e ostriche con guscio, seppie (con osso o non eviscerate), calamari e polpi non eviscerati	24%
Cosce di rana	Cosce di rana con ossa	24%
Crostacei	Gamberi, gamberetti e scampi non eviscerati	20%
Pesci	Pesci con lisca (merluzzi e/o sgombri e/o tonni)	20%
Pollame	Pollame con ossa	12%

* Ripartizione dei campioni calcolata in base alla quantità importata, al rischio di non conformità, al rischio di irraggiamento nei Paesi terzi e nella UE

Tabella 4. Ripartizione delle matrici alimentari di origine non animale da campionare

Categoria alimentare/alimento	Descrizione alimento	Ripartizione% dei campioni*
Ingredienti di origine vegetale per la produzione di integratori alimentari	Estratti vegetali, parti di piante (foglie, radici, ecc.)	18%
Cereali in grani	Mais, frumento, riso	15%
Funghi essiccati		13%
Erbe e Spezie		12%
Legumi secchi		12%
Frutta a guscio	Pistacchi, noci, arachidi, nocciole, castagne, mandorle	10%
Frutta secca	Fichi, uvetta	
Frutta fresca	Fragole, mirtilli, ribes, more, papaya, avocado, mango	10%
Aglio, patate e cipolle	Aglio, patate e cipolle con buccia	10%

* Ripartizione dei campioni calcolata in base alla quantità importata, al rischio di non conformità, al rischio di irraggiamento nei Paesi terzi e nella UE

Il Piano include anche un elenco dei Paesi (dell'Unione Europea-UE ed extra UE) in cui è noto l'impiego di radiazioni ionizzanti nei prodotti alimentari di origine animale e non animale, utile per indirizzare il campionamento "preferibilmente" sugli alimenti da essi provenienti, inoltre stabilisce le modalità di campionamento, di analisi e di trasmissione dei risultati analitici.

Il campionamento per il controllo ufficiale degli alimenti e loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti deve avvenire secondo le modalità e le norme di prelevamento indicate nel DPR 327/1980.

Il numero di aliquote necessarie (4/5) per l'esecuzione delle analisi deve essere conforme a quanto stabilito dal DPR 327/1980 nei casi in cui l'analisi del campione venga eseguita presso un Laboratorio che utilizza, per la prova richiesta, metodi analitici di conferma accreditati per la specifica matrice.

Qualora il laboratorio non disponga del metodo di conferma per la prova richiesta sulla specifica matrice, le Autorità sanitarie preposte al campionamento dovranno procedere al prelievo di un'aliquota aggiuntiva del campione ufficiale al fine di garantire, nel caso di risultati dubbi o positivi allo screening, l'esecuzione dell'analisi di conferma. Ogni campione dovrà essere accompagnato da tante copie di verbale quanti sono i destinatari delle aliquote.

Le analisi sui campioni prelevati sono effettuate dai Laboratori pubblici, incluso il CRNR dell'IZS di Puglia e Basilicata, designati dalle Autorità competenti per il controllo ufficiale, nonché dall'ISS per quanto concerne le analisi di revisione.

Il CRNR dell'IZS di Puglia e Basilicata effettua, inoltre, la conferma di risultati dubbi o positivi e controlli su matrici per le quali venga richiesta direttamente l'analisi con il metodo di conferma EN 1788 – TL (Termoluminescenza).

Per il controllo ufficiale degli alimenti, le Autorità regionali/provinciali devono designare Laboratori accreditati per le singole prove, ai sensi dell'art.12 del Regolamento (CE) 882/2004.

Per i campionamenti effettuati all'importazione, le analisi dovranno essere eseguite unicamente presso Laboratori che utilizzano metodi analitici di conferma accreditati per la specifica matrice, al fine di abbreviare i tempi del controllo ufficiale.

A partire dal 2014, la DG SANTE della Commissione europea ha armonizzato la raccolta dei dati al fine di agevolare il lavoro di tutti i soggetti coinvolti in questo settore. La soluzione tecnica adottata prevede la trasmissione dei risultati dei controlli ufficiali raccolti negli Stati membri attraverso la compilazione di un modello di rendicontazione preformato, predisposto dalla stessa DG SANTE, da inoltrare annualmente alla Commissione europea.

Nelle more della realizzazione di un sistema nazionale centralizzato e informatizzato di raccolta dati, per consentire una completa rendicontazione dei risultati alla Commissione europea, i dati delle attività analitiche di controllo sul territorio dovranno essere provvisoriamente trasmessi al Ministero utilizzando un formato Excel di rendicontazione appositamente predisposto.

Sulla base dei dati ricevuti, il Ministero della Salute redige un rapporto annuale sugli esiti nazionali conseguiti, comprendente anche una valutazione complessiva dei risultati ottenuti ed eventuali indicazioni correttive ai fini di una razionalizzazione dei controlli per gli anni. Nei diagrammi riportati di seguito (Figure da 1 a 5) sono schematizzate le varie fasi del controllo ufficiale sugli alimenti trattati con radiazioni ionizzanti.

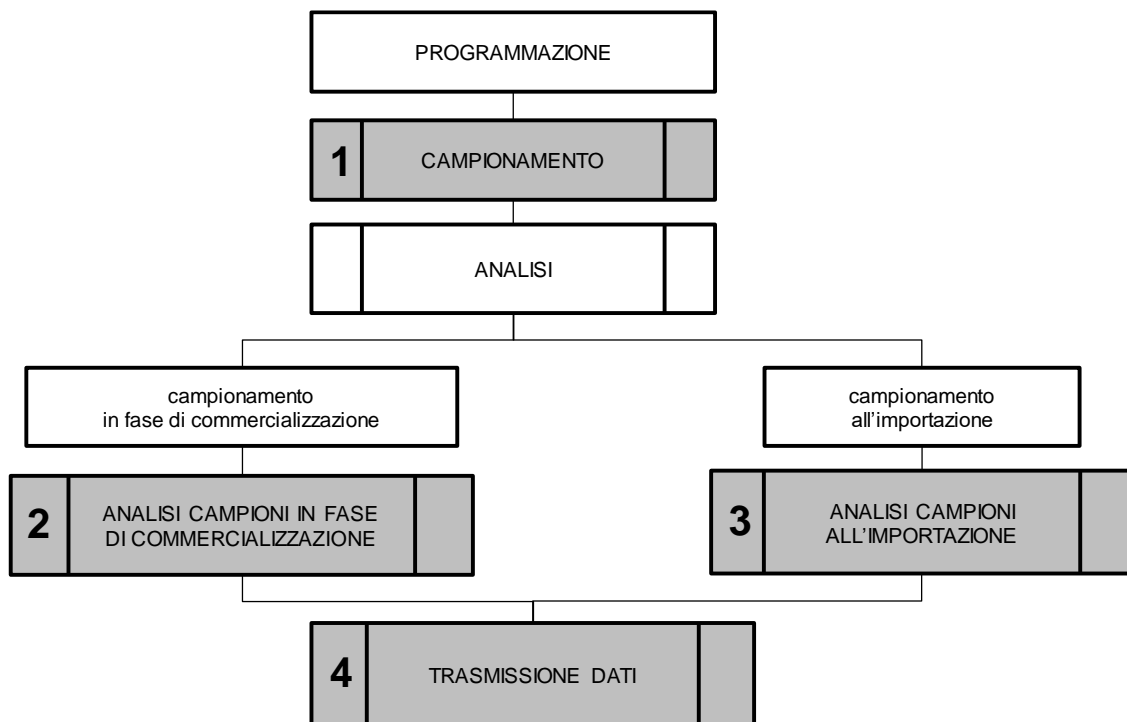


Figura 1. Fasi del controllo ufficiale sugli alimenti irradiati

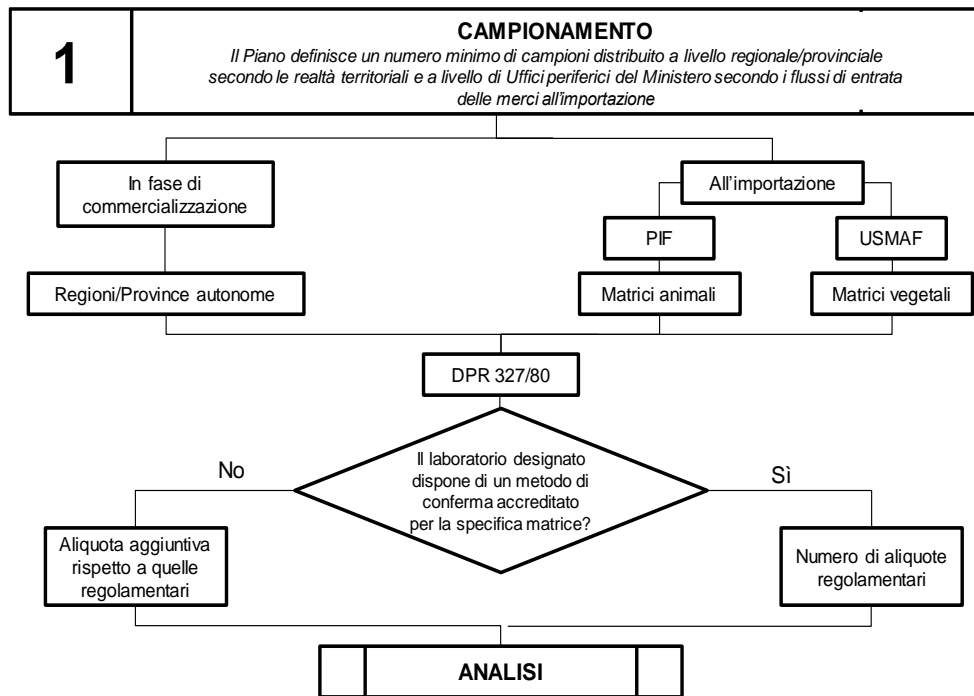


Figura 2. Piano nazionale di controllo ufficiale sugli alimenti irradiati: Fase 1- Campionamento

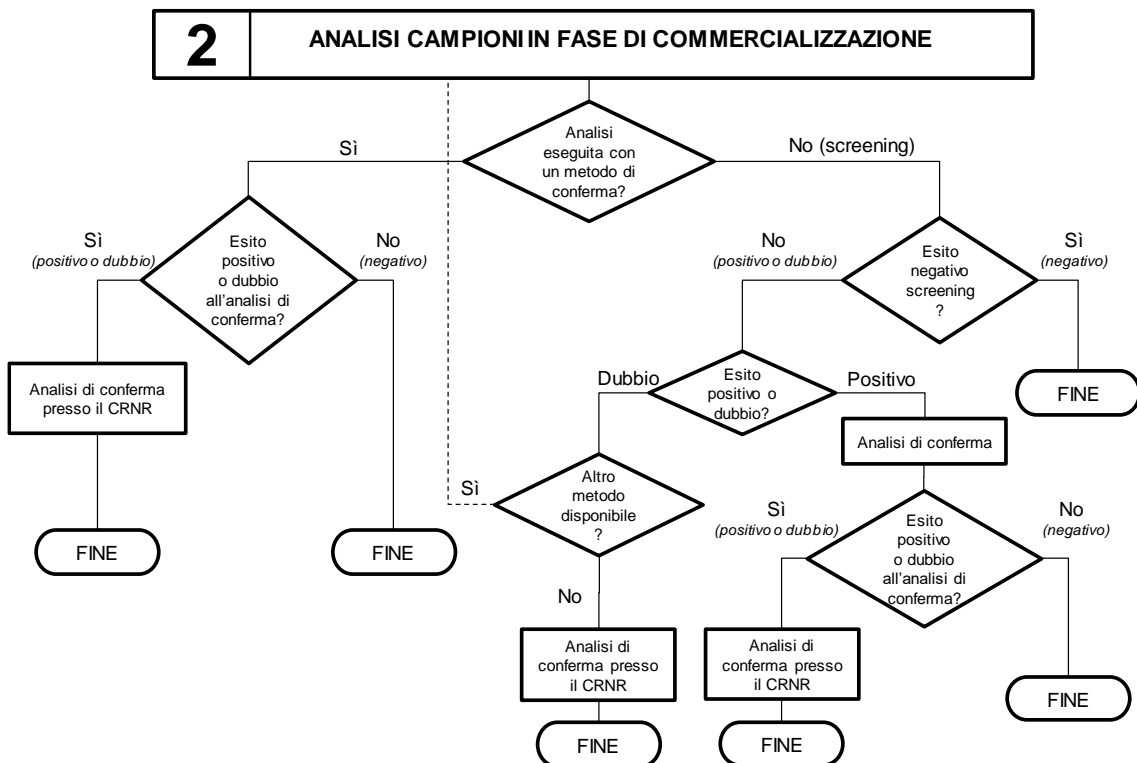


Figura 3. Piano nazionale di controllo ufficiale sugli alimenti irradiati: Fase 2 - Analisi di campioni in fase di commercializzazione

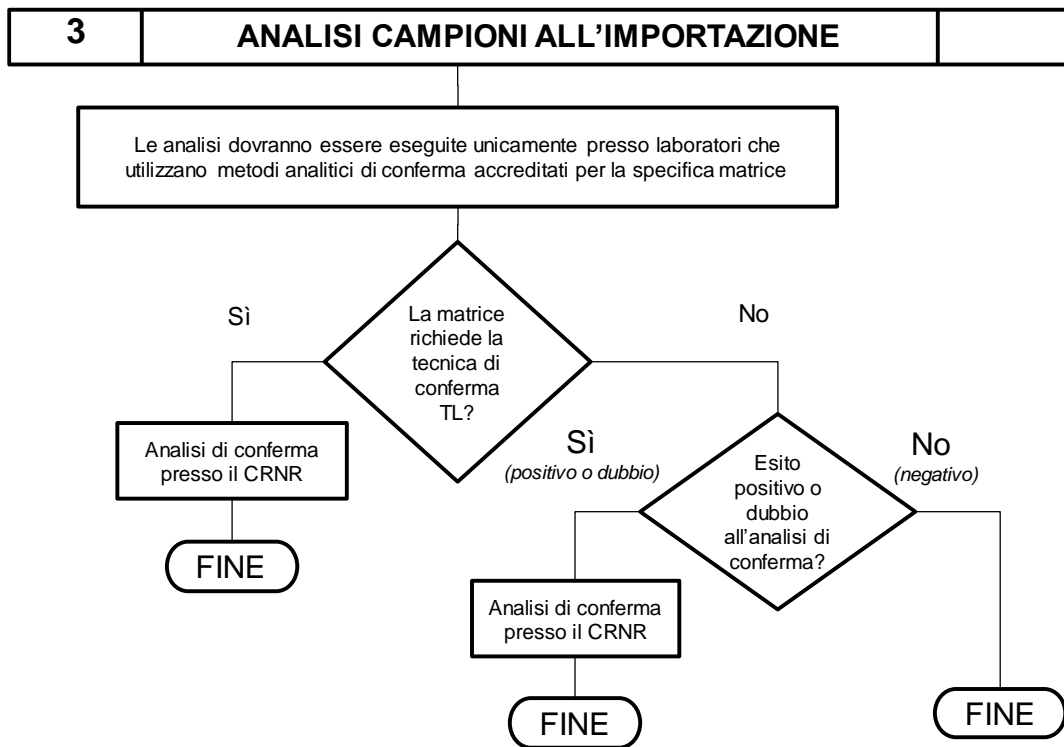


Figura 4. Piano nazionale di controllo ufficiale sugli alimenti irradiati: Fase 3 - Analisi di campioni prelevati all'importazione

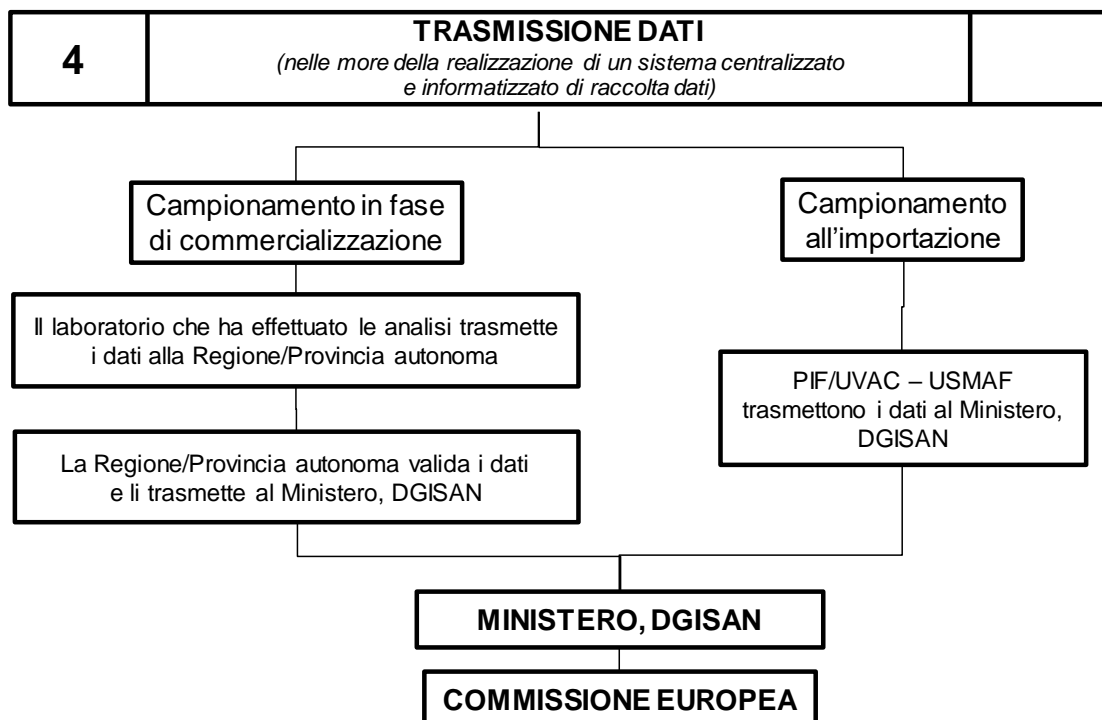


Figura 5. Piano nazionale di controllo ufficiale sugli alimenti irradiati: Fase 4 - Trasmissione dati

Dal 2010 al 2015 è stata rilevata una “crescente partecipazione” regionale/provinciale alle attività di controllo ufficiale per i prodotti alimentari irradiati, facendo registrare nell’ultimo triennio un numero cospicuo di campioni analizzati (circa 550 campioni/anno) e collocando l’Italia tra i principali Paesi che forniscono dati analitici alla Commissione europea in materia di controllo degli alimenti irradiati (Figura 6).

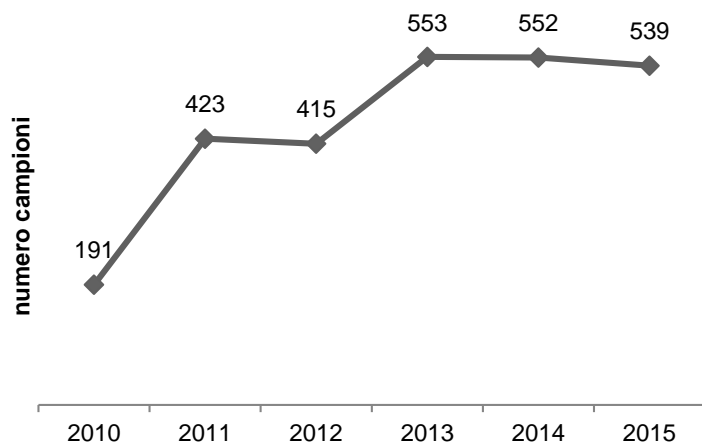


Figura 6. Campioni analizzati in Italia dal 2010 al 2015 nella fase precedente al Piano nazionale di controllo ufficiale sugli alimenti irradiati

Nel 2015, primo anno di adozione del Piano, è stata rilevata la piena partecipazione sull’intero territorio alle attività di controllo ufficiale sugli alimenti e loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti.

METODI BASATI SULLA RISONANZA DI SPIN ELETTRONICO

Emanuela Bortolin, Maria Cristina Quattrini, Sara Della Monaca
 Servizio Grandi Strumentazioni e Core Facilities, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Nelle matrici alimentari la radiazione ionizzante produce radicali liberi che possono essere rivelati attraverso la tecnica della risonanza di spin elettronico (*Electron Spin Resonance*, ESR) e utilizzati come marcatori per l'identificazione degli alimenti irradiati. Sfortunatamente, però, nella maggior parte dei casi la vita media dei radicali prodotti è brevissima, dell'ordine di 10^{-12} s, a causa dell'elevato contenuto di acqua presente negli alimenti. Nelle matrici cristalline quali osso, lische di pesce, frutta secca o parti legnose, tuttavia, i radicali prodotti rimangono sufficientemente stabili rendendo possibile l'identificazione dell'irraggiamento.

I metodi basati sull'utilizzo della tecnica della risonanza di spin elettronico, approvati a livello europeo dal CEN (*Comité Européen de Normalisation*) e recepiti dall'Ente Nazionale Italiano di Unificazione, UNI, indicati per l'identificazione dell'irraggiamento nelle matrici del "Piano nazionale di controllo ufficiale sugli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti", sono i seguenti:

- EN 1786:1997 Ricerca di alimenti irraggiati contenenti ossa. Metodo per spettroscopia di risonanza elettronica di spin (ESR);
- EN 1787:2000 Ricerca di alimenti irraggiati contenenti cellulosa mediante spettroscopia di risonanza elettronica di spin (ESR);
- EN 13708:2002 Ricerca di alimenti irraggiati contenenti zucchero cristallino mediante spettroscopia di risonanza elettronica di spin (ESR).

Risonanza di spin elettronico

La tecnica della risonanza di spin elettronico o tecnica ESR è in grado di rivelare specie chimiche con elettroni non accoppiati (es. radicali liberi) immerse in un campo magnetico. In Figura 1 è riportata una descrizione schematica della tecnica.

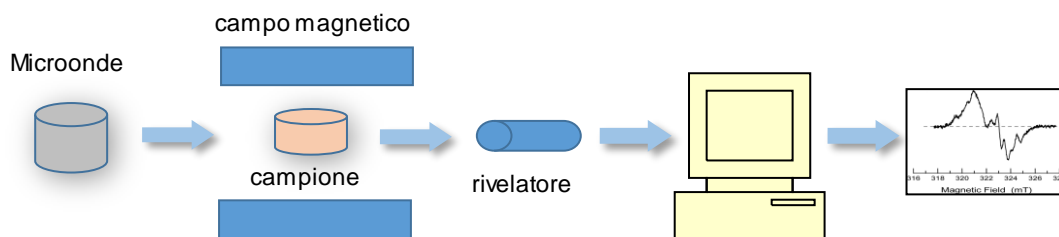


Figura 1. Rappresentazione schematica di un esperimento di risonanza di spin elettronico

Gli elettroni non accoppiati, presenti nel campione posto all'interno del campo magnetico, assorbono energia elettromagnetica da una radiazione incidente (microonde) producendo uno spettro di assorbimento caratteristico della specie chimica esaminata. Il fenomeno è rappresentato in modo semplificato in Figura 2, dove gli elettroni non accoppiati sono considerati, per maggiore chiarezza, liberi da interazioni reciproche e con i nuclei: in queste condizioni ad essi sono associati solo momenti magnetici di spin (rappresentati con frecce nella figura) dovuti alle correnti prodotte dai movimenti di rotazione degli elettroni intorno ai propri assi. In assenza di campo magnetico esterno i momenti magnetici di spin sono orientati in modo casuale e gli elettroni possiedono tutti la stessa energia E_0 .

La presenza di un campo magnetico \mathbf{H} provoca l'allineamento del momento magnetico nella direzione del campo e un incremento dell'energia dell'elettrone della quantità $1/2 g\beta H$, che cresce all'aumentare dell'intensità del campo \mathbf{H} ed è positiva o negativa a seconda del verso dello spin, concorde o discorde con il campo \mathbf{H} rispettivamente. In queste condizioni, fornendo al sistema l'energia elettromagnetica necessaria è possibile indurre la transizione di un elettrone dal livello energetico E_1 al livello energetico E_2 . La transizione avviene quando l'energia elettromagnetica di eccitazione, $h\nu$, è pari alla differenza in energia, $g\beta H$, tra i due livelli, ossia quando si realizza quella che viene definita la "condizione di risonanza":

$$h\nu = g\beta H$$

dove g è il fattore di Landè dell'elettrone libero (2,0023), β è il magnetone di Bohr, h è la costante di Planck, ν è la frequenza della radiazione elettromagnetica di eccitazione.

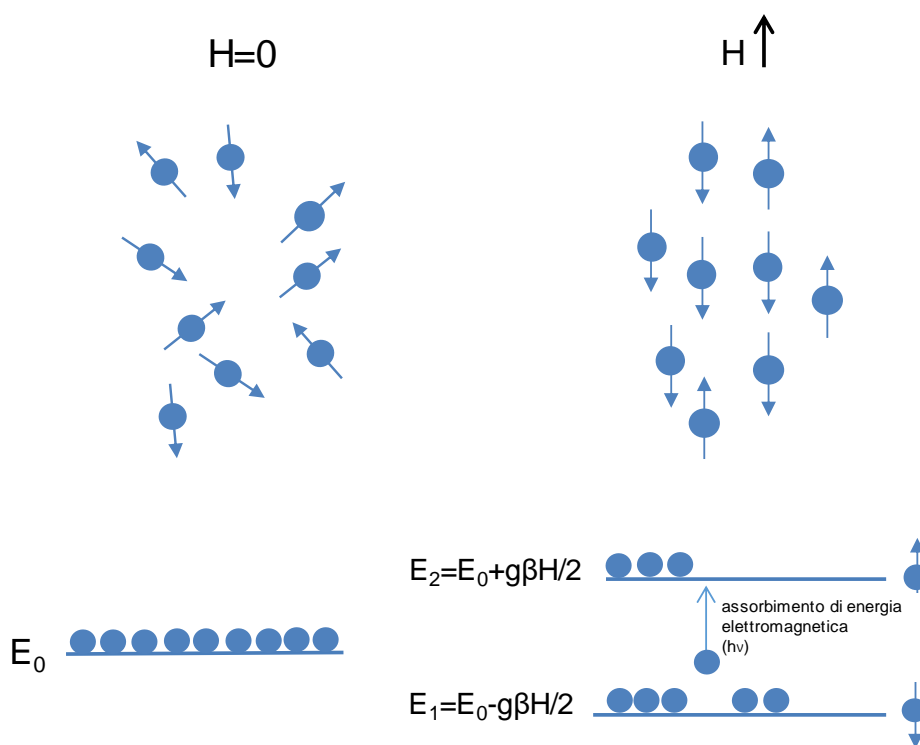


Figura 2. Descrizione schematica del fenomeno fisico alla base della tecnica ESR. L'assorbimento avviene quando l'energia elettromagnetica di eccitazione $h\nu$ è pari alla differenza in energia, $g\beta H$, tra i due livelli (E_1 ed E_2), generati dal campo magnetico esterno, ossia quando si realizza quella che viene definita la "condizione di risonanza" $h\nu = g\beta H$

Partendo dalla condizione di risonanza si possono immaginare due diversi metodi di misura: si può pensare di fissare il campo magnetico H e variare la frequenza ν o viceversa. Nel primo caso si mantiene costante la separazione fra i livelli energetici e si varia la frequenza della radiazione incidente fino a raggiungere la condizione di risonanza. Nel secondo caso si fissa la frequenza e si modifica la spaziatura fra i livelli variando l'intensità del campo magnetico. Nella maggior parte delle tecniche spettroscopiche si utilizzano campi elettromagnetici a frequenza variabile dato che i livelli energetici, di solito, non possono essere modificati. Nel caso della tecnica ESR, per ragioni pratiche, si preferisce seguire il secondo tipo di approccio. Con la tecnica ESR si espone, quindi, il campione a una radiazione di frequenza opportuna e si esegue una scansione di campo magnetico sino a raggiungere un valore tale da ottenere la condizione di risonanza. Pertanto gli spettri ESR sono riportati in funzione dell'intensità del campo magnetico esterno (Figura 3).

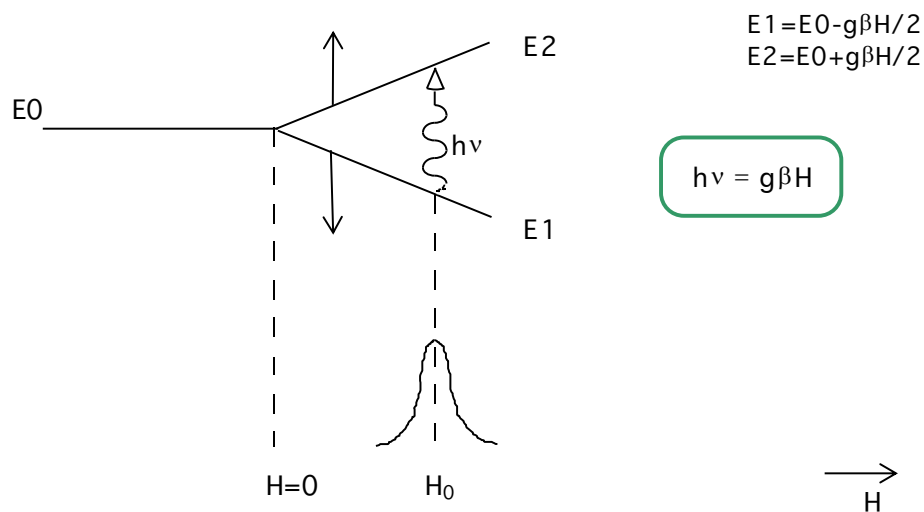


Figura 3. Assorbimento risonante di energia elettromagnetica (microonde) da parte di elettroni non accoppiati immersi in un campo magnetico

Sebbene siano possibili, in linea di principio, infinite scelte per la frequenza ν e per il campo magnetico H che soddisfino la condizione di risonanza, in pratica si preferisce lavorare ad alte frequenze (microonde) per avere una maggiore sensibilità; la differenza fra le popolazioni dei due livelli energetici, dalla quale dipende il numero delle transizioni indotte dalla radiazione incidente e, quindi, l'assorbimento, cresce, infatti, linearmente (in prima approssimazione) all'aumentare della separazione energetica tra i due livelli e quindi, come conseguenza della condizione di risonanza, della frequenza della radiazione incidente.

Il segnale ESR che si registra non ha la classica forma dei segnali di assorbimento (gaussiana o lorentziana), ma ne è la derivata prima e ha la forma di una curva bifasica del tipo di quelle mostrate in Figura 4 (in basso). Questa forma è prodotta da un particolare accorgimento tecnico per la rivelazione, detto "a sensibilità di fase", utile a ridurre il livello di rumore elettronico. Infatti, anche a frequenze elevate come quelle delle microonde che si usano normalmente ($\nu = 10^{10} \text{ s}^{-1}$), la sensibilità del sistema è piuttosto bassa. Allo scopo di aumentare la sensibilità della tecnica, gli spettrometri ESR utilizzano una modulazione con una frequenza dell'ordine dei 100 kHz del campo magnetico statico applicato e una rivelazione a sensibilità di fase che consente di rivelare solo i segnali, con frequenza pari a quella di modulazione, in fase con un opportuno segnale di

riferimento. In questo modo si ottengono segnali di assorbimento caratterizzati da un rapporto segnale-rumore che è ordini di grandezza superiore.

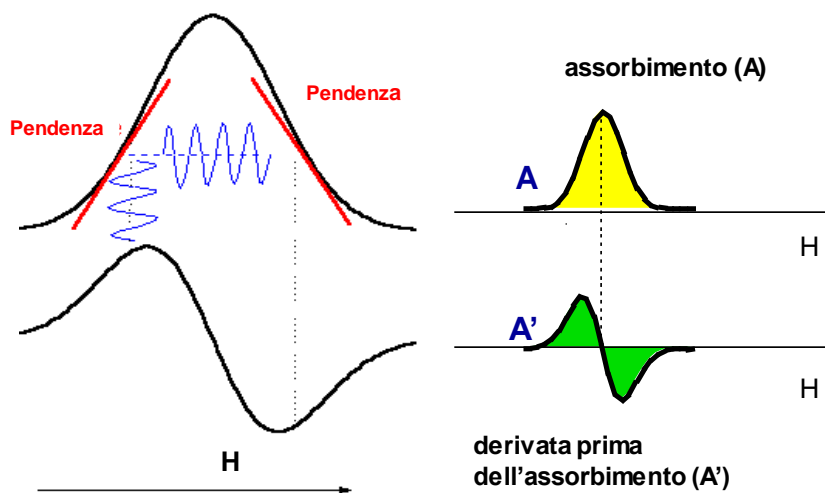


Figura 4. Modulazione del campo magnetico statico H. Se l'ampiezza della modulazione del campo H è piccola rispetto alla larghezza della curva di assorbimento (A) il valore ottenuto in uscita sarà proporzionale alla pendenza della curva e quindi alla derivata prima (A') rispetto ad H della curva A

Lo spettro ESR quasi mai è composto da un singolo segnale simmetrico (riga), ma è spesso estremamente complesso. Tale complessità è originata dalla presenza di altri spin (altri elettroni e nuclei a spin non nullo) in vicinanza dell'elettrone non accoppiato che si vuole esaminare, oltre che da possibili anisotropie del materiale. Il segnale ESR può avere per esempio una forma come quella di Figura 5.

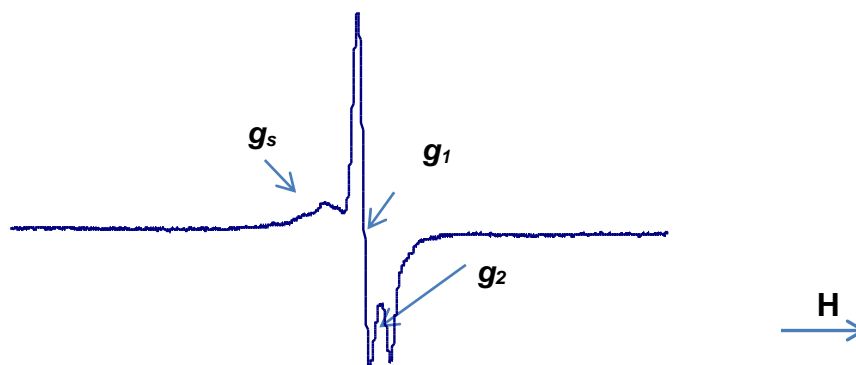


Figura 5. Spettro ESR di polvere di ossa di anatra irradiate (3 kGy). Nello spettro sono evidenti tre righe: la riga presente anche nelle ossa non irradiate (g_s) e le due righe (g_1 e g_2) dovuti al radicale $CO_2^{\cdot -}$ che si forma per irraggiamento nell'idrossiapatite

In questo caso, la molecola su cui si trova l'elettrone spaiato ha una simmetria assiale che si riflette nella forma di riga. In altri casi, lo spettro può essere composto da righe equidistanti e di uguale forma (Figura 6) che crescono tutte insieme al crescere della concentrazione dei radicali.

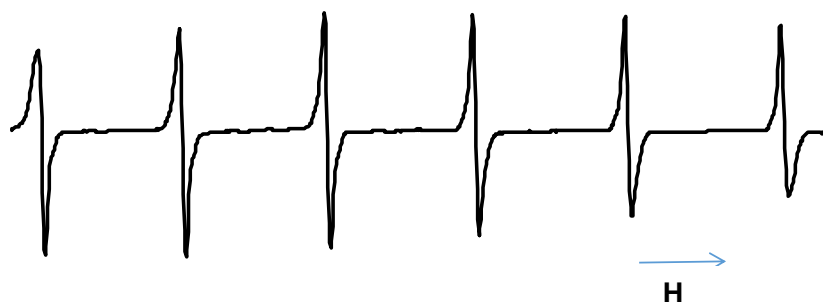


Figura 6. Spettro ESR dello ione manganese Mn^{2+} .
Le 6 righe sono dovute all'interazione iperfine con il nucleo di spin 5/2

Questo effetto è creato da campi locali permanenti che sono generati dai nuclei vicini con spin nucleare diverso da zero e la cui presenza non dipende dal campo magnetico esterno. La presenza di campi magnetici locali determina il verificarsi della condizione di risonanza in corrispondenza di valori diversi del campo H esterno. Il fattore g ($= h\nu/\beta H$), quindi, nei casi reali non è quello dell'elettrone libero, ma dipende dal campo magnetico locale che si aggiunge o si sottrae a quello esterno e può anche essere un tensore anisotropo. È d'uso identificare le risonanze attraverso il loro valore di g anche se gli spettri sono rappresentati in funzione del campo magnetico H , poiché g dipende soltanto dall'ambiente locale all'interno del materiale e non dalle condizioni di misura. Gli altri parametri che caratterizzano il segnale ESR sono: la larghezza di riga ΔH e l'ampiezza picco-picco, A .

Lo spettro che si registra è quindi caratteristico della struttura in cui si trovano gli elettroni non accoppiati (i centri paramagnetici) e può essere utilizzato per l'identificazione di una molecola o di un radicale.

Apparato strumentale e misura

Le parti essenziali di uno spettrometro ESR sono:

- magnete;
- sorgente a microonde;
- cavità risonante;
- sistema per la rivelazione del segnale.

Il campo magnetico statico è solitamente generato da un elettromagnete alimentato da una corrente che può variare linearmente in modo da ottenere una scansione del campo di ampiezza e velocità opportune. Se si utilizza, come avviene di solito, il metodo di rivelazione a "sensibilità di fase" la corrente di alimentazione deve essere anche modulata ad una frequenza specifica (50-100 kHz).

La sorgente è costituita, nella maggior parte degli apparati, da un diodo gunn che fornisce onde elettromagnetiche con lunghezze d'onda nella regione delle microonde. La potenza del fascio può essere regolata da un attenuatore che, generalmente, consente riduzioni da 0 a 60 dB.

La cavità risonante è essenzialmente, una porzione di guida d'onda, chiusa agli estremi, nella quale si crea un sistema di onde stazionarie. La frequenza di risonanza è determinata dalle dimensioni della cavità stessa.

Il rivelatore è rappresentato da un diodo al silicio collegato ad un amplificatore di basso rumore. Il diodo si comporta come un rettificatore di microonde che trasforma l'onda elettromagnetica incidente in un segnale elettrico di corrente. Poiché il campo magnetico, H , cui è sottoposto il campione, è modulato, anche il segnale di corrente rivelato risulta periodico con frequenza uguale a quella del campo modulante (50-100 kHz). Il segnale dal diodo, opportunamente filtrato e amplificato viene inviato insieme alla corrente di modulazione all'ingresso di un rivelatore di fase che fornisce in uscita un valore di tensione che dipende dall'ampiezza del segnale di corrente e dalla differenza di fase tra i due ingressi. Il metodo di rivelazione appena descritto, noto come "rivelazione a sensibilità di fase", presenta il vantaggio della riduzione del rumore di fondo che si traduce in una diminuzione della soglia di rivelazione e, di conseguenza, in un aumento della sensibilità. Il rivelatore a sensibilità di fase, infatti, trasferisce soltanto quelle componenti del segnale presente in ingresso che hanno frequenza pari a quella del segnale di riferimento (segnale di modulazione) e che presentano una determinata relazione di fase con tale segnale. Le componenti spurie, che possono avere frequenze diverse da quella di riferimento e cambiano molto rapidamente fase, vengono bloccate. L'azione di filtraggio si esplica così a due livelli: a livello della frequenza, perché viene trasmessa solo la frequenza fondamentale, e a livello della fase. Variando la costante di tempo del sistema si possono ottenere bande passanti molto strette che consentono di aumentare notevolmente la precisione di misura.

Esistono in commercio, forniti da varie ditte, diversi tipi di spettrometri con dimensioni, costi e prestazioni diversi. Sono disponibili anche apparati appositamente progettati e configurati per le analisi sugli alimenti irradiati. Si tratta di spettrometri dotati di magneti permanenti e tubi per l'inserimento dei campioni che possono contenere *marcatori standard* certificati specifici per la categoria di matrici da analizzare.

Per eseguire la misura il campione viene introdotto nella cavità risonante all'interno di appositi tubi in vetro o quarzo del diametro di qualche millimetro come quelli mostrati in Figura 7.



Figura 7. Tubi utilizzati per l'inserimento dei campioni nella cavità risonante

Gli spettri ESR dipendono fortemente dalle condizioni di misura adottate (ampiezza di modulazione e potenza effettiva del fascio a microonde, per esempio) e dalle caratteristiche del campione (presenza di acqua, tipo di specie paramagnetica, temperatura). Una scelta non opportuna dei parametri di registrazione può determinare distorsioni, anche notevoli, dei segnali esaltando alcune componenti ed escludendone altre. D'altra parte questa possibilità, offerta dalla tecnica ESR, di modificare le caratteristiche dello spettro fissando opportunamente le condizioni di registrazione può tornare utile in alcuni casi: quando ad esempio si studiano segnali parzialmente sovrapposti il fatto di poterne eliminare alcuni permette di discriminarli e di effettuare misure più accurate.

L'ampiezza di modulazione, H_m , deve essere mantenuta piccola rispetto alla larghezza di riga; soltanto in questo caso, infatti, lo spettro ottenuto corrisponde alla derivata prima della curva di assorbimento. Gli effetti di una sovr modulazione sono illustrati in Figura 8.

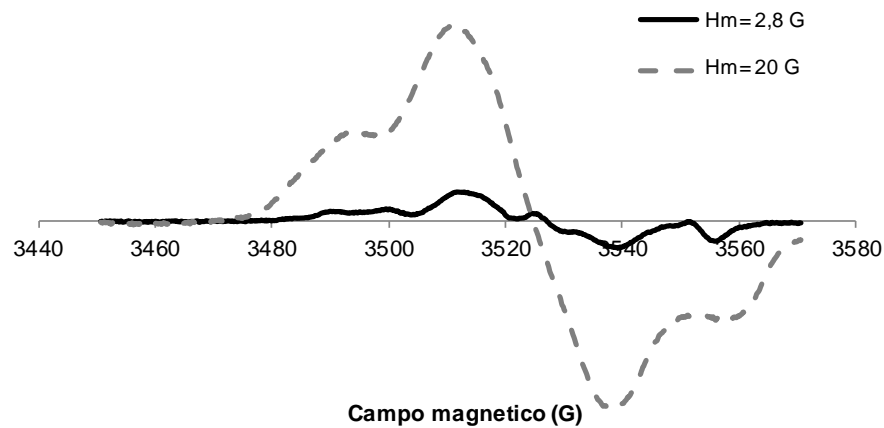


Figura 8. Segnale ESR indotto dalla radiazione ionizzante in un campione di uvetta registrato in diverse condizioni di modulazione del campo magnetico esterno H

Per piccoli valori dell'ampiezza di modulazione (molto minori dell'ampiezza di riga) la forma della curva rimane costante mentre l'ampiezza picco-picco cresce in maniera proporzionale all'ampiezza di modulazione; quando ci si avvicina all'ampiezza di riga l'ampiezza picco-picco diminuisce mentre aumenta la sua larghezza. Quindi la sovr modulazione determina una distorsione del segnale. In genere è opportuno scegliere il valore massimo dell'ampiezza di modulazione nell'intervallo di proporzionalità.

Per quanto riguarda la scelta della frequenza di modulazione, generalmente sarebbe preferibile lavorare ad alte frequenze. Infatti, sebbene la rivelazione a sensibilità di fase migliori il rapporto segnale-rumore, anche con questo metodo si ha comunque una componente spuria, non trascurabile, del segnale. Lo stesso rivelatore, infatti, genera rumore. Poiché tale contributo è all'incirca inversamente proporzionale alla frequenza di modulazione, l'uso di modulazioni ad alta frequenza ne consente la riduzione. La maggior parte degli spettrometri di piccola dimensione, come quelli utilizzati per la rivelazione degli alimenti irradiati, utilizzano 100 kHz.

Il sistema di rivelazione a sensibilità di fase agisce come un filtro passa-basso, a resistenza e capacità, estremamente sensibile e selettivo la cui larghezza di banda è determinata dalla costante di tempo $\tau = RC$. La costante di tempo, o tempo di risposta, è quindi una misura dell'incapacità del rivelatore a banda stretta di amplificare senza distorsione segnali che sono registrati in un tempo piccolo rispetto a τ . Affinché il segnale non venga distorto è necessario quindi che il tempo Δt impiegato dal campo di scansione per passare tra i due punti a mezza altezza del segnale sia dell'ordine di 10τ . Se questa condizione non è soddisfatta, allora la forma della riga registrata risulterà distorta. Poiché il rumore aumenta all'aumentare della costante di tempo, sperimentalmente è conveniente, per prima cosa, scegliere la costante di tempo in maniera da rendere massimo il rapporto segnale-rumore e in secondo luogo scegliere la velocità di scansione del campo magnetico in modo che la condizione $\Delta t = 10 \tau$ sia soddisfatta.

La potenza del fascio di microonde incidente sul campione caratterizza il flusso di energia dalla radiazione al sistema di spin. Finché la potenza si mantiene bassa, l'energia fluisce in modo efficiente dal sistema di spin all'ambiente circostante, gli spin si liberano velocemente dell'energia acquisita dal campo elettromagnetico e la differenza tra le popolazioni dei due livelli del sistema rimane pressoché costante. In questo caso, all'aumento della potenza incidente, corrisponde un aumento della potenza assorbita e, quindi, dell'ampiezza del segnale. In questa fase l'ampiezza ESR del segnale aumenta proporzionalmente alla radice quadrata della potenza

incidente. Man mano che la potenza cresce, il sistema non è più in grado di “smaltire” l’energia in eccesso; in queste condizioni gli spin non accoppiati non rispondono più in modo efficiente e tempestivo alle sollecitazioni esterne e il sistema entra in “saturazione”. In questa fase, l’ampiezza ESR del segnale, raggiunto il massimo, decresce e tende a zero per valori elevati della potenza.

È possibile valutare il fattore g di un segnale inserendo in cavità, insieme al campione, una sostanza (marcatore) caratterizzata da un segnale ESR di cui è noto il valore del fattore g (g_M).

Si utilizza la relazione:

$$g = g_M H_M / H_g$$

H_M è il valore di campo magnetico corrispondente al segnale del marcatore.

H_g è il valore di campo magnetico corrispondente al segnale incognito.

Metodo UNI EN 1786

Il metodo si basa sulla rivelazione, con tecnica ESR, dei radicali radioindotti nelle ossa. I frammenti ossei provenienti da carni irradiate danno luogo, infatti, ad un *segnale anisotropo* complesso, composto da una prima riga stretta (ca. 0,3 mT) con $g_1 \approx 2,002$ e una seconda riga di larghezza analoga (ca. 0,3 mT) con $g_2 \approx 1,998$, attribuito al radicale anione (CO_2^-) radioindotto nell’idrossiapatite. I frammenti di ossa provenienti da carni non irradiate, invece, mostrano un debole segnale ESR consistente in una sola riga simmetrica con $g_s \approx 2,005$. La riga con $g_s \approx 2,005$ è molto larga (da 0,8 a 1,0 mT) e la sua intensità può variare sensibilmente con la matrice in esame. Tale riga viene comunemente attribuita a specie radicaliche presenti nei residui organici ed è spesso visibile anche nei campioni di ossa prelevate da carni irradiate. La Figura 9 mostra gli spettri registrati con campioni di ossa prelevate da carni non irradiate e irradiate alla dose di 3 kGy.

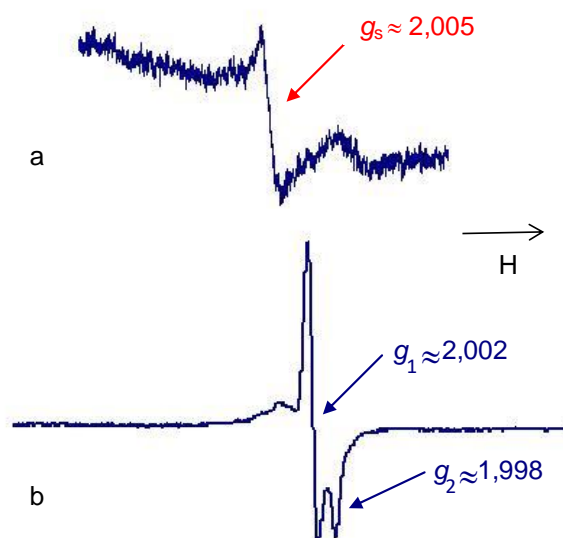


Figura 9. Spettro ESR di polvere di ossa di anatra non irradiata (a) e irradiata alla dose di 3 kGy (b)

Il metodo UNI EN 1786 è stato validato, attraverso test di validazione internazionali, per manzo, pollo e trota. Ci sono evidenze sperimentali, tuttavia, che indicano che il metodo può essere applicato anche ad altre matrici di carni e pesci contenenti ossa o lisce. A livello nazionale nell’ambito dei programmi di ricerca finalizzata è stata verificata la possibilità di estendere il metodo

ad altre matrici quali: anatra, coniglio, equino, maiale, ovino e tacchino. L'intensità dei segnali ESR delle ossa irradiate non subisce variazioni significative per diversi mesi e i campioni rimangono identificabili per tutto l'arco dell'ipotetica durata di conservazione dei prodotti. Matrici con scarsa mineralizzazione possono presentare segnali ESR più deboli senza però causare problemi per la loro corretta identificazione qualitativa che è di fatto basata sulla morfologia dei segnali. I risultati della ricerca hanno anche indicato che i segnali ESR non sono significativamente influenzati dal riscaldamento del campione (es. la bollitura in acqua) e dal processo di congelamento.

Applicazione alle matrici del Piano

Le matrici di origine animale previste dal Piano sono: *seppie con osso, cosce di rana con ossa, pesci con lisca, pollame con ossa*. Nei paragrafi seguenti vengono riportate indicazioni sull'applicazione del protocollo a queste matrici.

Matrici animali

Preparazione del campione

Procedere alla rimozione della parte edibile e del midollo osseo servendosi ad esempio di coltelli o bisturi di opportuna dimensione e forma. Frantumare grossolanamente le ossa o le lisce così ripulite (anche con l'uso di morsa e pinze) e in seguito lavarle più volte in acqua sotto vigorosa agitazione fino a che l'acqua di risciacquo resti incolore e sia priva di particolato in sospensione. Nel caso di matrici con una componente lipidica particolarmente elevata, può essere conveniente trattare i frammenti ossei con solventi organici (etanolo) (Figura 10).

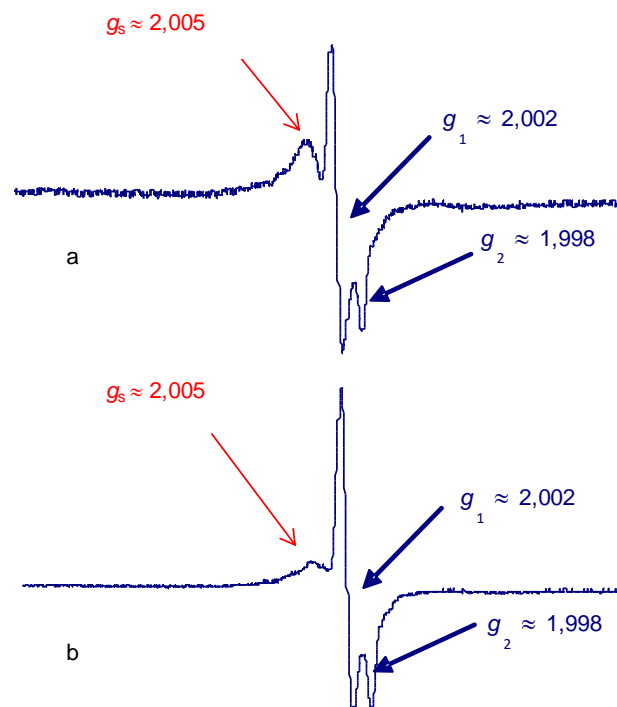


Figura 10. OSSA DI ANATRA IRRADIATE: spettri ESR di polvere non trattata (a) e trattata con etanolo (b); il segnale di origine organica $g_s=2,005$ appare notevolmente ridotto dopo il trattamento con etanolo

Essiccare il materiale osseo così trattato mantenendolo ad una temperatura inferiore a 50°C ed eventualmente polverizzarlo prima di inserirlo (circa 100-200 mg) nel tubo di misura.

Registrazione dello spettro ESR

Si registra lo spettro ESR del campione, per esempio, nelle seguenti condizioni strumentali, utilizzando un marcatore per il calcolo dei valori di g :

Frequenza	ca. 9,7 GHz (banda X)
Campo centrale	ca. 342 mT
Intervallo di scansione	5-20 mT
Ampiezza di modulazione	0,2-0,4 mT
Potenza microonde	5-12,5 mW
Costante di tempo	50-200 ms
Velocità di scansione	2,5-10 mT/min

Valutazione dei risultati

La valutazione dei risultati è basata sui dati ottenuti nel corso di test di validazione internazionali e nazionali e su dati di letteratura.

Per la valutazione dei risultati delle analisi e la classificazione dei campioni, facendo riferimento alla Figura 9, si utilizza lo schema decisionale della Tabella 1.

Tabella 1. Metodo UNI EN 1786: schema decisionale applicato alle matrici indicate nel Piano

Matrice	Segnale simmetrico $g_s=2,005$	Segnale anisotropo $g_1=2,002$ $g_2=1,998$	Risultato	Esito
Seppie con osso, cosce di rana con ossa, pesci con lisca, pollame con ossa	presente	assente	negativo	non irradiato
	assente	presente	positivo	irradiato

Il metodo UNI EN 1786 applicato alle matrici indicate nel Piano è affidabile e non richiede ulteriori indagini. Il risultato analitico, positivo o negativo, è sempre valido e non richiede conferma.

Metodo UNI EN 1787

Il metodo si basa sulla rivelazione, con tecnica ESR, dei radicali radioindotti nella cellulosa contenuta negli alimenti di origine vegetale.

In generale, da campioni non irradiati si ottiene un segnale simmetrico. Nei campioni trattati con radiazioni ionizzanti si nota invece un aumento del segnale simmetrico e la comparsa di due righe (picchi laterali o satelliti) di risonanza, alla sinistra e alla destra del segnale principale, distanti fra loro circa 6 mT. La Figura 11 mostra due esempi di spettri registrati con gusci di nocciole non irradiate (in alto) e irradiate (in basso). Il metodo UNI EN 1787 è stato validato, attraverso test ciechi, condotti a livello internazionale, per paprika, fragole e pistacchi. Ci sono evidenze sperimentali, tuttavia, che indicano che il metodo può essere applicato anche ad altre matrici vegetali quali: erbe e spezie in genere, frutti di bosco e frutta a guscio. A livello nazionale nell'ambito dei programmi di ricerca finalizzata finanziati dal Ministero della Salute è stata verificata la possibilità di estendere il metodo anche ad arachidi, mandorle, mirtilli, noci, nocciole e alcuni ingredienti per integratori a base di piante.



Figura 11. Esempi di spettri ESR di nocciole non irradiate (a) e irradiate alla dose di circa 6 kGy (b) (le frecce indicano i picchi satelliti distanti circa 6 mT)

La stabilità dei radicali radioindotti dipende molto dalle condizioni (umidità e temperatura) di conservazione e, in alcuni casi, la loro sopravvivenza può essere inferiore alla durata di conservazione del prodotto.

Applicazione alle matrici del Piano

Le matrici di origine non animale previste dal Piano Nazionale che possono essere analizzate con il metodo UNI EN 1787 sono: *erbe, spezie e ingredienti per integratori (esclusi gli estratti vegetali), frutta fresca (fragole, mirtilli, ribes, more, papaya, avocado, mango), frutta a guscio (noci, nocciole, pistacchi, mandorle, arachidi e castagne), funghi essiccati.*

Nei paragrafi seguenti vengono riportate indicazioni sull'applicazione del metodo a queste matrici.

Matrici non animali

Erbe, spezie e ingredienti per integratori (esclusi gli estratti vegetali)

Preparazione del campione

Prodotti in foglie: ridurre le foglie a dimensioni adatte all'inserimento nei tubi ESR mediante l'utilizzo di mortaio e pestello.

Prodotti in bacche: ridurre le bacche a dimensioni adatte all'inserimento nei tubi ESR, mediante l'utilizzo di un bisturi.

Prodotti in semi: generalmente non è necessario effettuare alcun trattamento, tuttavia in alcuni casi (soia) è necessario asportare la cuticola mediante l'utilizzo di un bisturi.

Prodotti in frutti: generalmente non è necessario effettuare alcun trattamento.

In generale, utilizzare circa 100 mg di prodotto o una quantità sufficiente a riempire la regione di sensibilità della cavità di risonanza. Porre in stufa a circa 45°C per circa un'ora.

Registrazione dello spettro ESR

Registrazione lo spettro ESR del campione, per esempio, nelle seguenti condizioni strumentali, senza utilizzare marcatori per la valutazione del fattore g. Di seguito i parametri di registrazione consigliati:

- Frequenza ca. 9,7 GHz (banda X)
- Campo centrale ca. 348 mT
- Intervallo di scansione ca. 20 mT
- Ampiezza di modulazione 0,4-1,0 mT
- Potenza microonde 0,4-0,8 mW
- Costante di tempo 100-200 ms
- Velocità di scansione 5-10 mT/min

Valutazione dei risultati

Dall'esame della letteratura e sulla base dei risultati dei test di validazione internazionali e nazionali, gli spettri ESR di queste matrici appaiono spesso complessi e di difficile interpretazione, caratterizzati dalla sovrapposizione di segnali dovuti a radicali/centri paramagnetici diversi (Figura 12). Inoltre, la stabilità dei radicali radioindotti dipende molto dalle condizioni (umidità e temperatura) di conservazione e, in alcuni casi, la loro sopravvivenza può essere inferiore alla durata di conservazione del prodotto. Quindi il campione può essere correttamente identificato solo nel caso in cui si possano individuare chiaramente, come nella Figura 11, i picchi satelliti alla sinistra e alla destra del picco centrale, distanti circa 6 mT e tipici della cellulosa irradiata. In questo caso si parla di *risultato positivo* e il campione risulta *irradiato*.

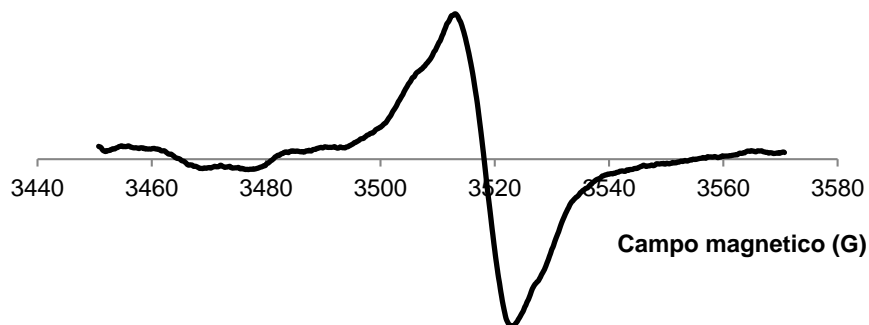


Figura 12. GINGKO BILOBA: spettro ESR di un campione di foglie irradiato alla dose di 5 kGy. Nello spettro la presenza di diversi segnali sovrapposti non consente l'individuazione dei picchi laterali del segnale della cellulosa irradiata

In tutti gli altri casi (picchi satelliti ad una distanza diversa da circa 6 mT, spettro complesso e di difficile interpretazione, assenza di picchi satelliti), il risultato è *negativo* ma non permette di identificare il campione come non irradiato e *l'analisi deve essere ripetuta con un altro dei metodi riportati nel Piano*. Per la valutazione dei risultati delle analisi e la classificazione dei campioni si utilizza lo schema decisionale della Tabella 2.

Tabella 2. Metodo UNI EN 1787: schema decisionale applicato a erbe, spezie e ingredienti per integratori

Matrice	Picchi satelliti distanti ≈ 6 mT	Risultato	Esito	Azioni
Erbe, spezie e ingredienti per integratori (esclusi gli estratti vegetali)	assenti	negativo	indeterminato	ripetere l'analisi con un altro dei metodi indicati nel Piano
	presenti	positivo	irradiato	nessuna

Il metodo UNI EN 1787 applicato a erbe, spezie e ingredienti per integratori è affidabile solo quando il risultato è positivo.

Frutta fresca: fragole, mirtilli, ribes, more, papaya, avocado, mango

Preparazione del campione

Separare i semi o le parti legnose dalla polpa. Nel caso dei frutti di bosco (fragole, ribes, more e mirtilli) trattare i frutti con un omogeneizzatore a lame e proseguire aggiungendo circa 500 mL di acqua mescolando accuratamente. Lasciare sedimentare i semi o le parti legnose sul fondo ed eliminare l'acqua insieme alla polpa in superficie. Ripetere questa procedura una o più volte in modo da rimuovere tutta la polpa. Filtrare i semi e/o le parti legnose e porli su carta da filtro al fine di eliminare l'acqua. Asciugare in stufa a circa 45°C per un'ora circa. Inserire il campione (circa 100 mg) nel tubo ESR.

Registrazione dello spettro ESR

Registrare lo spettro ESR del campione nelle condizioni strumentali indicate per erbe, spezie e ingredienti per integratori.

Valutazione dei risultati

Dall'esame della letteratura e sulla base dei risultati dei test di validazione internazionali e nazionali, gli spettri ESR di queste matrici appaiono spesso complessi, caratterizzati dalla sovrapposizione di segnali dovuti a radicali/centri paramagnetici diversi e quindi di difficile interpretazione (Figura 13).

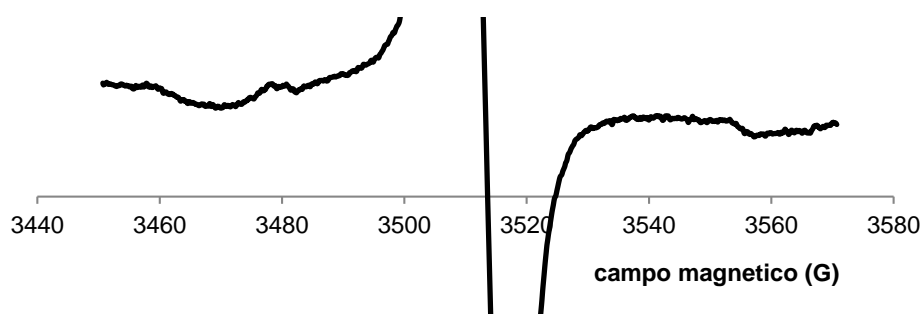


Figura 13. MIRTILLI FRESCHI: spettro ESR di un campione irradiato alla dose di 0,15 kGy. I picchi laterali identificabili non presentano la corretta separazione

Inoltre, la stabilità dei radicali radioindotti dipende molto dalle condizioni (umidità e temperatura) di conservazione e, in alcuni casi la loro sopravvivenza può essere inferiore alla durata di conservazione del prodotto. Sulla base dei dati a disposizione, inclusi quelli ottenuti nell'ambito di progetti di ricerca finalizzata, il segnale radioindotto in mirtilli e fragole, in condizioni normali di conservazione, risulta visibile per periodi di tempo sufficienti a coprire l'intera durata di conservazione del prodotto solo per dosi di trattamento superiori o uguali a 1 kGy. Quindi il campione può essere correttamente identificato solo nel caso in cui si possano individuare chiaramente, come nella Figura 11 i picchi satelliti alla sinistra e alla destra del picco centrale, distanti circa 6 mT e tipici della cellulosa irradiata. In questo caso si parla di *risultato positivo* e il campione è identificato come *irradiato*. In tutti gli altri casi (picchi satelliti ad una distanza diversa da circa 6 mT, spettro complesso di difficile interpretazione, assenza di picchi satelliti), il risultato è *negativo* ma non permette di identificare il campione come non irradiato e *l'analisi deve essere ripetuta con un altro dei metodi riportati nel Piano*.

Per la valutazione dei risultati delle analisi e la classificazione dei campioni si utilizza lo schema decisionale della Tabella 3.

Tabella 3. Metodo UNI EN 1787: schema decisionale applicato alla frutta fresca indicata nel Piano

Matrice	Picchi satelliti distanti \approx 6 mT	Risultato	Esito	Azioni
Fragole, mirtilli, ribes, more, papaya, avocado, mango	assenti	negativo	indeterminato	ripetere l'analisi con un altro dei metodi indicati nel Piano
	presenti	positivo	irradiato	nessuna

Il metodo UNI EN 1787 applicato alla frutta fresca indicata nel Piano è affidabile solo quando il risultato è positivo.

Frutta a guscio: noci, nocciole, mandorle, arachidi, pistacchi, castagne

Preparazione del campione

Ridurre il guscio del campione (circa 50-100 mg) in frammenti di dimensioni opportune per essere inseriti all'interno dei tubi ESR usando per esempio tenaglie o forbici (o un mulino elettrico). Porre in stufa a circa 45°C per circa un'ora.

Registrazione dello spettro ESR

Registrare lo spettro ESR del campione nelle condizioni strumentali indicate per erbe, spezie e ingredienti per integratori.

Valutazione dei risultati

Dall'esame della letteratura e sulla base dei risultati dei test di validazione internazionali e nazionali, il segnale ESR radioindotto (picchi satelliti) tipico della cellulosa irradiata nelle matrici quali noci, nocciole, pistacchi e mandorle, in condizioni normali di conservazione, risulta stabile e riconoscibile per periodi di tempo sufficienti a coprire l'intera durata di conservazione del prodotto (Figure 14 e 15).

Per matrici quali arachidi e castagne vi sono limitazioni dovute alla stabilità del segnale radioindotto non visibile chiaramente per l'intera durata di conservazione.

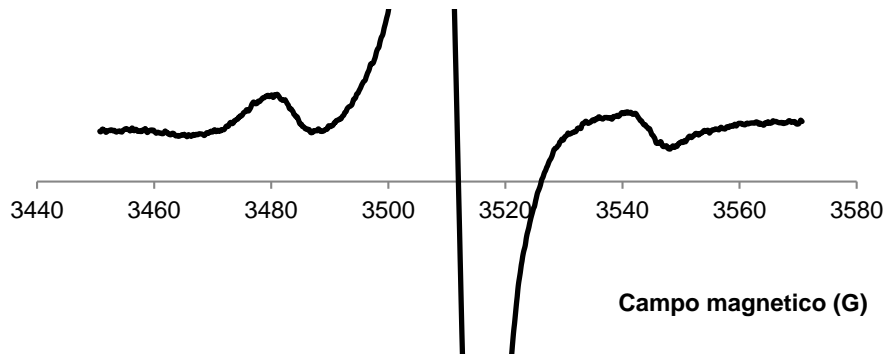


Figura 14. NOCI: spettro ESR di un campione irradiato alla dose di 5 kGy. I picchi laterali, distanti circa 6 mT e ben visibili, consentono di classificare il campione come irradiato

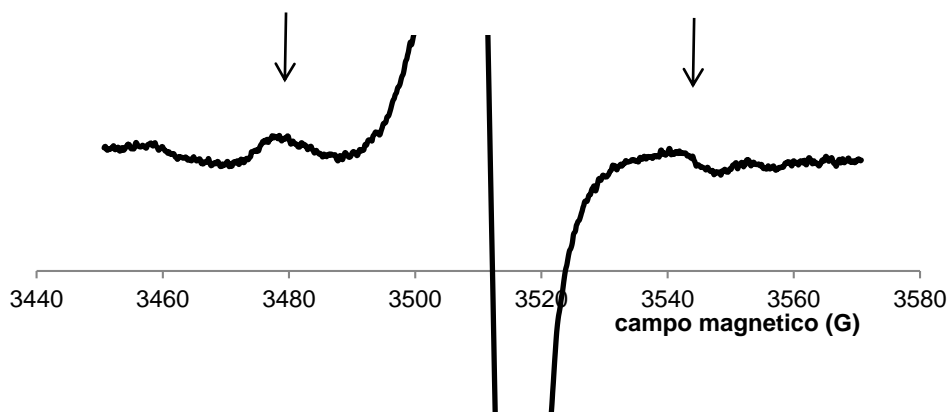


Figura 15. NOCI: spettro ESR di un campione irradiato alla dose di 5 kGy circa due anni prima dell'analisi. Nello spettro i picchi laterali sono ancora ben visibili e consentono di classificare il campione come irradiato

Sulla base di quanto riportato sopra, il metodo consente, nei limiti sopra specificati, la classificazione di frutta a guscio irradiata (non irradiata) sulla base della presenza (assenza) dei picchi satelliti alla sinistra e alla destra del picco centrale, distanti circa 6 mT, tipici della cellulosa irradiata. In presenza dei picchi satelliti alla sinistra e alla destra del picco centrale, distanti circa 6 mT il risultato è *positivo* e il campione è identificato come irradiato; in assenza dei picchi il risultato è *negativo* e il campione è identificato come non irradiato.

Per la valutazione dei risultati delle analisi e la classificazione dei campioni si utilizza lo schema decisionale della Tabella 4.

Tabella 4. Metodo UNI EN 1787: schema decisionale applicato alla frutta a guscio indicata nel Piano

Matrice	Picchi satelliti distanti \approx 6 mT	Risultato	Esito	Azioni
Noci, nocciole, pistacchi e mandorle	assenti	negativo	non irradiato	nessuna
	presenti	positivo	irradiato	nessuna
Arachidi e castagne	assenti	negativo	indeterminato	ripetere l'analisi con un altro dei metodi indicati nel Piano
	presenti	positivo	irradiato	nessuna

Il metodo UNI EN 1787 applicato a noci, nocciole, pistacchi e mandorle è affidabile e non richiede ulteriori indagini; il risultato analitico, positivo o negativo, è sempre valido.

Per arachidi e castagne il metodo è affidabile solo se il risultato è positivo, in caso contrario è richiesta l'applicazione di un altro dei metodi riportati nel Piano.

Funghi essiccati

Preparazione del campione

Ridurre i campioni (circa 100 mg) a dimensioni adatte all'inserimento nei tubi ESR. Porre il campione in stufa a circa 45°C per circa un'ora.

Registrazione dello spettro ESR

Registrare lo spettro ESR del campione nelle condizioni strumentali indicate per erbe, spezie e ingredienti per integratori.

Valutazione dei risultati

Sulla base dei dati riportati in letteratura e dei risultati dei test di validazione intralaboratorio, il segnale radioindotto tipico della cellulosa irradiata in queste matrici, in condizioni normali di conservazione, risulta stabile e riconoscibile per periodi di tempo sufficientemente lunghi (almeno un anno). Pertanto il metodo consente la classificazione di alimenti irradiati (non irradiati) sulla base della presenza (assenza) dei picchi satelliti alla sinistra e alla destra del picco centrale, distanti circa 6 mT, tipici della cellulosa irradiata. In presenza dei picchi satelliti alla sinistra e alla destra del picco centrale, distanti circa 6 mT il risultato è *positivo* e il campione è identificato come *irradiato*; in assenza dei picchi il risultato è *negativo* e il campione è identificato come *non irradiato*.

Per la valutazione dei risultati delle analisi e la classificazione dei campioni si utilizza lo schema decisionale della Tabella 5.

Tabella 5. Schema decisionale relativo al metodo UNI EN 1787 applicato ai funghi essiccati

Matrice	Picchi satelliti distanti \approx 6 mT	Risultato	Esito	Azioni
Funghi essiccati	assenti	negativo	non irradiato	nessuna
	presenti	positivo	irradiato	nessuna

Il metodo UNI EN 1787 applicato ai funghi essiccati è affidabile e non richiede ulteriori indagini. Il risultato analitico, positivo o negativo, è sempre valido.

Metodo UNI EN 13708

Il metodo si basa sulla rivelazione, con tecnica ESR, dei radicali radioindotti negli zuccheri presenti in forma cristallina nella matrice alimentare.

In generale da campioni non irradiati si ottengono spettri complessi di debole intensità con, generalmente, un segnale simmetrico di intensità maggiore.

I campioni irradiati presentano invece uno spettro multicomponente che può assumere forme e ampiezze diverse (7,4-7,8 mT per campioni di mango e papaya essiccati; 8,7-9,1 mT per fichi secchi e uvetta) a seconda del tipo di zuccheri presenti nella matrice e della loro struttura.

La Figura 16 mostra due esempi di spettri registrati con campioni di uvetta irradiata e non irradiata.

Il metodo UNI EN 13708 è stato validato, attraverso test di validazione internazionali, per uvetta, fichi, mango e papaya essiccati.

La rivelazione di segnali radioindotti nello spettro ESR di un campione di frutta secca dipende dalla quantità di zuccheri presenti in forma cristallina. Per le matrici di fichi secchi e uvetta, in condizioni normali di conservazione, i segnali radioindotti non si modificano in modo significativo nel tempo e risultano stabili e riconoscibili per l'intera durata di conservazione del prodotto. Nel caso di campioni monocristallini lo spettro ESR potrebbe dipendere dall'orientamento del campione in cavità, nella maggior parte dei casi, tuttavia, i microcristalli orientati a caso producono uno spettro del tipo di quello dei campioni in polvere.

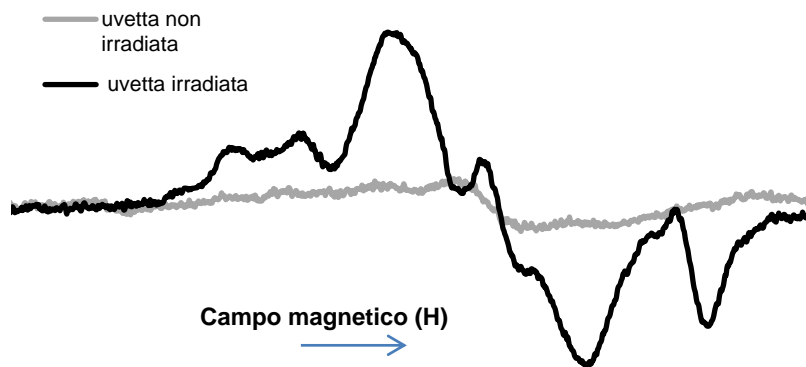


Figura 16. Esempi di spettri ESR di alimenti contenenti zuccheri in forma cristallina: uvetta non irradiata (linea grigia) e irradiata a circa 6 kGy (linea nera)

Applicazione alle matrici del Piano

Le matrici di origine non animale previste dal Piano sono: *fichi secchi e uvetta*. Nei paragrafi seguenti vengono riportate indicazioni sull'applicazione del protocollo a queste matrici.

Matrici non animali

Preparazione del campione

Ridurre il campione in piccoli frammenti di dimensioni tali da poter essere inseriti nei tubi. Utilizzare 50-100 mg di prodotto essiccato in stufa a circa 45°C per circa un'ora.

Registrazione dello spettro ESR

Si registra lo spettro ESR del campione, ad esempio, con le seguenti condizioni strumentali:

- Frequenza ca. 9,7 GHz (banda X)
- Campo centrale ca. 348 mT
- Intervallo di scansione 10-20 mT
- Ampiezza di modulazione 0,15-0,4 mT
- Potenza microonde ca. 5 mW
- Costante di tempo 100-200 ms
- Velocità di scansione 5-10 mT/min

Valutazione dei risultati

La valutazione dei risultati è basata sui dati ottenuti nel corso di test di validazione internazionali e nazionali e su dati di letteratura. Per la classificazione dei campioni, facendo riferimento alla Figura 16, si utilizza lo schema decisionale della Tabella 6.

Tabella 6. Metodo UNI EN 13708: schema decisionale applicato alla frutta secca indicata nel Piano

Matrice	Segnale simmetrico	Segnale multicomponente ampiezza totale (8,7-9,1 mT)	Risultato	Esito
Fichi secchi, uvetta	presente	assente	negativo	non irradiato
	assente	presente	positivo	irradiato

Il metodo UNI EN 13708 applicato alla frutta secca indicata nel Piano è affidabile e non richiede ulteriori indagini. Il risultato analitico, positivo o negativo, è sempre valido e non richiede conferma.

Bibliografia di riferimento

- Ahn JJ, Akram K, Jo D, Kwon JH. Investigation of different factors affecting the electron spin resonance-based characterization of gamma-irradiated fresh, white and red ginseng. *Journal of Ginseng Research* 2012;36(3):308-12.
- Ahn JJ, Sanyal B, Akram K, Kwon JH. Alcoholic extraction enables EPR analysis to characterize radiation induced cellulosic signals in spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2014;62:11089-98.
- Ahn JJ, Shahbaz HM, Akram K, Kwak JY, Kwon JH. Improved electron spin resonance spectroscopy with different sample treatments to identify irradiated sprout seeds. *Food Analytical Methods* 2014;7(9):1874-80.
- Akram K, Ahn JJ, Kim GR, Kwon JH. Applicability of different analytical methods for the identification of γ -irradiated fresh mushrooms during storage. *Food Science and Biotechnology* 2012;21(2):573-9.
- Akram K, Ahn JJ, Kwon JH. Identification and characterization of gamma-irradiated dried lentinus edodes using ESR, SEM, and FTIR analyses. *Journal of Food Science* 2012;77(6):C690-C696.
- Alberti A, Chiaravalle E, Fuochi P, Macciantelli D, Mangiacotti M, Marchesani G, Plescia E. Irradiated bivalve mollusks: use of EPR spectroscopy for identification and dosimetry. *Radiation Physics and Chemistry* 2011;80:1363-70.
- Aleksieva K, Lagunov O, Dimov K, Yordanov ND. EPR study on non- and gamma-irradiated herbal pills. *Radiation Physics and Chemistry* 2011;80:767-77.

- Aleksieva KI, Dimov KG, Yordanov ND. Identification of gamma-irradiated fruit juices by EPR spectroscopy. *Radiation Physics and Chemistry* 2014;103:27-30.
- Aydaş C, Çam ST, Engin B, Polat M. The use of ESR spectroscopy for the identification and dose assessment of irradiated pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) from Turkey. *Radiation Effects and Defects in Solids: Incorporating Plasma Science and Plasma Technology* 2015;168 (3):212-23.
- Bercu V, Negut CD, Dului OG. Detection of irradiated frog (*Limnonectes macrodon*) leg bones by multifrequency EPR spectroscopy. *Food Chemistry* 2012; 135: 2313–2319.
- Bercu V, Negut CD, Dului OG. EPR studies of the free radical kinetics in γ -rays irradiated *Pleurotus ostreatus* oyster mushrooms. *Food Research International* 2011;44:1008-11.
- Bortolin E, Bustos Griffin E, Cruz-Zaragoza E, De Coste V, Onori S. Electron paramagnetic resonance detection of Mexican irradiated spices. *International Journal of Food Science and Technology* 2006;41:375-82.
- D'Oca MC, Bartolotta A. Evaluation of the original dose in irradiated dried fruit by EPR spectroscopy. *Radiation measurements* 2011;46:813-5.
- Della Monaca S, Fattibene P, Boniglia C, Gargiulo R, Bortolin E. Identification of irradiated oysters by EPR measurements on shells. *Radiation Measurements* 46 (2011) 816-821.
- Desrosiers MF, Yaczko DM, Basi A, McLaughlin WL. Interlaboratory trials of the EPR method for the detection of irradiated spices, nutshell and eggshell. In: McMurray CH, Stewart EM, Gray R, Pearce J (Ed.). *Detection methods for irradiated foods – Current status*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 1996. p. 108-18.
- Dului OG. Electron paramagnetic resonance identification of irradiated cuttlefish (*Sepia Officinalis* L.). *Applied radiation and Isotopes* 2000;52:1385-90.
- Gray R, Stevenson MH, Kilpatrick DJ. The effect of irradiation dose and age of the bird on the ESR signal in irradiated chicken drumstick. *Radiation Physics and Chemistry* 1990;35:284-7.
- Jo Y, Kyung HK, Park HJ, Kwon JH. Irradiated fruits can be identified by detecting radiation-induced markers with luminescence and ESR analyses for different trading fruits. *Applied Biological Chemistry* 2016;59:59-65.
- Kim BK, Ahn JJ, Shahbaz HM, Kim CT, Kwon JH. Effect of Drying Treatment on Physical Identification Characteristics of Irradiated Seasonings. *Food Analytical Methods* 2014;7(2):268-75.
- Kwon JH, Ahn JJ, Akram K, Son IJ, Lee SO. Characterization of radiation-induced luminescence properties and free radicals for the identification of different gamma-irradiated teas. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 2013;405:4225-34.
- Lea JS, Dodd NJF and Swallow AJA. Method of testing for irradiation of poultry. *International Journal of Food Science and Technology* 1988;23:625-32.
- MAFF validated methods for the analysis of foodstuffs, No. V28 Detection of meat containing bone. *Journal of the Association of Public Analysts* 1993;29:201-8.
- Maghraby A, Salama E, Sami A, Mansour A, El Sayed M. Identification and dosimetry of irradiated walnuts (*Juglans regia*) using EPR. *Radiation Effects and Defects in Solids: Incorporating Plasma Science and Plasma Technology* 2014;167(3):170-8.
- Mangiacotti M, Marchesani G, Floridi F, Siragusa G, Chiaravalle AE. Official checks by an accredited laboratory on irradiated foods at an Italian market. *Food Control* 2013;33:307-12.
- Marrone M, Carosielli L, Mangiacotti M, Chiaravalle E, Smaldone G, Anastasio A. Monitoring of irradiated food products marketed in Italy and evaluation of electron spin resonance signal sensitivity of experimentally irradiated fish scales. *Italian Journal of Food Safety* 2014;3:1602.
- Pawłowska-Góral K, Ramos P, Pilawa B, Kurzej E. Application of EPR spectroscopy to examination of the effect of sterilization process on free radicals in different herbs. *Food Biophysics* 2013;8:60-8.

- Raffi J, Agnel JP, Ahmed SH. Electron spin resonance identification of irradiated dates. *Food Technology* 1991;3/4:26-30.
- Raffi J, Agnel JP. Electron spin resonance identification of irradiated fruits. *Radiation Physics and Chemistry* 1989;34:891-4.
- Raffi J, Evans JC, Agnel JP, Rowlands CC and Lesgards G. ESR analysis of irradiated frogs' legs and fishes. *Applied radiation and Isotopes* 1989;40:1215-8.
- Raffi J, Stachowic W, Migdal W, Barabassy S, Kalman B, Yordanov N, Andrade E, Prost M and Callens F. Establishment of an eastern network of laboratories for identification of irradiated foodstuffs, final report of Copernicus Concerted Action CIPA-CT94-0134, CCE, March 1998.
- Raffi J, Stevenson MH, Kent M, Thiery JM, and Belliardo JJ. European inter-comparison on electron spin resonance identification of irradiated foodstuffs. *International Journal of Food Science and Technology* 1992;27:111-24.
- Raffi J. *Electron spin resonance intercomparison studies on irradiated foodstuffs*. BCR-Information. Luxembourg: Commission of the European Communities; 1992. (Report EUR/13630/en)
- Sanyal B, Ahn JJ, Maeng JH, Kyung HK, Lim HK, Sharma A and Kwon JH. An improved approach to identify irradiated spices using electronic nose, FTIR, and EPR spectroscopy. *Journal of Food Science* 2014;79(9):C1656-1664.
- Schreiber GA, Helle N, Schulzki G, Linke B, Spielberg A, Mager M, Bogl KW. Interlaboratory tests to identify irradiation treatment of various foodstuffs via gas chromatographic detection of hydrocarbons, ESR spectroscopy and TL analysis. In: McMurray CH, Stewart EM, Gray R, Pearce J (Ed.). *Detection methods for irradiated foods- Current status*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry; 1996. p. 98-107.
- Schreiber GA, Helle N, Schulzki G, Spielberg A, Linke B, Wagner U, Bogl KW. Intercomparisons to evaluate the suitability of gas chromatographic, electron spin resonance spectrometric and thermoluminescence methods to detect irradiated foods in routine control. *Radiation Physics and Chemistry* 1993;42:391-6.
- Scotter SL, Holley P, Wood R. Cooperative trial of methods of analysis to determine irradiation treatment of chicken sample: Initial trial. *International Journal of Food Science and Technology* 1990;25:512-8.
- Shahbaz HM, Akram K, Ahn J, Kwon J. Investigation of radiation-induced free radicals and luminescence properties in fresh pomegranate fruits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2013;61:4019-25.
- Stevenson MH, Gray R. An investigation into the effect of sample preparation methods on the resulting ESR signal from irradiated chicken bone. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1989;48:261-7.
- Stevenson MH, Gray R. Effect of irradiation dose, storage time and temperature on the ESR signal in irradiated chicken bone. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1989;48:269-74.
- Swartz HM, Bolton JR, Borg DC. *Biological applications of electron spin resonance*. New York London, Sidney, Toronto: JOHN Wiley & Sons; 1972.
- UNI EN 13708. *Ricerca di alimenti irraggiati contenenti zucchero cristallino mediante spettroscopia di risonanza elettronica di spin (ESR)*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2002.
- UNI EN 1786. *Ricerca di alimenti irraggiati contenenti ossa. Metodo per spettroscopia di risonanza elettronica di spin (ESR)*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 1997.
- UNI EN 1787. *Ricerca di alimenti irraggiati contenenti cellulosa mediante spettroscopia di risonanza elettronica di spin (ESR)*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2000.
- Yamaoki R, Kimura S, Ohta M. Evaluation of absorbed dose in irradiated sugar-containing plant material (peony roots) by an ESR method. *Radiation Physics and Chemistry* 2015;117:41-7.
- Yordanov, ND, Lagunov, O, Dimov, K. EPR spectra induced by gamma-irradiation of some dry medical herbs. *Radiation Physics and Chemistry* 2009;78:277-80.

METODI BASATI SULLA LUMINESCENZA STIMOLATA

Emanuela Bortolin (a), Raffaella Gargiulo (b), Maria Cristina Quattrini (a), Concetta Boniglia (b)

(a) Servizio Grandi Strumentazioni e Core Facilities, Istituto Superiore di Sanità

(b) Dipartimento Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'utilizzo delle tecniche di luminescenza stimolata per l'identificazione degli alimenti irradiati è possibile grazie alla presenza negli alimenti di particolato minerale costituito da: silicati che contaminano i prodotti dell'agricoltura esposti all'aria, materiali inorganici come la calcite derivante dal guscio o dall'esoscheletro di molluschi e crostacei e idrossiapatite che deriva da ossa e denti. Questi minerali, infatti, se precedentemente irradiati, ad esempio durante il trattamento degli alimenti con radiazioni ionizzanti (raggi X, raggi γ o elettroni), emettono luce in seguito a stimolazione ottica (luminescenza fotostimolata, *Photo-Stimulated Luminescence* o PSL) o termica (termoluminescenza, *Thermically-Stimulated Luminescence* o TL).

I metodi basati sulle tecniche di luminescenza stimolata, approvati a livello europeo dal CEN (*Comité Européen de Normalisation*) e recepiti dall'Ente Nazionale Italiano di Unificazione, UNI, indicati per l'identificazione dell'irraggiamento nelle matrici del "Piano nazionale di controllo ufficiale sugli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti", sono i seguenti:

- UNI EN 13751:2009 Ricerca di alimenti irraggiati con l'utilizzo di luminescenza fotostimolata
- UNI EN 1788:2002 Ricerca per termoluminescenza di alimenti irraggiati dai quali possono essere isolati i minerali silicati

Luminescenza stimolata

Il fenomeno della luminescenza otticamente o termicamente stimolata si osserva in materiali precedentemente esposti a radiazioni ionizzanti. Si tratta per lo più di solidi isolanti in grado di mantenere traccia del passaggio della radiazione ionizzante attraverso fenomeni di intrappolamento di cariche in difetti presenti nella struttura del materiale (Figura 1).

Le trasformazioni radioindotte nella struttura del materiale sono sostanzialmente stabili, ossia possono permanere a lungo nel tempo, e sono in genere reversibili. Il materiale può tornare nel suo stato iniziale a patto di ricevere l'energia necessaria per liberare le cariche intrappolate. L'energia di attivazione delle trappole può essere fornita attraverso il riscaldamento o l'esposizione a radiazione ottica; i processi di ricombinazione delle cariche attraverso i quali il materiale (atomi e/o molecole) ritorna nel suo stato iniziale sono accompagnati da emissione di luce (luminescenza stimolata) (Figura 2).

Nel caso in cui l'energia di attivazione viene fornita dalla radiazione ottica si parla di *luminescenza fotostimolata* (PSL), quando il materiale viene riscaldato si parla invece di *termoluminescenza* (TL).

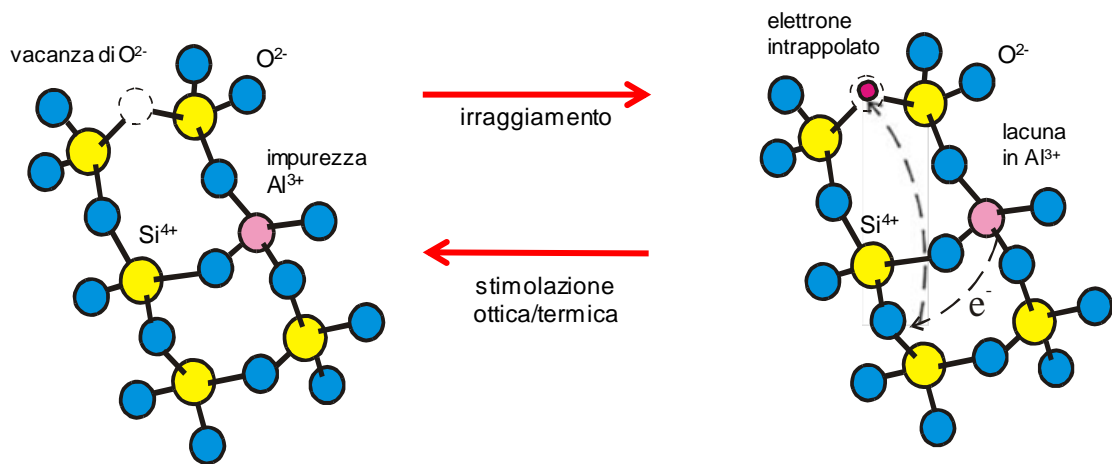


Figura 1. Il fenomeno della luminescenza stimolata in un cristallo di quarzo: nella struttura del cristallo sono presenti difetti (vacanze di ossigeno, impurezze di alluminio) dove rimangono intrappolate le cariche liberate dalla radiazione ionizzante. La stimolazione ottica o termica fornisce l'energia necessaria per liberare le trappole e ripristinare le condizioni iniziali

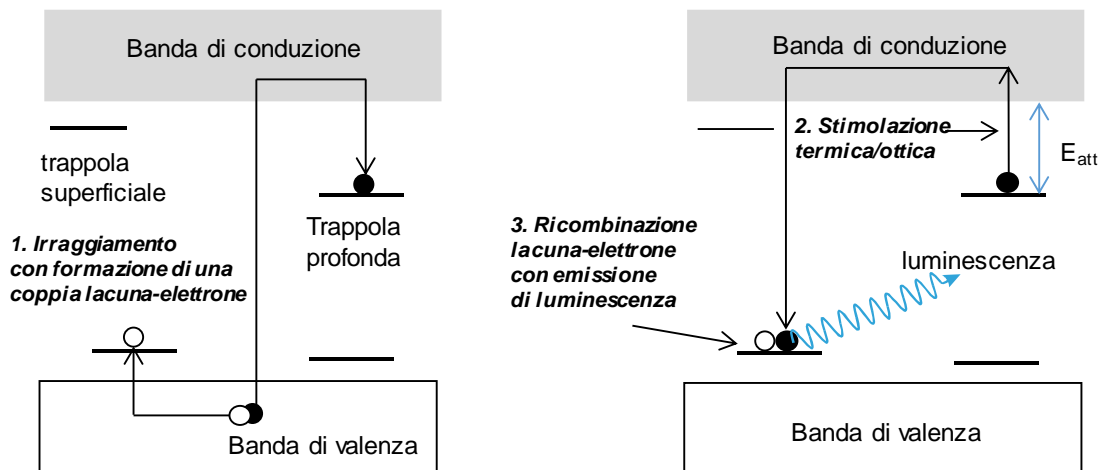


Figura 2. Il fenomeno della luminescenza stimolata secondo il modello a bande dei solidi isolanti. I livelli metastabili (trappole) tra le due bande sono dovuti ai difetti presenti nella struttura del solido. A sinistra: irraggiamento con formazione di una coppia lacuna-elettrone e intrappolamento delle cariche nei livelli metastabili tra le bande. A destra: stimolazione ottica o termica, ricombinazione dell'elettrone con la lacuna ed emissione di luminescenza

Apparato strumentale e misura

Una misura di luminescenza stimolata viene eseguita riscaldando il campione (termoluminescenza, TL) o esponendolo a radiazione visibile o infrarossa (fotoluminescenza, PSL).

In seguito alla stimolazione ottica o termica il campione emette luminescenza (generalmente luce visibile) che viene raccolta e trasformata in un segnale elettrico da un fotomoltiplicatore. In Figura 3 è riportato schematicamente il processo di misura.

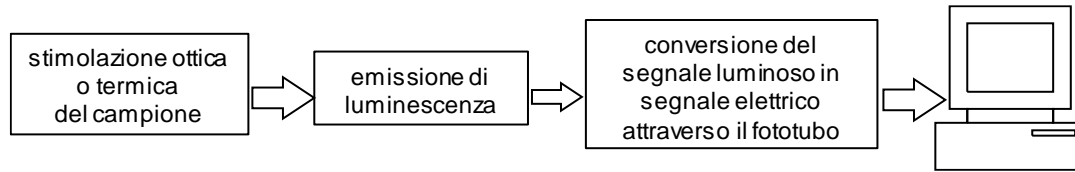


Figura 3. Rappresentazione schematica di una misura di luminescenza otticamente o termicamente stimolata

Le parti che compongono un lettore di luminescenza stimolata sono essenzialmente: il sistema di stimolazione ottica o termica del campione, il fotomoltiplicatore o fototubo per la conversione del segnale di luminescenza in segnale elettrico e l'elettronica di controllo. L'apparato prevede anche l'utilizzo di filtri opportuni per la selezione di specifiche componenti dello spettro di emissione. Il lettore è normalmente collegato ad un computer che gestisce le varie operazioni di acquisizione dei dati tramite un software dedicato.

Durante una misura di *fotoluminescenza* il campione viene esposto a radiazione ottica di frequenza e potenza opportune per periodi di tempo della durata di qualche decina di secondi. L'intensità della luce emessa viene registrata in funzione del tempo come illustrato nella Figura 4 che riporta, a titolo di esempio, il segnale di decadimento ottenuto con componenti elettronici (resistori) precedentemente irradiati.

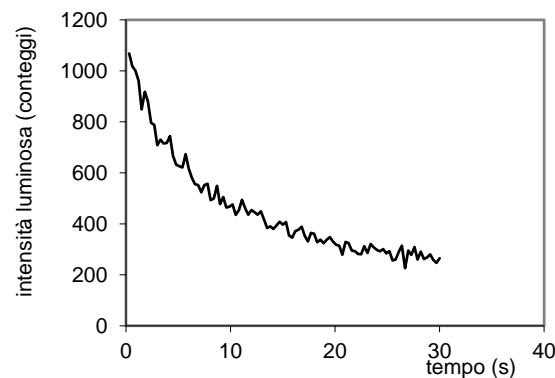


Figura 4. Esempio di curva PSL di decadimento ottenuta da componenti elettronici stimolati con luce blu

Durante una misura di termoluminescenza il campione viene riscaldato in modo controllato fino alla temperatura desiderata che è diversa a seconda del tipo di materiale e degli scopi della misura e generalmente inferiore a 500°C. Durante il riscaldamento, si liberano le trappole e si verificano processi di ricombinazione lacuna-elettrone accompagnati da emissione di luminescenza (Figura 3). Man mano che la temperatura cresce si liberano trappole sempre più profonde, caratterizzate da energia di attivazione (E_{att}) via via maggiore, che corrispondono a picchi di luminescenza a temperature crescenti. L'intensità della luce emessa viene riportata in funzione della temperatura che, normalmente, durante la misura cresce linearmente con il tempo. Nella Figura 5 sono mostrate le curve di termoluminescenza o *glow curve*, di due materiali. La forma della curva, il numero e la posizione dei picchi dipendono dal tipo di difetti (trappole) presenti nella struttura del materiale e dalla loro energia di attivazione.

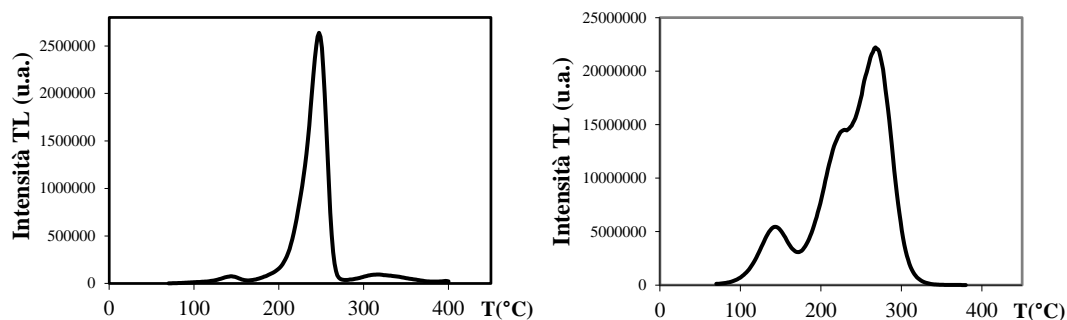


Figura 5. Esempi di *glow curve* di materiali diversi: dosimetro a fluoruro di litio, TLD100 (a sinistra) e sale marino da cucina (a destra)

Metodo UNI EN 13751

Con questo metodo si misura l'intensità della luce emessa dal campione sotto stimolazione con radiazione infrarossa. La luminescenza viene prodotta, durante la stimolazione ottica, dai minerali presenti nella matrice alimentare quindi il metodo è applicabile, in linea di principio, a tutti gli alimenti che contengono particolato minerale.

L'apparato sperimentale consente di eseguire misure direttamente sull'alimento. A titolo di esempio nella Figura 6 viene mostrato uno degli strumenti più utilizzati.



Figura 6. Sistema di misura PSL (a destra il cassetto estraibile con l'alloggiamento per la capsula Petri contenente il campione)

Durante la misura un'aliquota di campione viene inserita in una capsula Petri e introdotta, attraverso un cassetto estraibile, nell'apparato di misura proprio al di sotto del sistema di stimolazione a *impulsi di infrarosso*. Il dato che si utilizza per la classificazione del campione è il numero di *conteggi* registrato in 60 secondi durante i quali il campione viene sottoposto a 60 impulsi di infrarosso. Il totale di conteggi viene confrontato con due valori di soglia, T_1 (soglia inferiore) e T_2 (soglia superiore), il che permette di classificare il campione come negativo, positivo o intermedio.

La maggior parte dei campioni irradiati produce un segnale molto superiore alla soglia T_2 , tuttavia, poiché è possibile (anche se non molto frequente) ottenere un risultato positivo anche da campioni non irradiati ma con un elevato segnale di fondo (geologico) dovuto alla radiazione naturale, è necessario confermare il risultato ottenuto tramite uno dei metodi fisici di conferma.

Segnali inferiori alla soglia T_1 indicano che il campione non è stato trattato con radiazioni ionizzanti; il campione in esame è perciò classificato come non irradiato e non viene sottoposto ad ulteriore analisi.

Per i valori intermedi compresi tra le due soglie T_1 e T_2 è necessaria un'ulteriore indagine; in questo caso il risultato potrebbe essere dovuto a un campione irradiato ma povero di silicati che fornisce un numero totale di conteggi inferiore alla soglia T_2 , un campione non irradiato con un segnale di fondo elevato o alla presenza di una parte di prodotto irradiato (miscela). Lo schema decisionale da seguire per la classificazione del campione è, quindi, il seguente:

- conteggi $< T_1$ → risultato negativo → campione non irradiato
- $T_1 < \text{conteggi} < T_2$ → risultato intermedio → campione indeterminato
(*possibilmente irradiato, da riesaminare*)
- conteggi $> T_2$ → risultato positivo → campione probabilmente irradiato
(*da confermare*)

Il metodo viene usato come metodo di screening e richiede quindi il riesame con un metodo di conferma dei campioni risultati non negativi (intermedi e/o positivi).

Le misurazioni vengono effettuate sul campione tal quale avendo però cura di selezionare una porzione di alimento non esposta alla luce che può provocare svuotamento delle trappole con conseguente riduzione del segnale.

L'analisi viene condotta in duplicato su due aliquote di campione. Generalmente le risposte sono concordi, tuttavia, poiché i minerali responsabili dell'emissione di luminescenza sono distribuiti in modo non uniforme nella matrice alimentare, le variazioni nelle risposte delle singole aliquote dello stesso campione possono essere anche notevoli e portare ad esiti discordi; in questi casi l'analisi viene ripetuta su altre quattro aliquote e vengono considerati, per la classificazione, i due conteggi più alti.

Il metodo UNI EN 13751 è stato validato, attraverso test di validazione internazionali, per erbe essiccate, spezie, condimenti, crostacei e molluschi, ma ci sono evidenze che possa essere applicato a una grande varietà di prodotti. Le limitazioni nell'applicazione di questo metodo sono legate alla presenza di campioni con bassa sensibilità, come ad esempio alcune spezie (pepe bianco e noce moscata), che danno luogo a falsi negativi.

In alcuni prodotti la presenza di sale, caratterizzato da segnali di fondo elevati, potrebbe mascherare il contributo derivante dagli ingredienti effettivamente trattati e dare luogo a falsi positivi. In questo caso è utile idratare il campione ed eseguire di nuovo la misura.

Applicazione alle matrici del Piano

Le matrici di origine animale e non animale previste dal Piano sono:

- *Matrici animali*: vongole, cozze e ostriche con guscio, gamberi, gamberetti e scampi non eviscerati
- *Matrici non animali*: aglio, patate e cipolle con buccia, erbe e spezie, funghi essiccati, legumi secchi, ingredienti per integratori (foglie, radici, semi, frutti, ecc.), esclusi gli estratti vegetali.

Matrici animali

Preparazione del campione

Per la preparazione del campione si possono utilizzare i prodotti interi con i gusci oppure le parti edibili o gli intestini (6 per Petri). Quando è possibile, porre il prodotto intero o la parte edibile nella capsula Petri con l'intestino, che contiene i minerali, rivolto verso l'alto. È importante proteggere il campione dalla luce e dalla contaminazione prima e durante l'analisi.

Misura PSL

Dopo aver effettuato i controlli sulla corrente di buio e sui materiali standard irradiati e non irradiati, eseguire una misura a vuoto per controllare l'assenza di contaminazione dell'alloggiamento del campione. Ripetere le misure su altre quattro aliquote nel caso in cui i primi due risultati fossero discordi. Ripetere la misura a vuoto almeno ogni 10 misure su campioni e dopo ogni risultato positivo.

Valutazione dei risultati

Confrontare i risultati delle misure con i valori di soglia T_1 e T_2 ($T_1=1000$ conteggi/60 s e $T_2=4000$ conteggi/60 s) e usare lo schema decisionale riportato in Tabella 1.

La valutazione dei risultati è basata sui dati ottenuti nel corso di test di validazione internazionali e nazionali e su dati di letteratura.

Tabella 1. Metodo UNI EN 13751: schema decisionale applicato alle matrici animali del Piano

Matrice	Conteggi/60s	Risultato	Esito	Azioni
	< T_1	negativo	non irradiato	nessuna
Vongole, cozze e ostriche con guscio, gamberi, gamberetti e scampi non eviscerati	> T_1 e < T_2	intermedio	indeterminato	ripetere l'analisi con altro metodo
	> T_2	positivo	irradiato	confermare il risultato

Il metodo UNI EN 13751 applicato alle matrici animali indicate nel Piano richiede il riesame dei campioni non negativi (intermedi o positivi) con uno degli altri metodi previsti dal Piano.

Matrici non animali

Preparazione del campione

Per la preparazione del campione inserire il prodotto tal quale nella capsula Petri coprendo il fondo della capsula (possibilmente con strato spesso). Nel caso di aglio, patate e cipolle utilizzare la buccia e disporla nella capsula Petri con la parte esterna, su cui sono depositati i minerali, rivolta verso l'alto.

Misura PSL

Dopo aver effettuato i controlli sulla corrente di buio e sui materiali standard irradiati e non irradiati, eseguire una misura a vuoto per controllare l'assenza di contaminazione dell'alloggiamento del campione. Ripetere le misure su altre quattro aliquote nel caso in cui i primi due risultati fossero discordi. Ripetere la misura a vuoto almeno ogni 10 misure su campioni e dopo ogni risultato positivo.

Valutazione dei risultati

Confrontare i risultati delle misure con i valori di soglia T_1 e T_2 ($T_1 = 700$ conteggi/60 s e $T_2 = 5000$) e usare lo schema decisionale riportato in Tabella 2.

La valutazione dei risultati è basata sui dati ottenuti nel corso di test di validazione internazionali e nazionali e su dati di letteratura.

Tabella 2. Metodo UNI EN 13751: schema decisionale applicato alle matrici non animali del Piano

Matrice	Conteggi/60s	Risultato	Esito	Azioni
Aglio, patate e cipolle con buccia, erbe e spezie, funghi essiccati, legumi secchi, ingredienti per integratori (foglie, radici, semi, frutti, ecc.) esclusi gli estratti vegetali	< T_1	negativo	non irradiato	nessuna
	> T_1 e < T_2	intermedio	indeterminato	ripetere l'analisi con altro metodo
	> T_2	positivo	irradiato	confermare il risultato

Il metodo UNI EN 13751 applicato alle matrici non animali indicate nel Piano richiede il riesame dei campioni non negativi (intermedi o positivi) con uno degli altri metodi previsti dal Piano.

Metodo UNI EN 1788

Con questa tecnica si misura l'intensità della luce emessa durante il riscaldamento del campione. Diversamente da quello che succede con la fotoluminescenza, le misure di termoluminescenza non possono essere eseguite direttamente sulla matrice alimentare. In questo caso occorre separare i silicati (quarzo e feldspati), responsabili dell'emissione della termoluminescenza, dalla parte organica che durante il riscaldamento potrebbe generare segnali spuri (non radioindotti). La separazione avviene tramite una procedura che prevede una prima fase di preconcentrazione della frazione minerale, eseguita attraverso lavaggi e trattamenti con ultrasuoni che ne facilitano il distacco. Si completa poi l'estrazione attraverso la fase di separazione per densità dei residui di materia organica, procedura eseguita tramite l'utilizzo di reagenti (politungstato di sodio). È prevista anche una fase in cui attraverso un trattamento con HCl si eliminano i carbonati presenti nella miscela di minerali raccolti. I silicati (quarzo e feldspati) così isolati dalla matrice alimentare vengono infine depositati su piattelli di acciaio inossidabile di spessore 0,25-0,5 mm che garantisce un efficace trasferimento di calore al campione durante la misura TL. Alcune delle fasi più importanti della procedura sono mostrate nella Figura 7.

Prima di eseguire la misura TL i piattelli contenenti i silicati vengono conservati in forno a circa 50°C per un'intera notte per eliminare le parti instabili del segnale a bassa temperatura. L'analisi viene condotta in duplicato. Si effettua inoltre la misura del bianco per il controllo della procedura. In questo caso l'intera procedura di estrazione dei silicati viene eseguita senza utilizzare il campione, per evidenziare una eventuale contaminazione da parte dei reagenti e/o della vetreria. I dati relativi ai bianchi (integrali delle Glow1) vengono utilizzati per calcolare la soglia di rivelazione MDL (*Minimum Detection Level*).

Durante la misura TL i silicati vengono riscaldati fino a temperature elevate (circa 400°C); si ottiene così una prima curva di termoluminescenza o *glow curve* (Glow1) di cui si calcola l'integrale in uno specifico intervallo di temperatura (150-250°C). Il valore dell'integrale della curva Glow1 derivante da un campione irradiato risulta molto maggiore rispetto a quello di un campione non irradiato nel quale il segnale TL che si osserva è prodotto soltanto dalla radiazione di fondo naturale.

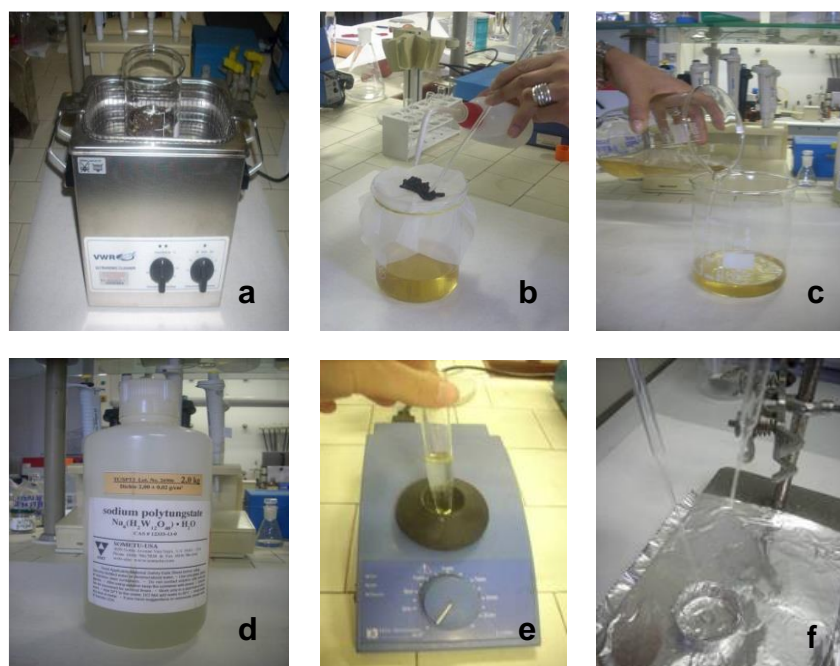


Figura 7. Estrazione in acqua di silicati da un campione di pepe nero: a) trattamento con ultrasuoni per favorire il distacco dei minerali dalla matrice alimentare; b) filtrazione; c) scarico della matrice organica; d) ed e) separazione dei residui organici per gradiente di densità con politungstato di sodio; f) trasferimento dei silicati, sotto flusso di azoto, in un piattello di acciaio inossidabile

Tuttavia, da questa sola misura non è possibile identificare il campione in maniera univoca poiché l'intensità della luce emessa dipende dal livello di contaminazione minerale della matrice e dalla qualità del particolato estratto (quarzo e feldspati) che può variare da un campione all'altro. Per tali motivi, per una corretta identificazione è necessaria una stima della sensibilità alle radiazioni ionizzanti del campione esaminato. Ciò si ottiene irradiando in laboratorio ad una dose nota (1 kGy) i silicati estratti e precedentemente sottoposti a lettura TL (Glow1). Si esegue quindi una seconda misura TL dalla quale si ottiene una seconda *glow curve* (Glow2).

L'analisi del rapporto fra gli integrali (G1, G2) delle due curve ottenute permette di identificare il campione come irradiato o non irradiato; in particolare vale il seguente criterio:

- $G1/G2 > 0,1 \rightarrow$ campione irradiato;
- $G1/G2 < 0,1 \rightarrow$ campione non irradiato.

L'identificazione del campione si completa con l'esame della Glow1 che presenta caratteristiche diverse nei campioni a seconda del trattamento subito (irradiati o no).

In Figura 8 sono riportati esempi di curve Glow1 ottenute con un campione irradiato e uno non irradiato di un ingrediente per integratori a base di piante.

Il particolato minerale estratto da un alimento non irradiato prima di entrare a far parte dell'alimento come contaminante ha subito, nel corso del tempo, soltanto l'effetto della radiazione naturale (segnale geologico). Poiché le trappole più superficiali si svuotano nel tempo per effetto dell'agitazione termica naturale, la Glow1 di un prodotto non irradiato presenterà eventualmente solo le componenti ad alta temperatura corrispondenti alle trappole più profonde in cui si accumula e si conserva il segnale geologico dovuto alla radiazione naturale.

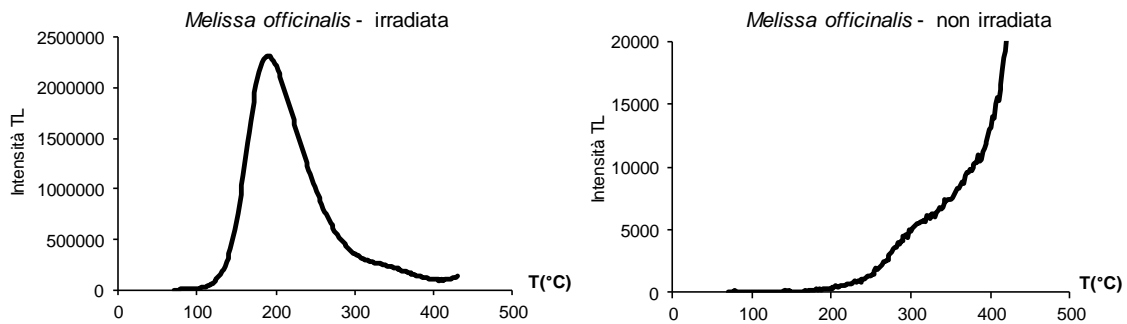


Figura 8. Glow curve di *Melissa officinalis* (foglie): irradiata ad una dose di 1 kGy (a sinistra) e non irradiata (a destra) (la scala dell'asse delle ordinate del grafico a destra è ridotta)

Nel caso di un alimento trattato con radiazioni ionizzanti, invece, nella Glow1 saranno presenti anche le componenti a bassa temperatura dovute al trattamento. Come si vede, quindi, la tecnica TL consente di distinguere, attraverso l'esame della posizione del picco, l'emissione dovuta al trattamento con radiazioni ionizzanti da quella dovuta al fondo naturale di radiazione (segnale geologico). Al contrario, attraverso la tecnica PSL, che è in grado di apprezzare solo l'intensità dei segnali, tale distinzione non è possibile. Il metodo TL può essere quindi utilizzato per verificare l'esito non negativo di analisi PSL e confermare l'identificazione di eventuali campioni positivi (trattati con radiazioni ionizzanti).

La tecnica è in grado, in linea di principio, di rivelare anche ingredienti irradiati in una miscela (es. in un integratore multicomponente). In questo caso la forma della Glow1 è quella tipica di un campione irradiato ma l'intensità è ridotta perché l'emissione di luce è prodotta solo da quella parte dei silicati estratti che proviene dalla componente irradiata della miscela. Il rapporto G1/G2 può risultare quindi inferiore al valore di soglia 0,1. Il metodo, tuttavia, può fallire in caso di concentrazioni molto ridotte di prodotto irradiato.

Nella Figura 9 è mostrato un esempio di identificazione di una componente irradiata in una miscela.

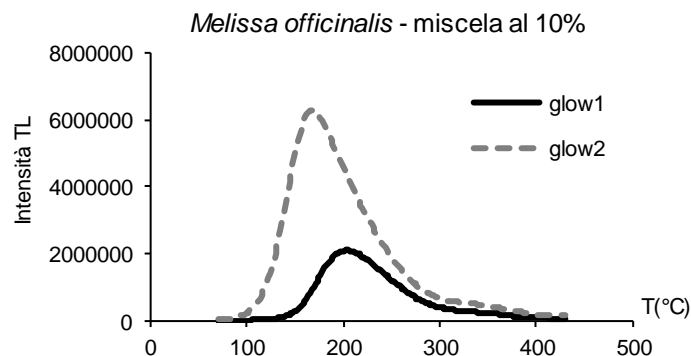


Figura 9. Glow curve di un campione di *Melissa officinalis* (foglie) contenente una componente irradiata

La Figura 10 mostra una rappresentazione schematica della procedura di analisi TL applicata ad un campione irradiato.

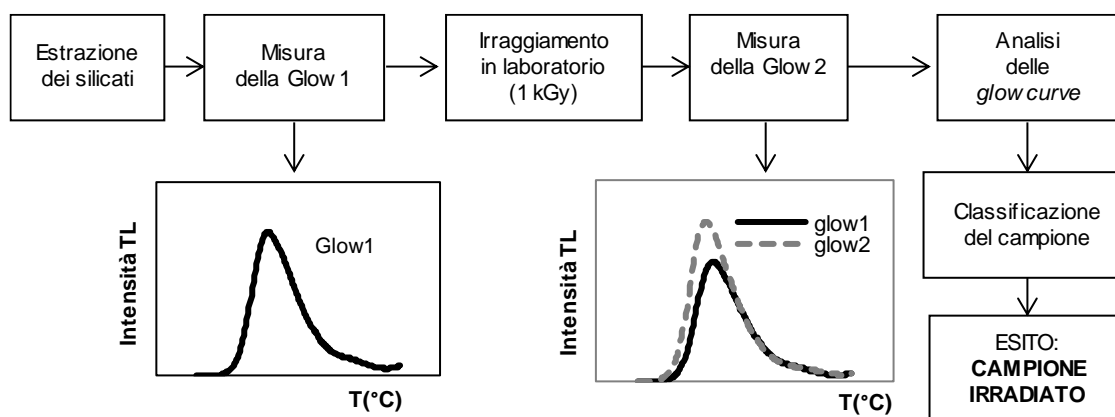


Figura 10. Esempio di applicazione della procedura di analisi TL ad un campione irradiato. Le differenze visibili nelle intensità delle curve Glow1 e Glow2 dipendono dalle differenze nelle dosi somministrate e dalla diminuzione (*fading*) del segnale durante il periodo di conservazione

Il metodo UNI EN 1788 è stato validato, attraverso test di validazione internazionali, per erbe, spezie, condimenti, gamberi, gamberetti, frutta fresca e disidratata e patate ma può essere applicato, in generale, a tutti gli alimenti dai quali sia possibile estrarre del particolato minerale (silicati).

In alcuni casi, si possono avere problemi legati alla raccolta dei silicati che risultano in quantità non sufficiente per l'analisi ($G2 < 10$ MDL). Questa situazione si può presentare con alcune spezie (pepe e noce moscata) e gli estratti vegetali usati per la preparazione degli integratori. Il problema si può superare facilmente utilizzando per l'analisi una quantità di campione maggiore.

Applicazione alle matrici del Piano

Le matrici di origine animale e non animale previste dal Piano Nazionale sono:

- *Matrici animali*: vongole, cozze e ostriche, in tutti i casi con guscio, calamari, polpi e seppie non eviscerati, gamberi, gamberetti e scampi non eviscerati.
- *Matrici non animali*: aglio e patate con buccia, cipolle con buccia, erbe e spezie, mais, frumento, riso, fragole, mirtilli, ribes, more, papaya, avocado, mango, pistacchi, noci, arachidi, nocciole, castagne, mandorle, fichi secchi, uvetta, funghi essiccati, legumi secchi, ingredienti di origine vegetale per la produzione di integratori alimentari inclusi gli estratti vegetali.

Matrici animali

Preparazione del campione

Per la preparazione del campione si procede come di seguito descritto. Con una pinza e un bisturi isolare il sacco viscerale (corpo tondeggianti di colore bruno scuro) dal resto del corpo dell'animale. Con l'aiuto di forbici e pinze eliminare il più possibile il grasso adesivo alla massa viscerale e trasferire il resto in una capsula Petri. Tagliare l'intestino in piccoli pezzi e trasferire il tutto in un becher sciacquando bene con acqua bidistillata. Nella maggior parte dei casi è

necessario utilizzare almeno tre intestini. Separare i silicati dalla matrice organica seguendo la procedura di estrazione indicata nel metodo UNI EN 1788.

Misura TL

Impostare i seguenti parametri di misura:

- Temperatura iniziale: 70°C nominali
- Rateo di riscaldamento: 6°C/s per 60 s nominali
- Temperatura finale: 400-430°C nominali.

Effettuare la prima misura TL (Glow1), dei campioni e del bianco, con i parametri sopra indicati. Dopo la misura irradiare il campione e il bianco alla dose di circa 1 kGy. Dopo l'irraggiamento, mantenere in forno a 50°C circa per una notte. Effettuare una seconda lettura TL (Glow2), sui campioni e sul bianco irradiati.

Valutazione dei risultati

Effettuare la classificazione del campione considerando: a) il rapporto G1/G2; e b) la forma della curva Glow1, secondo lo schema di Tabella 3.

La valutazione dei risultati è basata sui dati ottenuti nel corso di test di validazione internazionali e nazionali e su dati di letteratura.

Tabella 3. Metodo UNI EN 1788: schema decisionale applicato alle matrici animali del Piano

Matrice	G1/G2	Glow1	Esito	Azioni
Vongole, cozze e ostriche con guscio, calamari, polpi e seppie non eviscerati, gamberi, gamberetti e scampi non eviscerati	<0,1	eventuale picco a circa 300°C	non irradiato	nessuna
	>0,1	picco a circa 200°C	irradiato	nessuna

Il metodo UNI EN 1788 applicato alle matrici animali indicate nel Piano è di conferma e il risultato analitico è sempre valido.

Matrici non animali

Preparazione del campione

Per la preparazione del campione si procede come di seguito descritto. Separare i silicati dalla matrice alimentare seguendo la procedura di estrazione indicata nello Standard europeo EN 1788. Utilizzare da 3 g a 20 g di erbe e spezie, da 50 g a 200 g di frutta e vegetali disidratati, uno o più frutti o vegetali freschi o patate a seconda del grado di contaminazione minerale. Nel caso di ingredienti di integratori a base di piante, utilizzare quantità simili a quelle previste per le erbe e spezie tranne nel caso degli estratti vegetali che richiedono in genere quantità più elevate.

Misura TL

Impostare i seguenti parametri di misura:

- Temperatura iniziale: 70°C nominali
- Rateo di riscaldamento: 6°C/s per 60 s nominali
- Temperatura finale: 400-430°C nominali.

Effettuare la prima misura TL (Glow 1), dei campioni e del bianco, con i parametri sopra indicati. Dopo la misura irradiare il campione e il bianco alla dose di circa 1 kGy. Dopo

l'irradiazione, mantenere in forno a 50°C circa per una notte. Effettuare una seconda lettura TL (Glow2), sui campioni e sul bianco irradati.

Valutazione dei risultati

La valutazione dei risultati è basata sui dati ottenuti nel corso di test di validazione internazionali e nazionali e su dati di letteratura. Effettuare la classificazione del campione considerando: a) il rapporto G1/G2; e b) la forma della curva Glow1, secondo lo schema di Tabella 4.

Tabella 4. Metodo UNI EN 1788: schema decisionale applicato alle matrici non animali del Piano

Matrice	G1/G2	Glow1	Esito	Azioni
Aglio e patate con buccia, cipolle con buccia, erbe e spezie, mais, frumento, riso, fragole, mirtilli, ribes, more, papaya, avocado, mango, pistacchi, noci, arachidi, nocciole, castagne, mandorle, fichi secchi, uvetta, funghi essiccati, legumi secchi, ingredienti di integratori inclusi gli estratti vegetali	<0,1	eventuale picco a circa 300°C	non irradiato	nessuna
	>0,1	picco a circa 200°C	irradiato	nessuna

Il metodo UNI EN 1788 applicato alle matrici non animali indicate nel Piano è di conferma e il risultato analitico (positivo o negativo) è sempre valido.

Bibliografia di riferimento

- Bortolin E, Boniglia C, Gargiulo R, Onori S. Herbal materials used in dietary supplements: Comparison of luminescence methods for detection of irradiation. *Radiation Physics and Chemistry* 2009;78:683-5.
- Cruz-Zaragoza E, Marcazzó J, Della Monaca S, Bortolin E. Thermoluminescence analysis of irradiated Oyster shells. *Applied Radiation and Isotopes* 2012; 1:18-22.
- Furetta C. *Handbook of thermoluminescence*. Singapore. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd; 2003.
- Kim BK, Akram K, Kim CT, Kang NR, Lee JW, Ryang JH, Kwon JH. Identification of low amount of irradiated spices (red pepper, garlic, ginger powder) with luminescence analysis. *Radiation Physics and Chemistry* 2012;81:1220-3.
- Kim BK, Kim CT, Park SH, Lee JE, Jeong HS, Kim CY, Lee JK, Yu MA, Kwon JH. Application of Thermo-luminescence (TL) method for the identification of food mixture containing irradiated ingredients. *Food Analytical Methods* 2015;8:718-27.
- Kwon JH, Ahn JJ, Akram K, Son IJ, Lee SO. Characterization of radiation-induced luminescence properties and free radicals for the identification of different gamma-irradiated teas. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 2013;405:4225-34.
- Lee J, Chung HW, Kwon JH. Detection of different ratios of gamma-irradiated turmeric by photostimulated luminescence and thermoluminescence. *Korean Journal of Food Science and Technology* 2010;42:648-52.
- Leth, T, Hansen, HB. Comparison of three methods for the detection of herbal food supplement irradiation. *European Food Research and Technology* 2006;223:39-43.
- Marchioni E, Anklam E, Chabane S, Delincée H, Douifi L, Hungerbuhler H, Pelleau Y, Pinnioja S, Raffi J, Sanderson D, Wagner U. *Detection by thermoluminescence of an irradiation treatment of five species of dehydrated fruit and vegetables. Report on a CTCPA/AIFLD International Interlaboratory Study.*

- Karlsruhe: Bundesforschungsanstalt für Ernährung (BFE); 1999. (Berichte der Bundesforschungsanstalt für Ernährung, BFE-R-99-02).
- Pal S, Kim BK, Kim WY, Kim MJ, Ki HA, Kang WS, Kang IH, Kang SJ, Song JM. Pulsed photostimulated- and thermo-luminescence investigations of γ ray-irradiated herbs. *Food Chemistry* 2010;122:1290-7.
- Pal S, Kim BK, Kim WY, Kim MJ, Ki HA, Lee KH, Kang WS, Kang IH, Kang SJ, Song JM. Identification of γ -ray irradiated medicinal herbs using pulsed photostimulated luminescence, thermoluminescence and electron spin resonance spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2009;394(7):1931-45.
- Sanderson DC. Thermoluminescence detection of irradiated fruits and vegetables: international interlaboratory trial. *Food composition and additives* 2003;86(5):971-5.
- Sanderson DCW, Carmichael L, and Fisk S. Establishing luminescence methods to detect irradiated foods. *Food Science and Technology Today* 1998;12(2):97-102.
- Sanderson DCW, Carmichael LA, Fisk S. Photostimulated luminescence detection of irradiated shellfish: international interlaboratory trial. *Journal of AOAC International* 2003; 86(5): 983-89.
- Sanderson DCW, Carmichael LA, Naylor JD. Recent advances in thermoluminescence and photostimulated luminescence detection methods for irradiated foods. In: McMurray CH, Stewart EM, Gray R, Pearce J (Ed.). *Detection methods for irradiated foods - Current status*. Cambridge, UK Royal society of Chemistry; 1996. p. 124-138.
- Sanderson DCW, *et al.* Luminescence detection of shellfish. In: McMurray CH, Stewart EM, Gray R, Pearce J (Ed.). *Detection methods for irradiated foods - Current status*. Cambridge, UK Royal society of Chemistry; 1996. p. 139-48
- Sanderson DCW. *Photostimulated luminescence (PSL): A new approach to identifying irradiated foods. Potential new methods of detection of irradiated food*. Brussels: Commission of the European Communities (CEC); 1991. (EUR --13331)
- Schreiber GA, Helle N, Bogl KW. An interlaboratory trial on the identification of irradiated spices, herbs, and spice-herb mixtures by thermoluminescence analysis. *Food composition and additives* 1995;78(1):88-93.
- Schreiber GA, Wagner U, Helle N, Ammon J, Buchholtz H-V, Delincée H, Estendorfer S, von Grabowski H-U, Kruspe W, Mainczyk K, Munz H, Schleich C, Vreden N, Wieszorek C, Bogl KW. *Thermoluminescence analysis to detect irradiated fruit and vegetables – an intercomparison study*. Berlin: Bundesgesundheitsamt (German Federal Health Office); 1993. (Bericht des Instituts für Sozialmedizin und Epidemiologie des Bundesgesundheitsamtes. SozEp-Heft 3/1993).
- Todoriki S, Kameya H, Saito K, Hagiwara S. Detection of Commercially Irradiated Potatoes by Thermoluminescence and Photostimulated Luminescence Analyses. *Food Science and Technology Research* 2014;20 (3):555-61.
- UNI EN 13708. *Ricerca per termoluminescenza di alimenti irraggiati dai quali possono essere isolati i minerali silicati*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2002.
- UNI EN 13751. *Ricerca di alimenti irraggiati con l'utilizzo di luminescenza fotostimolata*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2009.

METODO BASATO SUL SAGGIO DNA COMET

Michele Mangiacotti, A. Eugenio Chiaravalle, Giuliana Marchesani, Daniela Chirizzi
*Centro di Referenza Nazionale per la Ricerca della Radioattività nel Settore Zootecnico-Veterinario,
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia*

Il *DNA Comet Assay* è un saggio biologico per l'identificazione dei danni al DNA in cellule eucariote di origine animale e vegetale. In particolare con questo metodo è possibile valutare qualitativamente il danno indotto sul filamento di DNA da parte di agenti mutageni, come ad esempio le radiazioni ionizzanti, in grado di rompere lo scheletro fosfodiesterico. Si tratta di un saggio di facile allestimento, rapida esecuzione ed elevata sensibilità e può essere applicato a tutti i tipi di tessuti dai quali si possa ottenere una sospensione omogenea di cellule isolate. La disgregazione del DNA si evidenzia mediante una corsa elettroforetica a basso voltaggio che consente la migrazione dei frammenti fuori dal nucleo con la formazione di una coda caratteristica, che ricorda quella di una cometa, la cui lunghezza è proporzionale alla dose di trattamento.

Il metodo basato sul saggio *DNA Comet*, approvato a livello europeo dal CEN (*Comité Européen de Normalisation*) e recepito dall'UNI, indicato per l'identificazione dell'irraggiamento nelle matrici del "Piano nazionale di controllo ufficiale sugli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti", è il seguente:

- UNI EN 13784:2002 - Saggio *DNA Comet* per la ricerca di prodotti alimentari irraggiati.
Metodo di screening

Non trattandosi di un metodo specifico i risultati positivi devono essere confermati con tecniche di gascromatografia, termoluminescenza o di risonanza di spin elettronico.

Saggio DNA Comet

Il saggio *DNA Comet* è applicabile, sia *in vitro* che *in vivo*, a numerosi tipi di cellule di tessuti differenti e richiede quantità ridotte di substrato (da alcune centinaia a poche migliaia di cellule).

La tecnica prevede diverse fasi: preparazione di una sospensione cellulare omogenea, inglobamento delle cellule da esaminare in un sottile strato di agarosio, lisi delle membrane cellulari, denaturazione del DNA nucleare in una soluzione tampone a pH basico o neutro a seconda del tipo di danno che si vuole visualizzare, corsa elettroforetica su vetrini pretrattati. I filamenti di DNA delle cellule non irradiate, che non hanno subito rotture, tendono a rimanere concentrati in un nucleoide (DNA avvolto a proteine istoniche e non), mentre i frammenti delle cellule irradiate generati da rotture del filamento migrano con velocità di proporzione inversa alla loro lunghezza e al peso molecolare. Al termine della migrazione elettroforetica, i nuclei vengono colorati con sostanze fluorescenti o con argento, in grado di legarsi al DNA, e successivamente vengono visualizzati tramite idoneo microscopio. Se un nucleo non presenta danni apparirà al microscopio come una struttura tonda e omogenea, talvolta accompagnata da deboli scie. In presenza di danni, invece, i frammenti di DNA migreranno verso l'anodo formando in questa direzione una struttura allungata che ricorda la coda di una cometa (Figura 1). La testa della cometa è costituita dal nucleo mentre la coda è dominata dai frammenti di DNA.

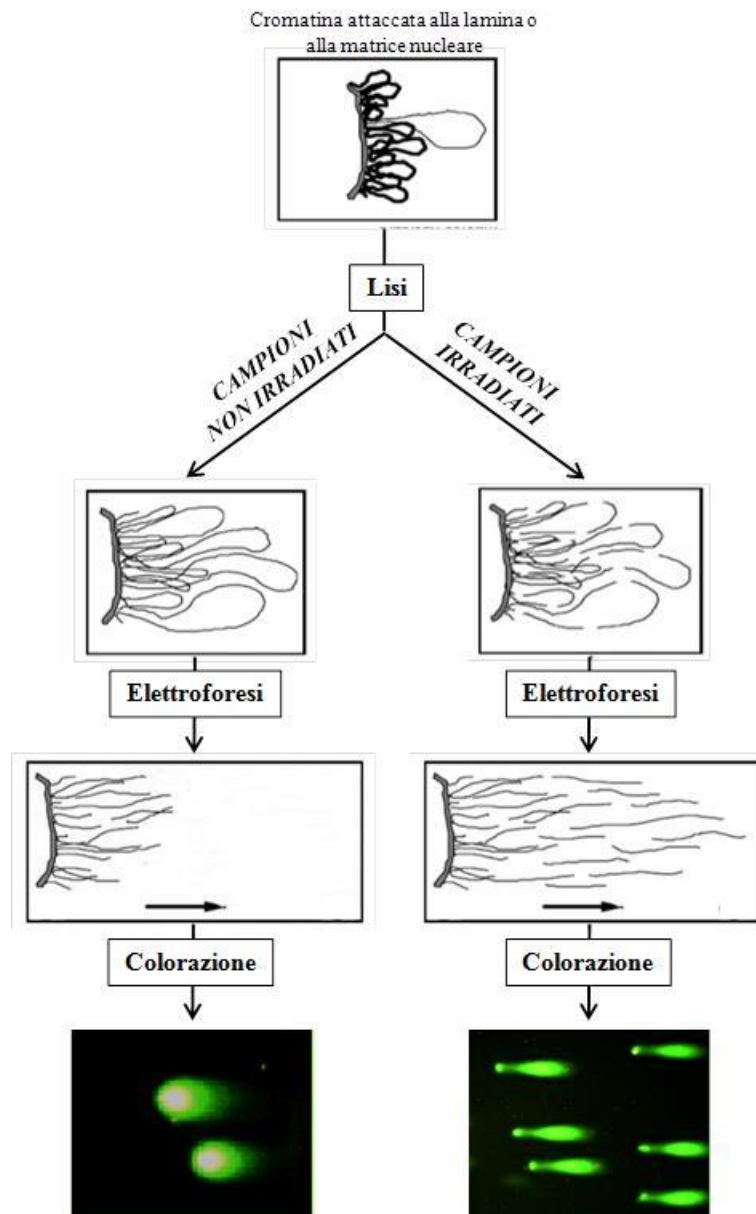


Figura 1. Rappresentazione schematica dell'effetto indotto dal campo elettrico sul DNA di nuclei non trattati (a sinistra) e trattati (a destra) con radiazioni ionizzanti

L'entità del danno al DNA, in termini di rotture, viene stimata mediante l'acquisizione di due parametri: % di DNA nella coda (misurabile come intensità di fluorescenza dopo la colorazione) e lunghezza della coda. A partire da questi parametri è possibile calcolare il *Tail Moment* (TM) o momento di coda, definito come il prodotto dell'intensità di fluorescenza relativa della coda per la sua lunghezza, che ingloba i due precedenti ed è anch'esso utilizzato come indice di danno al DNA.

La corsa elettroforetica condotta in condizioni di pH neutro permette di evidenziare solo rotture a doppia elica (DSB, *Double Strand Breaks*), mentre la corsa condotta in condizioni

alcaline (pH = 12,1) permette di rilevare anche i frammenti derivati da rotture a singolo filamento (SSB, *Single Strand Breaks*) e infine a pH > 13 si evidenziano, oltre a DSB e SSB, anche i siti labili agli alcali, i quali vanno incontro a rottura solo se sottoposti a condizioni drastiche, come ad esempio un pH molto elevato. La soluzione di lisi, il tempo di trattamento, l'elettroforesi e il tempo di corsa possono cambiare a seconda dell'alimento per poter ottenere un'adeguata migrazione del DNA.

È consigliabile effettuare l'analisi contemporanea di controlli positivi (irradiato a dose nota) e negativi (non irradiato) scegliendo matrici simili ai campioni da analizzare.

Metodo UNI EN 13784

Il metodo UNI EN 13784 (saggio *DNA Comet*) è stato validato, attraverso test di validazione internazionali, come metodo analitico di screening per l'identificazione di vari tipi di carni, semi, frutta secca e spezie trattati con radiazioni ionizzanti. È uno strumento di analisi particolarmente utile per una serie di vantaggi tra cui versatilità, sensibilità, riproducibilità e applicabilità in un ampio intervallo di dose d'irraggiamento. Inoltre è un metodo economico e semplice che non richiede una strumentazione sofisticata e può fornire ulteriori informazioni di tipo semi-quantitativo grazie all'elaborazione dei dati ottenuti dallo studio di parametri peculiari delle comete (es. misura della lunghezza o dell'area della cometa, *tail moment*). La tecnica presenta alcuni limiti tra cui l'aspecificità e la possibilità di avere falsi positivi che necessitano di essere confermati con altre tecniche specifiche per l'irraggiamento.

Durante l'applicazione del metodo è consigliabile eseguire tutte le fasi del saggio in condizioni di scarsa illuminazione e a basse temperature, mantenendo la "catena del freddo", allo scopo di evitare un danno aggiuntivo allo scheletro fosfodiesterico.

La procedura dettagliata è riportata nel metodo UNI EN 13784. Di seguito vengono riportati e commentati i punti critici relativi alle diverse fasi del metodo che devono essere presi in considerazione per una corretta esecuzione del saggio:

– *Pretrattamento dei vetrini*

Per una corretta valutazione della corsa elettroforetica occorre garantire una distribuzione uniforme delle cellule su vetrino ed è pertanto necessario un pretrattamento (*precoating*) dei vetrini con una soluzione acquosa di agarosio (0,5%) a basso punto di fusione in acqua millipore. I vetrini molati portaoggetto, con banda smerigliata per la siglatura, prima di essere utilizzati devono essere immersi tutta la notte in metanolo, per rimuovere eventuali tracce di grasso, e lasciati asciugare all'aria. La soluzione di agarosio (0,5%) deve essere distribuita uniformemente sul vetrino con l'ausilio di un secondo vetrino e lasciata asciugare a temperatura ambiente. I vetrini pretrattati possono essere conservati per diverse settimane lontano dalla polvere.

– *Preparazione della sospensione cellulare*

Il saggio *DNA Comet* può essere applicato solo su cellule isolate ed è pertanto necessario preparare una sospensione monocellulare distribuita uniformemente sul vetrino avente una concentrazione compresa tra 5×10^4 e 10×10^4 cellule per mL. I metodi per ottenere una sospensione cellulare da un tessuto (animale o vegetale) possono variare in funzione dello stato di conservazione dell'alimento e della consistenza e resistenza alla disgregazione meccanica del tessuto stesso. La sospensione viene filtrata e lasciata sedimentare in ghiaccio per un tempo prefissato (5÷60 minuti) a seconda della matrice in esame. All'aumentare del tempo di sedimentazione si ottiene una sospensione con meno contaminanti ma diminuisce il numero di cellule. Se il numero di cellule risulta scarso è

necessario aumentare la quantità di tessuto trattato, al contrario se le cellule si sovrappongono o sono troppo vicine le une alle altre è necessario diminuire la quantità di campione. La sospensione cellulare ottenuta deve essere utilizzata subito o al massimo può essere conservata in ghiaccio per non più di 10 minuti. Per conservare la sospensione cellulare per un periodo prolungato occorre aggiungere Dimetilsolfossido (DMSO) a concentrazione finale compresa tra 5 e 10%, come protettore del congelamento a -18°C .

– *Lisi cellulare*

La lisi cellulare è un passaggio fondamentale che consente la fuoriuscita dei frammenti del DNA al di fuori del nucleo e consiste nell'immergere completamente i vetrini in una soluzione di detergente anionico (SDS, Sodio Dodecil Solfato), per almeno 5 minuti per cellule animali e 15 minuti per cellule non animali, a temperatura ambiente. Una lisi troppo lunga, però, può dare delle comete anche nei controlli negativi.

– *Elettroforesi*

Al termine della lisi i vetrini vengono immersi nel tampone di corsa elettroforetica Tris-idrossimetil-aminometano (TBE) per almeno 5 minuti per il condizionamento e quindi posti nella cella elettroforetica orizzontalmente (uno accanto all'altro) ricoperti con il tampone. Si consiglia di eseguire anche la corsa elettroforetica in ghiaccio per evitare danni al DNA (Figura 2).



Figura 2. Vaschetta elettroforetica immersa in ghiaccio per mantenere freddo il tampone durante la corsa

La corsa viene condotta ad un potenziale pari a 2 V/cm (vtaggio applicato/distanza tra gli elettrodi) per qualche minuto. In questa fase si permette al DNA, carico negativamente a seguito della lisi con detergente anionico (SDS), di migrare verso il polo positivo. La velocità di migrazione dei frammenti di DNA dipende dal loro peso molecolare: quelli piccoli migrano più rapidamente attraverso la matrice di agarosio rispetto a quelli di elevate dimensioni. Terminata la corsa i vetrini vanno tolti dalla cella e neutralizzati con un lavaggio di 5 minuti con acqua millipore e poi si fissano con alcol etilico al 70% (immersione per 5 minuti) e, infine, asciugati all'aria e conservati al buio fino al momento della colorazione.

– *Colorazione*

La colorazione del DNA può essere eseguita con argento, che richiede l'impiego di un normale microscopio, o con coloranti fluorescenti che necessitano di un microscopio a fluorescenza. La principale differenza tra le due è che la colorazione con argento è più lunga e laboriosa, ma stabile nel tempo (i vetrini possono essere conservati e riletti

successivamente), mentre la colorazione con coloranti fluorescenti è più semplice ma deve essere eseguita poco prima dell'osservazione al microscopio in quanto la fluorescenza decade nel tempo. Si consiglia di salvare le osservazioni del vetrino come immagini sul computer e creare un archivio elettronico. In alternativa per rileggere i vetrini colorati con colorante fluorescente occorre effettuare un lavaggio con etanolo, farli asciugare e all'occorrenza ricolorarli con lo stesso colorante.

– *Osservazione vetrini*

I campioni non irradiati presentano cellule con nucleo integro e senza coda o con debole scia. In alcuni casi è possibile osservare un certo numero di cellule, non rappresentativo, con forme diverse e comete con distribuzione non omogenea. I campioni irradiati, invece, mostrano solo comete prevalentemente con profilo omogeneo per forma e intensità.

Per visualizzare la colorazione del DNA con argento nelle cellule fissate su vetrino si utilizza un normale microscopio. Nella Figura 3, a titolo di esempio, sono mostrate le micrografie di frammenti di DNA, colorati con argento, ottenute da campioni di carne di vitello fresca non trattata e irradiata a 3 kGy. La colorazione del vetrino è permanente e l'osservazione al microscopio può essere effettuata anche dopo lunga conservazione.

Per visualizzare la colorazione del DNA nelle cellule fissate su vetrino con arancio di acridina al microscopio a fluorescenza è necessario utilizzare dei filtri tra 460-485 nm. La colorazione del DNA (doppio filamento) apparirà di colore verde, mentre il fondo e i frammenti cellulari appariranno di colore arancio (Figura 4).

La colorazione del DNA nelle cellule fissate su vetrino con ioduro di propidio o bromuro di etidio al microscopio a fluorescenza richiede l'utilizzo di filtri tra 515 e 560 nm e un ulteriore filtro a banda < 590 nm. La colorazione del DNA apparirà di colore rosso (Figura 5). I coloranti ioduro di propidio e bromuro di etidio sono, però, poco usati per applicazioni del saggio *DNA Comet* in campo alimentare.

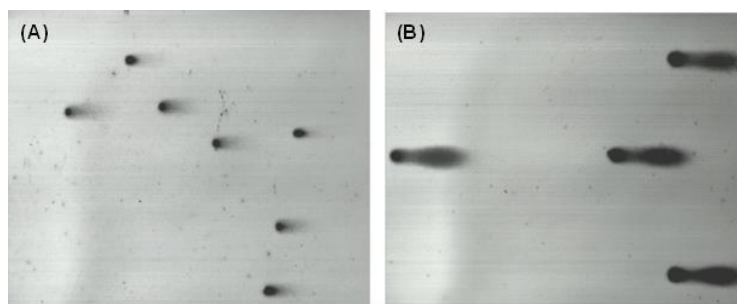


Figura 3. Micrografie di frammenti di DNA ottenute da campioni di carne di vitello fresca non trattata (A) e irradiata a 3 kGy (B). Colorazione con argento. Ingrandimento 20X

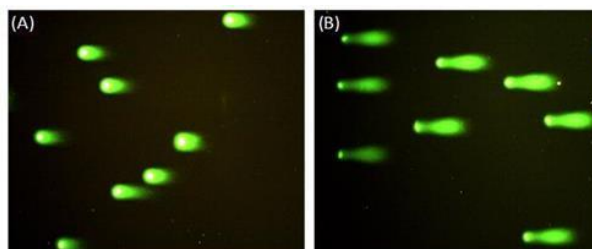


Figura 4. Micrografia di frammenti di DNA ottenute da campioni di carne di maiale congelata non trattata (A) e irradiata a 3 kGy (B). Colorazione con arancio di acridina. Ingrandimento 20X

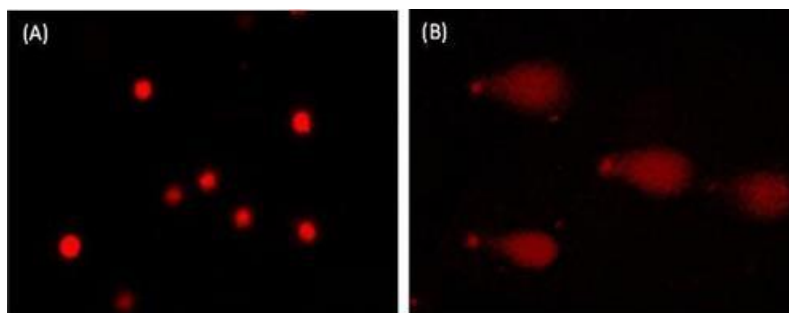


Figura 5. Micrografia di frammenti di DNA di cellule di fegato non trattate (A) e irradiate (B). Colorazione con ioduro di propidio. Ingrandimento 20X

Applicazione alle matrici del Piano

Le matrici di origine animale e non animale previste dal Piano Nazionale sono:

- *Matrici animali*: pollame con ossa e pesce con lisca
- *Matrici non animali*: aglio, patate, erbe, spezie, frutta a guscio, frutta fresca, legumi secchi e ingredienti di origine vegetale per la produzione di integratori alimentari (esclusi gli estratti vegetali)

Matrici animali

Preparazione del campione

La procedura di preparazione di una sospensione cellulare da *matrice alimentare di origine animale* può variare in funzione sia della tipologia di tessuto analizzato che del suo stato di conservazione (fresco, congelato o essiccato).

La procedura utilizzata per il pollame e il pesce è la seguente:

1. pesare 1,0-2,5 g di tessuto muscolare, privato del grasso visibile e sminuzzato con un bisturi. Trasferire in un beaker con 5 mL di PBS (tampone fosfato a pH 7.4) freddo e agitare in ghiaccio per 5 minuti a 500 rpm. Filtrare la sospensione cellulare ottenuta prima con un velo di garza sterile e poi con filtro di nylon da 500 μm e da 200 μm . Lasciare sedimentare in ghiaccio per 5 minuti; nel caso del midollo osseo, circa 50-100 mg di materiale viene trasferito in PBS freddo e disgregato con l'aiuto di una spatolina. La sospensione deve essere filtrata prima dell'uso con filtro in nylon con maglia da 100 μm e lasciata sedimentare per 5 minuti. Il soprannatante così ottenuto viene utilizzato per il saggio.
2. prelevare 1000 μL di agarosio (0,8% in PBS) riscaldato a 45°C e aggiungere 100 μL di sospensione cellulare. Montare il vetrino con 100 μL del mix ottenuto. Mantenere in ghiaccio per almeno 15 minuti al fine di garantire la solidificazione dell'agarosio;
3. immergere i vetrini in una soluzione di SDS 2,5% per 5 minuti al buio, successivamente immergere i vetrini nel tampone di corsa TBE per altri 5 minuti (condizionamento) e infine avviare corsa elettroforetica a 2 V/cm (30V) per 2 minuti. Al termine della corsa immergere i vetrini prima in acqua millipore per 5 minuti e poi in etanolo ghiacciato per altri 5 minuti;
4. colorare i vetrini con argento o con un colorante fluorescente seguendo la procedura descritta nel metodo UNI EN 13784.

Valutazione dei risultati

La valutazione dei risultati si basa sia su dati ottenuti nel corso di test di validazione internazionali e nazionali che su dati di letteratura. Il metodo risulta efficace per la discriminazione dei campioni di tessuto animale trattati con radiazioni ionizzanti sia freschi che congelati nell'intervallo di dose da 1 a 5 kGy. A titolo di esempio, nelle Figure 6 e 7 sono riportate le micrografie delle comete di DNA ottenute da campioni rappresentativi del pollame (pollo) e campioni di pesce (salmone) irradiati e non irradiati.

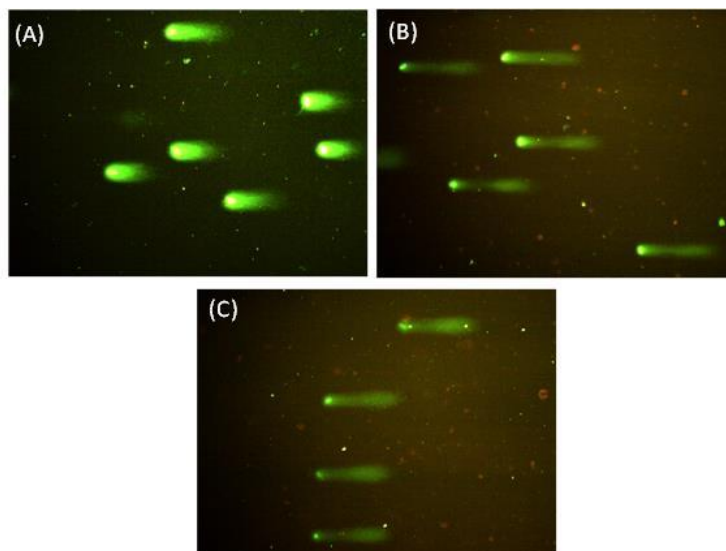


Figura 6. Micrografia di comete di DNA ottenute da pollo fresco non trattato (A) e trattato con 1 kGy (B) e 3 kGy (C). Colorazione con arancio di acridina. Ingrandimento 20X

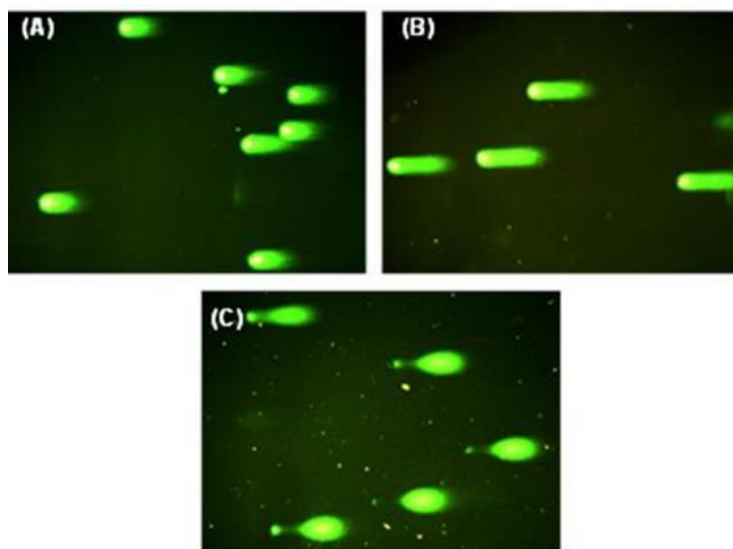


Figura 7. Micrografia di comete di DNA ottenute da salmone fresco non trattato (A) e trattato con 1kGy (B) e 3 kGy (C). Colorazione con arancio di acridina. Ingrandimento 20X

Nei campioni non irradiati si osservano solo cellule integre e isolate piuttosto omogenee e di forma ovoidale. In tutti i campioni irradiati ai vari livelli di dose, invece, non si osservano cellule integre, ma la presenza di comete con un pattern omogeneo per forma e fluorescenza. In particolare la fluorescenza delle comete aumenta d'intensità all'aumentare della dose con progressivo allungamento della scia/coda. Le immagini riportate nelle Figure 6 e 7 presentano un background di fondo accettabile.

Per la classificazione dei campioni si utilizza lo schema decisionale della Tabella 1.

Tabella 1. Metodo UNI EN 13784: schema decisionale applicato alle matrici animali del Piano

Matrice	Osservazione Vetrino	Esito	Azioni
Pollame con ossa e pesce con lisca	Presenza di pattern omogeneo di cellule integre	non irradiato	nessuna
	Presenza di pattern omogeneo di comete	irradiato	Richiesta analisi di conferma

Il metodo UNI EN 13784 applicato a matrici animali richiede il riesame dei campioni positivi con uno degli altri metodi previsti dal Piano.

Matrici non animali

Preparazione del campione

La procedura per l'esame delle matrici di origine non animale (aglio e patate, erbe e spezie, frutta fresca, frutta con guscio, legumi secchi e ingredienti di origine vegetale per la produzione di integratori alimentari ad esclusione degli estratti vegetali) è simile a quella descritta per le matrici di origine animale, ma alcuni parametri sono variabili perché le categorie alimentari interessate sono molto diverse tra di loro per caratteristiche fisiche e stato di conservazione. Prima di iniziare l'analisi accertarsi che il campione non abbia subito un processo di tostatura e/o salatura che potrebbe inficiare il risultato.

La preparazione del campione varia sia in funzione delle caratteristiche del tessuto (es. presenza di guscio, buccia o polpa), che della categoria di alimento (es. legumi, frutta secca, frutta fresca, cereali, semi, ecc.). In particolare per quanto riguarda i *semi*, *la frutta a guscio e le spezie* il campione viene frammentato con mortaio e pestello in ghiaccio (rimuovendo, se presente, il guscio esterno prima della frantumazione). Per le *patate*, il meristema viene direttamente tagliato con un bisturi a fettine sottili e trasferite in un becher per le operazioni successive. Per le *fragole* è necessario isolare gli acheni, per raccolta o per miscelazione con una grande quantità di acqua per favorire la sedimentazione di quelli più pesanti.

Di seguito viene riportato un elenco esemplificativo dei passaggi previsti per l'analisi.

1. Pesare una quantità idonea di campione in base al tipo di matrice:
 - 1,0-2,5 g di aglio o patate (meristema);
 - 0,5-1,0 g di erbe o spezie o semi essiccati;
 - 1,5 g di polpa di frutta fresca; in presenza di semi recuperare 0,5 g di semi, essicarli a temperatura ambiente e frammentarli con mortaio;
 - 0,5-1,0 g di frutta secca;
 - 0,5 g di legumi secchi e ingredienti di origine vegetale per la produzione di integratori alimentari.

2. Trasferire il campione in un becher con 3 mL di PBS freddo. Agitare in ghiaccio per 5 minuti a 500 rpm. Filtrare la sospensione cellulare ottenuta prima con un velo di garza sterile, poi con filtro di nylon da 200 μm e infine da 100 μm . Lasciare sedimentare in ghiaccio per 8-45 minuti;
3. Prelevare 1000 μL di agarosio (0,8% in PBS) riscaldato a 45°C e aggiungere 300 μl di sospensione cellulare. Montare il vetrino con 100 μl del mix ottenuto. Mantenere in ghiaccio per almeno 15 minuti al fine di garantire la solidificazione dell'agarosio;
4. Immergere i vetrini in una soluzione di SDS 2,5% per 5 – 80 minuti al buio, successivamente immergere i vetrini nel tampone di corsa TBE per altri 5 minuti (condizionamento) e infine avviare la corsa elettroforetica a 2 V/cm (30V) per 2 minuti. Al termine della corsa immergere i vetrini prima in acqua millipore per 5 minuti e poi in etanolo ghiacciato per altri 5 minuti;
5. Colorare i vetrini con argento o con un colorante fluorescente seguendo la procedura riportata nel metodo UNI EN 13784.

Valutazione dei risultati

La valutazione dei risultati si basa sia su dati ottenuti nel corso di test di validazione internazionali e nazionali che su dati di letteratura. Il metodo risulta efficace per la discriminazione dei campioni di alimenti vegetali trattati con radiazioni ionizzanti sia freschi che essiccati.

Di seguito, a titolo di esempio, sono riportate le micrografie delle comete di DNA ottenute da un campione rappresentativo per ogni categoria alimentare vegetale, irradiato e non irradiato (Figure 8-13) con il relativo intervallo di dose.

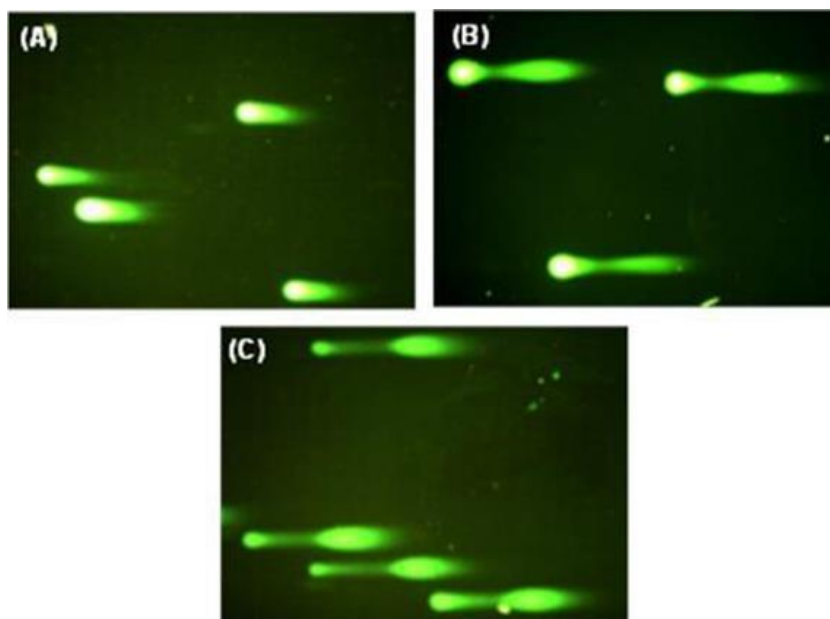


Figura 8. Micrografia di comete di DNA ottenute da aglio fresco non trattato (A) e trattato con 1 kGy (B) e 3kGy (C). Colorazione con arancio di acridina. Ingrandimento 20X.

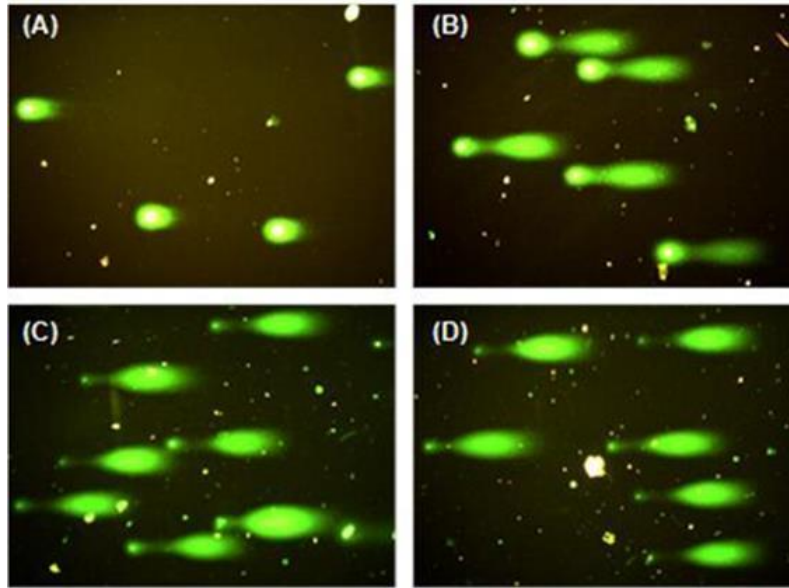


Figura 9. Micrografia di comete di DNA ottenute da peperoncino essiccato non trattato (A) e trattato con 5 kGy (B), 10 kGy (C) e 15 kGy (D). Colorazione con arancio di acridina. Ingrandimento 20X

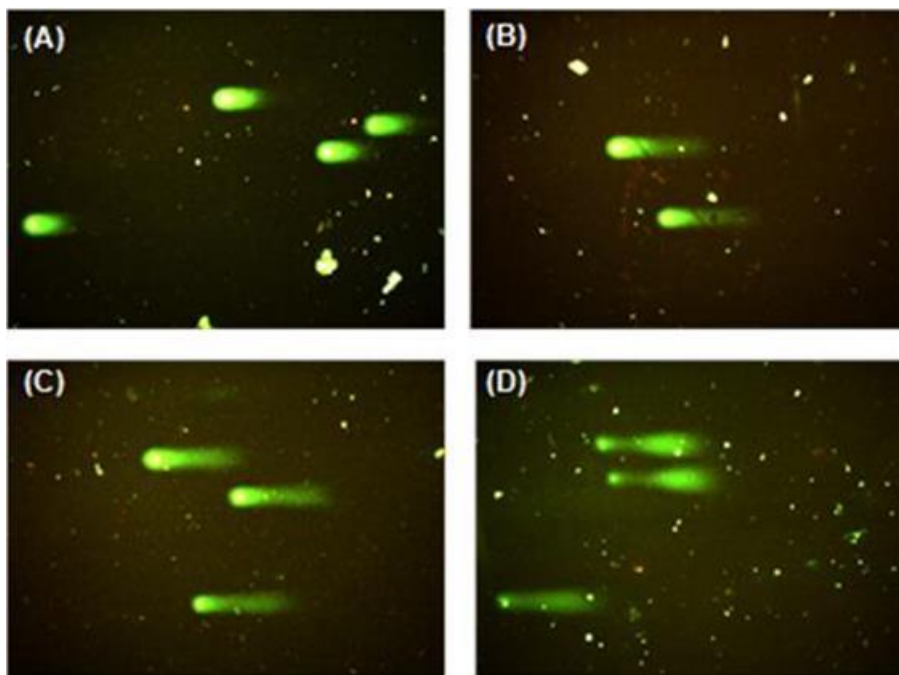


Figura 10. Micrografia di comete di DNA ottenute da mirtilli freschi non trattati (A) e trattati con 1 kGy (B), 2 kGy (C) e 3kGy (D). Colorazione con arancio di acridina. Ingrandimento 20X

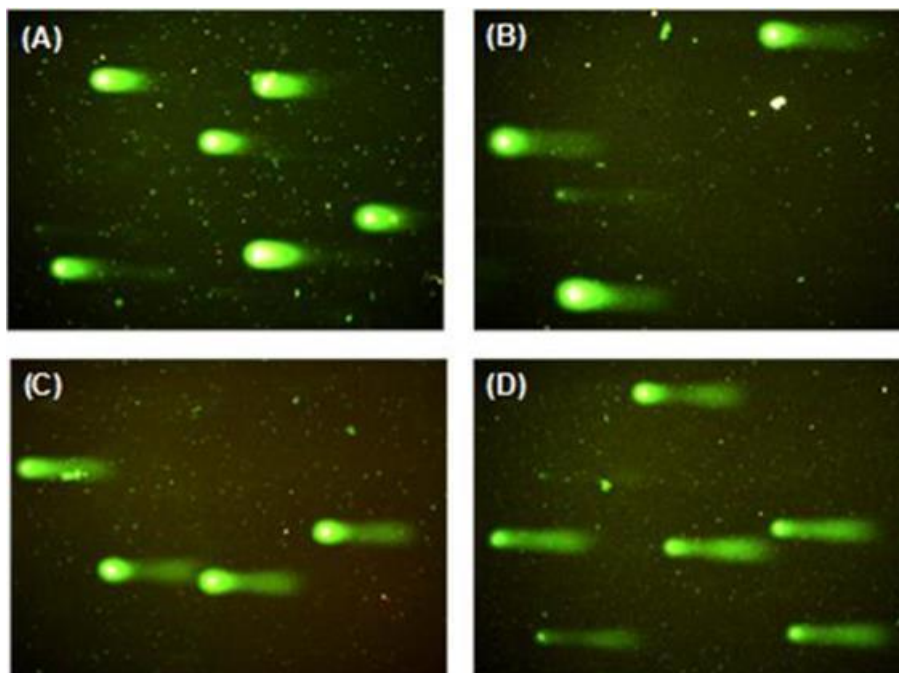


Figura 11. Micrografia di comete di DNA ottenute da arachidi non trattate (A) e trattate con 0,5 kGy (B), 1kGy (C) e 1,5 kGy (D). Colorazione con arancio di acridina. Ingrandimento 20X

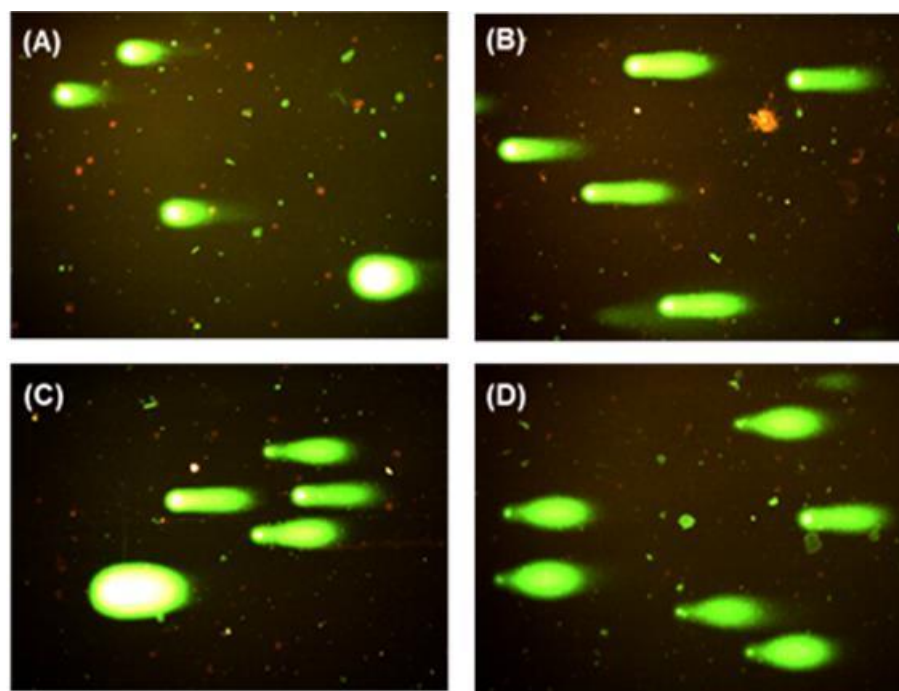


Figura 12. Micrografia di comete di DNA ottenute da lenticchie essiccate non trattate (A) e trattate con 0,5 kGy (B), 1kGy (C) e 1,5 kGy (D). Colorazione con arancio di acridina. Ingrandimento 20X

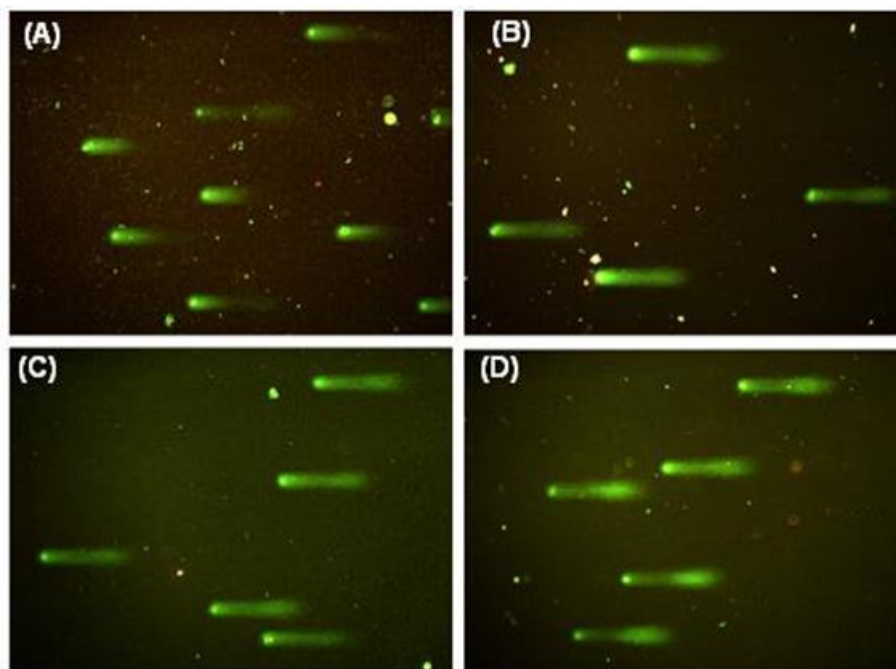


Figura 13. Micrografia di comete di DNA ottenute da semi di lino essiccati non trattati (A) e trattati con 0,5 kGy (B), 1kGy (C) e 1,5 kGy (D). Colorazione con arancio di acridina. Ingrandimento 20X

In generale nei campioni non irradiati si osservano solo cellule isolate e integre o con debole scia con assenza di comete. In tutti i campioni irradiati, per ogni dose di trattamento, non si osservano cellule integre, ma solo *pattern* omogenei di comete che non lasciano dubbi sull'avvenuto trattamento fisico. Inoltre si osserva che all'aumentare della dose impiegata aumenta in modo proporzionale la densità dei frammenti di DNA nella coda e l'intensità della fluorescenza, con conseguente allungamento della coda. In tutte le dosi e nel campione di controllo negativo si nota un background accettabile.

Inoltre si evidenzia che in molte matrici vegetali, in modo particolare nei legumi, è presente il fenomeno della poliploidia sia nei campioni non irraggiati che in quelli irradiati. Questo fenomeno è particolarmente evidente nei legumi, dove si evidenziamo tre dimensioni cellulari (Figura 12).

Per la classificazione dei campioni si utilizza lo schema decisionale della Tabella 2.

Tabella 2. Metodo UNI EN 13784: schema decisionale applicato alle matrici non animali del Piano

Matrice	Osservazione Vetrino	Esito	Azioni
Aglio, patate, erbe, spezie, frutta a guscio, frutta fresca, legumi secchi e ingredienti di origine vegetale per la produzione di integratori alimentari (esclusi gli estratti vegetali)	Presenza di pattern omogeneo di cellule integre	non irradiato	nessuna
	Presenza di pattern omogeneo di comete	irradiato	Richiesta analisi di conferma

Il metodo UNI EN 13784 applicato a matrici non animali richiede il riesame dei campioni positivi con uno degli altri metodi previsti dal Piano.

Bibliografia di riferimento

- Cerda H, Delincée H, Haine H, Rupp H. The DNA comet assay as a rapid screening technique to control irradiated food. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1997;375(2):167-81.
- Cerda H. Detection of irradiated fresh chicken, pork and fish using the DNA comet assay. *LWT-Food Science and Technology* 1998; 31(1):89-92.
- Cetinkaya N, Ercin D, Özvatan S, Erel Y. Quantification of applied dose in irradiated citrus fruits by DNA Comet Assay together with image analysis. *Food chemistry* 2016;192:370-3.
- Chung HW, Delincée H, Han SB, Hong JH, Kim HY, Kim MC, Kwon JH. Trials to identify irradiated chestnut (*Castaneabungena*) with different analytical techniques. *Radiation Physics and Chemistry* 2004; 71(1):181-4.
- Delincée H. Detection methods for irradiated foods – an overview. *Radiation Physics and Chemistry* 1996;48:378-9.
- Dhawan A, Bajpayee M and Parmar D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell biology and toxicology* 2009;25(1):5-32.
- Europa. Direttiva 1999/2/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 febbraio 1999 relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti gli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* n. L 66/16 del 13 marzo 1999.
- Farkas J. Irradiation as a method for decontaminating food: a review. *International journal of food microbiology* 1998;44(3):189-204.
- Gichner T, Patkova Z, Kim JK. DNA damage measured by the Comet assay in eight agronomic plants. *Biologia plantarum* 2003;47(2):185-8.
- Gichner T, Patková Z, Száková J, Žnidar I, Mukherjee A. DNA damage in potato plants induced by cadmium, ethyl methanesulphonate and γ -rays. *Environmental and Experimental Botany* 2008;62(2): 113-9.
- Horak CI, Di Giorgio M, Kairiyama E. Identification of irradiated apples for phytosanitary purposes. *Radiation Physics and Chemistry* 2009;78(7):707-9.
- ISO 3696. *Water for Analytical Use – Specification and Test Methods*. Geneva: International Organization for Standardisation; 1987.
- Jo D, Kwon JH. Detection of radiation-induced markers from parts of irradiated kiwifruits. *Food Control* 2006;17(8):617-21.
- Khan AA, HM Khan. DNA comet assay: A simple screening technique for identification of some irradiated foods. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 2008;275(2):337-42.
- Khan AA, Khan HM, Delincée H. DNA Comet Assay—a rapid screening method for detection of irradiated cereals and tree nuts. *Food Control* 2005;16(2):141-6.
- Khawar A, Bhatti IA, Khan QM, Khan AI, Asi MR, Ali T. Evaluation of irradiation in foods using DNA Comet assay. *Journal of Food Science and Technology* 2011;48(1):106-9.
- Koppen G, Cerda H. Identification of low-dose irradiated seeds using the neutral comet assay. *LWT-Food Science and Technology* 1997;30(5):452-7.
- Lanier C, Manier N, Cuny D, Deram A. The comet assay in higher terrestrial plant model: Review and evolutionary trends. *Environmental Pollution* 2015;207:6-20.
- Lindahl T, Andersson A. Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 1972; 11(19):3618-23.

- Marin-Huachaca NS, Lamy-Freund MT, Mancini-Filho J, Delincée H, Villavicencio ALC. Detection of irradiated fresh fruits treated by e-beam or gamma rays. *Radiation Physics and Chemistry* 2001;63(3):419-22.
- Marín-Huachaca NS, Mancini-Filho J, Delincée H, Villavicencio ALC. Identification of gamma-irradiated papaya, melon and watermelon. *Radiation Physics and Chemistry* 2004;71(1):193-6.
- Merino L, Cerda H. Control of imported irradiated frozen meat and poultry using the hydrocarbon method and the DNA comet assay. *European Food Research and Technology* 2000; 211(4): 298-300.
- Ministero della Salute. *Piano nazionale di controllo ufficiale sugli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti*. Roma: Ministero della Salute; 2015.
- Olive PL, Durand RE, Banath JP, Johnston PJ. Analysis of DNA damage in individual cells. *Methods in cell biology* 2001;64:235-49.
- Park JH, Park YK, Park E. Antioxidative and antigenotoxic effects of garlic (*Allium sativum* L.) prepared by different processing methods. *Plantfoods for human nutrition* 2009; 64(4):244-9.
- Redmond GA, Gormley TR, Butler F. The effect of short-and long-term freeze-chilling on the quality of mashed potato. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2003; 4(1):85-97.
- UNI EN 13784:2002. Prodotti alimentari: saggio DNA Comet per la ricerca di prodotti alimentari irraggiati - metodo per screening. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2002.

METODO BASATO SU GASCROMATOGRAFIA E SPETTROMETRIA DI MASSA

A. Eugenio Chiaravalle, Michele Mangiacotti, Maria Campaniello, Giuliana Marchesani
 Centro di Riferenza Nazionale per la Ricerca della Radioattività nel Settore Zootecnico-Veterinario,
 Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia

Il trattamento con radiazioni ionizzanti provoca la scissione dei trigliceridi presenti negli alimenti in diversi punti della molecola dando origine ad esteri metilici degli acidi grassi, acidi grassi liberi, aldeidi, 2-alchilciclobutanoni (2-ACB), idrocarburi saturi e insaturi (Figura 1).

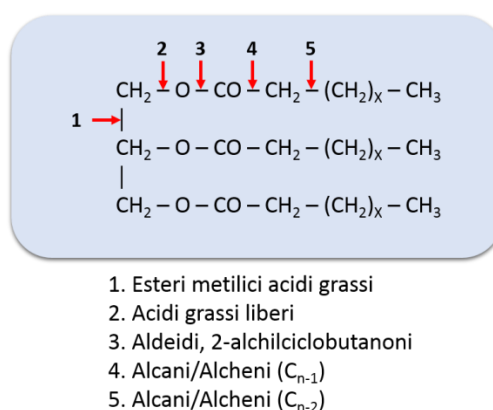


Figura 1. Prodotti di radiolisi dei trigliceridi

In particolare, quando durante l'irraggiamento viene scisso l'ossigeno acilico legato nei trigliceridi, si formano nuove molecole specifiche del processo di irraggiamento, i 2-alchilciclobutanoni (2-ACB), contenenti lo stesso numero di atomi di carbonio dell'acido grasso progenitore con il gruppo alchilico localizzato in posizione 2 nell'anello. Il tipo di 2-ACB formato dipende dalla composizione in acidi grassi dell'alimento, come indicato in Tabella 1.

Tabella 1. Acidi grassi e relativi 2-ACB generati

Acido grasso	2-Alchilciclobutanone derivato
Acido palmitico (16:0)	2-Dodecilciclobutanone (2-DCB)
Acido stearico (18:0)	2-Tetradecilciclobutanone (2-TCB)
Acido oleico (18:1)	2-(5' - tetradecenil) ciclobutanone
Acido linoleico (18:2)	2-(5',8' - tetradecadienil) ciclobutanone
Acido linolenico (18:3)	2-(5', 8', 11' - tetradecatrienil) ciclobutanone

Il metodo, basato sulla gascromatografia/spettrometria di massa, per la determinazione dei 2-alchilciclobutanoni, approvato dal CEN (*Comité Européen de Normalisation*) e recepito

dall'UNI, indicato per l'identificazione dell'irraggiamento nelle matrici del "Piano nazionale di controllo ufficiale sugli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti", è il seguente:

- UNI EN 1785:2004 – Ricerca di alimenti irraggiati contenenti grasso. Analisi mediante gascromatografia/spettrometria di massa dei 2-alchilciclobutanoni.

Gascromatografia e spettrometria di massa

Gascromatografia

La gascromatografia è una tecnica cromatografica utilizzata per la separazione e l'analisi di miscele gassose o gassificabili (liquidi o solidi volatilizzabili e stabili nelle condizioni di volatilizzazione). I componenti fondamentali in un gascromatografo sono:

- il *sistema di alimentazione dei gas* costituito da uno o più generatori di gas necessario per mantenere costante nel tempo la pressione/portata dei gas;
- l'*iniettore*, un sistema di introduzione del campione in cui la miscela da analizzare è introdotta mediante una microsiringa in una camera dove un gas, che fluisce con un ben definito flusso costante, trasporta il campione da analizzare in una colonna contenente la fase stazionaria;
- il *forno termostato* al cui interno è presente la colonna cromatografica, che permette di mantenere la colonna alla temperatura desiderata, costante o variabile (temperatura programmata);
- la *colonna* dove avviene la separazione dei componenti della miscela e che ha la funzione di contenere la fase stazionaria e di permettere il contatto con la fase mobile costituita da un gas inerte generalmente elio. Ogni componente del campione si distribuisce in modo caratteristico tra la fase stazionaria e la fase mobile, questa distribuzione è legata a fenomeni di ripartizione o di adsorbimento. I composti saranno trattiene lungo la colonna con forza diversa e percorreranno la colonna in tempi diversi determinando la separazione dei vari componenti la miscela. Esistono due tipi di colonna in base alle caratteristiche dimensionali: le *colonne impaccate* in cui la fase stazionaria è un materiale poroso (un solido poroso o un liquido disperso su un supporto inerte) che riempie in maniera omogenea ed uniforme l'intera colonna, o le *colonne capillari*, largamente utilizzate, in cui la fase stazionaria è un liquido che ricopre la parete interna di un microtubo rivestito da un film molto sottile.
- il *rivelatore* (o detector) che consente di indicare la presenza e determinare quantitativamente le sostanze eluite dalla colonna. Il rivelatore in generale deve essere sensibile, stabile e deve fornire una risposta lineare per il maggior numero di sostanze in un campo di concentrazione idoneo.
- il *sistema di registrazione di dati* (in genere un computer).

Nel caso del gascromatografo spettrometro di massa (GC-MS) i composti che man mano eluiscono dalla colonna gascromatografica sono introdotti in un rivelatore costituito da uno spettrometro di massa realizzando un accoppiamento adatto allo studio di miscele complesse che consente di ottenere informazioni quali/quantitative degli spettri di massa dei singoli componenti.

Lo spettro di massa è un grafico che riporta i singoli ioni in funzione della loro abbondanza relativa.

Spettrometria di massa

La spettrometria di massa (*Mass Spectrometry*, MS) è una tecnica basata sulla ionizzazione delle molecole e sulla successiva frammentazione delle molecole ionizzate (instabili) in ioni con diverso rapporto massa/carica (m/z). Il diagramma che riporta l'abbondanza di ogni ione in funzione del rapporto massa/carica (m/z), detto spettro di massa, è tipico di ogni composto in quanto direttamente correlato alla sua struttura chimica e alle condizioni di ionizzazione a cui è stato sottoposto.

In Figura 2 è riportato lo schema a blocchi di uno spettrometro di massa a quadrupolo connesso ad un gascromatografo: nel sistema gascromatografico, già descritto, avviene l'introduzione e la separazione dei componenti della miscela da analizzare, nella sorgente la ionizzazione delle molecole, nell'analizzatore la separazione degli ioni in base al rapporto m/z e infine nel detector il segnale prodotto viene amplificato e registrato.

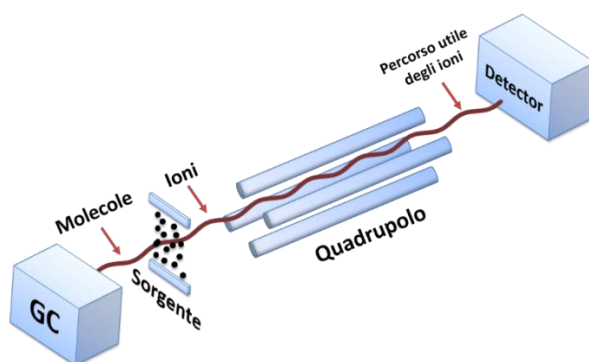


Figura 2. Rappresentazione semplificata di uno spettrometro di massa a quadrupolo connesso ad un gascromatografo (GC)

La *sorgente* è quella parte dello spettrometro racchiusa in uno spazio delimitato detto camera di ionizzazione in cui avviene la ionizzazione. Gli ioni prodotti sono spinti al di fuori della camera attraverso una fenditura da un alto potenziale e trasmessi all'analizzatore dello spettrometro per essere separati in base al loro rapporto massa/carica. Esistono diverse tecniche di ionizzazione, ma la ionizzazione ad impatto elettronico (EI) è quella maggiormente utilizzata negli spettrometri di massa interfacciati con un GC. Nella EI vi è un filamento costituito da tungsteno che, per riscaldamento (1800°C) ottenuto mediante passaggio di corrente (3,8-4,8 A), emette elettroni. Gli elettroni emessi sono poi accelerati nella sorgente, attraverso un foro di ingresso, da una differenza di potenziale fra il filamento e il blocco della sorgente. L'energia elettronica utilizzata è per convenzione pari a 70 eV alla quale si ha la massima resa ionica. Gli elettroni cedono parte della loro energia alle molecole del campione presenti in sorgente determinando la rimozione degli elettroni più esterni delle molecole neutre con conseguente produzione di ioni carichi positivamente. Lo ione prodotto avrà lo stesso peso molecolare della molecola neutra e sarà chiamato ione molecolare. Inoltre gli elettroni prodotti nella sorgente EI hanno generalmente una energia pari a 70 eV, questo significa che posseggono più energia di quanta sia necessaria per rimuovere un elettrone esterno. Tale energia può essere sufficiente a promuovere la rottura di legami chimici, con conseguente formazione di ioni con una massa inferiore a quella dello ione molecolare detti ioni frammento.

Nell'*analizzatore* la separazione degli ioni secondo il loro rapporto m/z può essere effettuata mediante l'utilizzo di un campo elettrico, di un campo magnetico o dei due campi accoppiati.

L'analizzatore maggiormente utilizzato nei GC-MS è il quadrupolo costituito da quattro cilindri paralleli e conduttori, collegati a due a due con un voltaggio a corrente continua (DC) ed un potenziale a radiofrequenza (RF) per ciascuna coppia. La combinazione di questi due campi permette agli ioni di transitare fra le quattro barre metalliche compiendo delle traiettorie molto complesse. In particolare sono possibili due tipi di moto all'interno del quadrupolo: un moto di oscillazione dello ione lungo l'asse z con conseguente uscita dalla parte opposta in direzione del detector, mentre l'altro è un moto instabile nel quale lo ione fuoriesce dall'asse z e, urtando contro uno degli elettrodi, viene neutralizzato. Scegliendo opportunamente i parametri quadrupolari si può fare in modo che un solo ione con un determinato valore del rapporto m/z passi di volta in volta attraverso l'analizzatore e raggiunga il collettore, mentre gli ioni con valori m/z finiranno contro le barre metalliche e verranno neutralizzati.

Modalità di acquisizione dei dati

L'acquisizione dello spettro di massa può essere effettuata in diverse modalità:

- *Full Scan* in cui si effettua una scansione qualitativa di tutte le masse formate in sorgente e trasmesse in maniera sequenziale al detector in un determinato range di masse (selezionato dall'operatore). Il cromatogramma è dato dalla corrente ionica totale (*Total Ion Current*, TIC) in funzione del tempo di ritenzione. Questa modalità di acquisizione consente di ottenere un elevato numero di informazioni qualitative, ma è poco selettiva e poco adatta per la ricerca di sostanze in traccia.
- *Selected o Single Ion Monitoring (SIM)* è una modalità di acquisizione in cui vengono monitorati uno o più ioni con particolari rapporti massa/carica. In particolare gli ioni formati in sorgente vengono accumulati nell'analizzatore dove sono selezionati in base ad uno specifico rapporto m/z , e poi isolati per poter essere inviati al detector per la rivelazione. Lo spettro di massa SIM generato presenta le intensità degli ioni selezionati in funzione del tempo e registrate in continuo.
- *Selected Reaction Monitoring (SRM) o Multiple Reaction Monitoring (MRM)* possibile solo con un analizzatore a triplo quadrupolo, viene usato per effettuare analisi target quantitative in cui sono monitorati uno o più set di reazioni, ione precursore > ione frammento. In particolare gli ioni formati in sorgente vengono accumulati nel primo analizzatore dove vengono isolati solo gli ioni detti precursori che presentano il rapporto m/z prescelto. Gli ioni precursori selezionati vengono fatti collidere nel secondo analizzatore con un gas di collisione (argon o azoto) e producono così uno o più ioni prodotto. Gli ioni prodotto vengono accumulati nel terzo analizzatore, dove sono isolati e solo gli ioni prodotto che presentano il rapporto m/z prescelto vengono emessi e inviati al detector. Come il SIM anche l'SRM o MRM consente l'analisi rapida di componenti presenti in tracce in miscele complesse, in quanto vengono monitorati solo un numero limitato di ioni prodotto.

Metodo UNI EN 1785

Il metodo UNI EN 1785 consente l'identificazione dell'irraggiamento attraverso la determinazione dei 2-ACB indotti dalla radiazione ionizzante negli alimenti contenenti grasso. Il metodo è stato validato attraverso test di validazione internazionali per l'identificazione di carni crude di pollo e maiale, uova intere liquide, formaggio camembert e salmone trattati con radiazioni ionizzanti.

Il metodo consiste nell'estrazione della frazione lipidica del campione, nell'isolamento degli alchilciclobutanoni mediante cromatografia di adsorbimento e nella successiva separazione gascromatografica e rivelazione con spettrometro di massa (GC/MS).

La fase di preparazione del campione consiste nel tagliare in pezzi grossolani il prodotto da analizzare e successivamente omogenizzarlo utilizzando ad esempio un cutter a lame rotanti. Ove possibile è preferibile prelevare la porzione di campione contenente più grasso come ad esempio la pelle. La fase di estrazione dei grassi dalla matrice, secondo quanto riportato nel metodo UNI EN 1785, viene effettuata mediante l'estrattore Soxhlet. L'estrazione può essere effettuata anche attraverso procedure diverse se si dimostra che portano agli stessi risultati. L'estrattore Soxtec System per esempio permette un notevole risparmio di tempo e di costi rispetto alla procedura riportata nel metodo, mantenendo inalterata l'efficacia dell'estrazione. Nella fase successiva all'estrazione, si procede alla determinazione del contenuto dei lipidi o su un'aliquota dell'estratto o sull'estratto totale. Una quantità pari a circa 200 mg di grasso viene quindi introdotta in una colonna cromatografica di Florisil, precedentemente disattivato (al 20%), per isolare i 2-ACB. Infine si esegue la determinazione strumentale con un sistema di gascromatografia/spettrometria di massa.

In Figura 3 è riportato il diagramma di flusso delle fasi di estrazione dei grassi e purificazione dei 2-ACB. Nel diagramma è schematizzata una delle due procedure relative alla determinazione del contenuto lipidico riportate nel metodo UNI EN 1785.

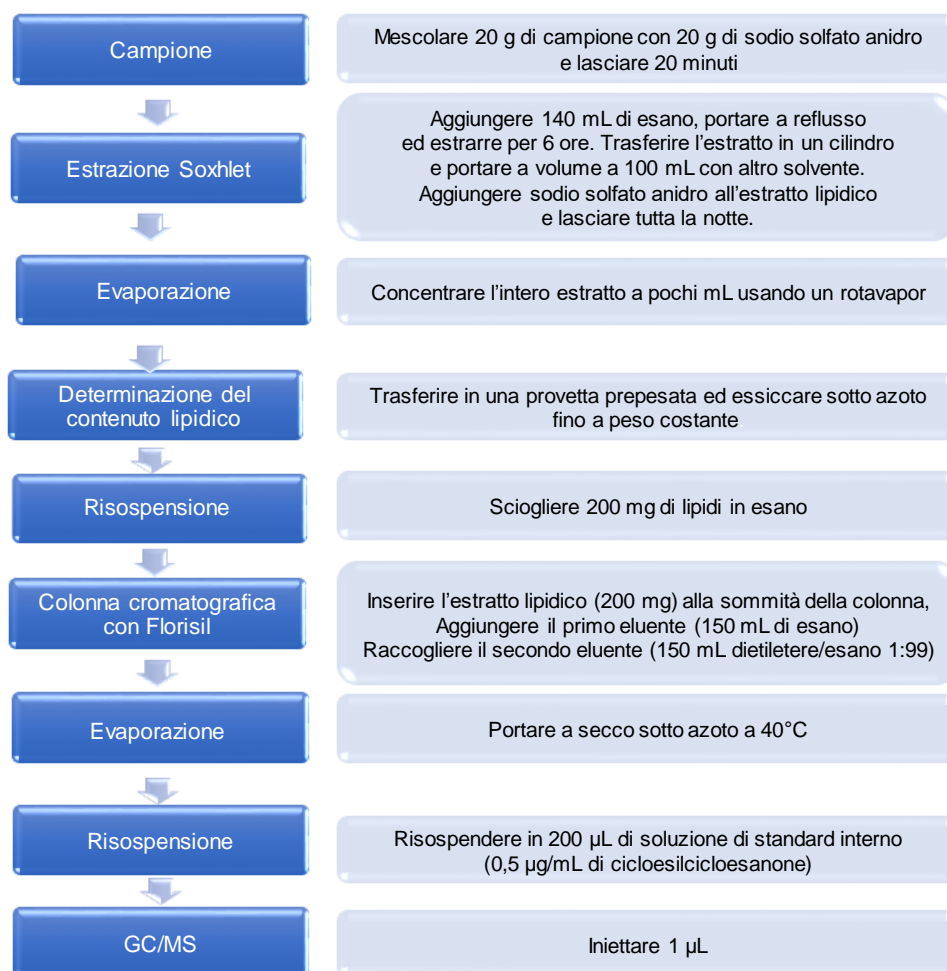


Figura 3. Diagramma di flusso delle fasi di estrazione dei grassi e purificazione dei 2-ACB

Le successive fasi di separazione gascromatografica e di identificazione dei 2-ACB vengono effettuate utilizzando colonne capillari non polari e uno spettrometro di massa, operante in modalità SIM, misurando gli ioni m/z 98 e 112. Tali frammenti sono presenti negli spettri di massa in un rapporto caratteristico: circa 4,0-4,5:1 nel caso del 2-DCB e 3,8-4,2:1 nel caso del 2-TCB. Il rapporto nel campione dovrebbe riflettere quello riscontrato negli standard o nel campione di controllo analizzati nella stessa seduta analitica.

I campioni vengono considerati irradiati quando almeno uno dei due 2-ACB è stato identificato positivamente e le concentrazioni stimate superano quelle equivalenti ad un rapporto segnale/rumore di 3:1. L'identificazione dei 2-ACB può essere effettuata oltre che in modalità SIM, così come riportato nel metodo UNI EN 1785, anche in modalità MRM selezionando, per il 2-DCB e per lo standard interno SI (2-Cicloesilcicloesano) uno ione precursore e almeno due ioni figlio in modo da garantire un numero di punti di identificazione adeguato (Tabella 2).

Tabella 2. Parametri di rivelazione in modalità MRM per il 2-DCB

Analita	ione precursore m/z	ione figlio m/z	ione figlio m/z
SI	98	83	70
2-DCB	98	83	70
	112	97	-

In Tabella 3 è riportato un esempio dei parametri utilizzati nell'analisi GC/MS e in Figura 4 è riportato un esempio di cromatogramma dello standard 2-DCB a concentrazione di 0,1 $\mu\text{g/mL}$ con relativi spettri di massa acquisiti in modalità MRM, SIM e FULL SCAN.

Tabella 3. Esempio dei parametri del metodo GC/MS per l'analisi di 2-DCB

Strumentazione	Parametri
Gascromatografo	
Colonna	FactorFour VF-5ms (30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 μm)
Programmata del forno	T1: 85°C, Hold1: 1.2 min Rate1: 15°C/min, T2: 310°C Hold2: 10 min
Carrier gas	Elio (99.999%), flusso di 1 mL/min
Programmata dell'iniettore	T1: 85°C Hold1: 0,05 min Rate1: 12°C/min, T2: 280°C Hold2: 1 min Rate2: 14,5°C/min T3: 320°C Hold3: 6,00 min
Iniezione	1 μL , modalità splitless
Tripla quadrupolo	
Temperatura transfer line	270°C
Temperatura sorgente ionica	250°C
Scan Time	SIM: 0,2 s MRM: 0.07 s
Scan Width	SIM: 0.1 m/z MRM: 0,07 m/z
Gas di collisione	Argon
Quad 1 e Quad 2	0,70 amu

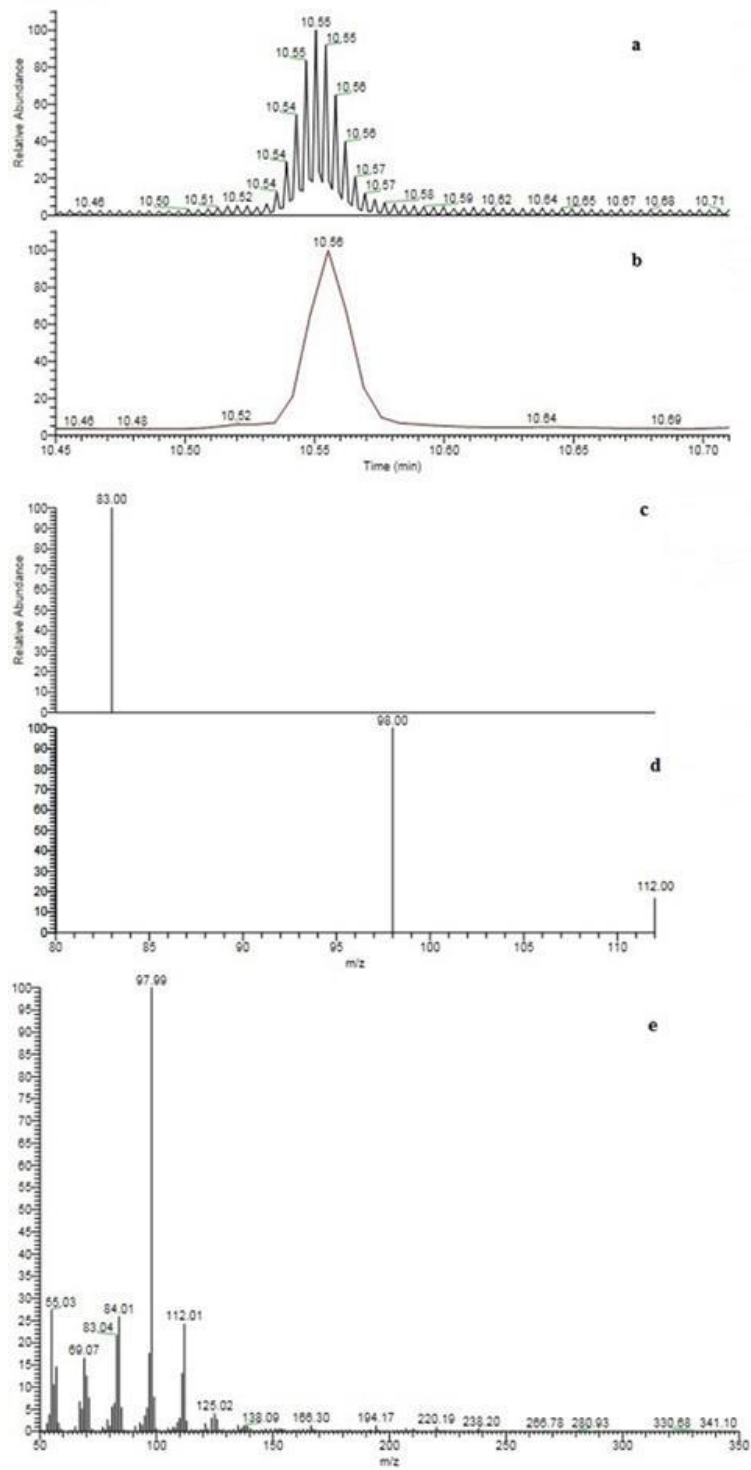


Figura 4. Cromatogramma e spettro di massa di uno standard di 2-DCB a concentrazione di 0,1 µg/mL: cromatogramma acquisito in modalità MRM (a); cromatogramma acquisito in modalità SIM o FULL SCAN (b); spettro di massa in modalità MRM (c); spettro di massa in modalità SIM (d); spettro di massa in modalità FULL SCAN (e)

L'applicabilità del metodo UNI EN 1785 presenta delle limitazioni legate ai numerosi passaggi previsti nella fase preparativa. Recentemente sono stati messi a punto e sviluppati metodi alternativi più semplici ed efficienti che utilizzano la microestrazione in fase solida in spazio di testa (*HeadSpace-Solid Phase Microextraction*, HS-SPME) abbinata alla determinazione in GC/MS, al fine di identificare il trattamento radiante e di correlare la quantità di 2-DCB presenti nel prodotto con la dose impiegata nel trattamento.

Applicazione alle matrici del Piano

Le matrici previste dal Piano che possono essere analizzate con il metodo UNI EN 1785 appartengono esclusivamente alla categoria alimentare pollame.

Matrici animali

Preparazione del campione

La preparazione consiste nel prelevare e sminuzzare una porzione di 20 g del campione in esame, avendo cura di scegliere possibilmente la parte più grassa. Proseguire con l'esecuzione di tutte le altre fasi di estrazione, purificazione e analisi gascromatografica e spettrometria di massa descritte nel metodo UNI EN 1785.

Identificazione dei 2-ACB

Per identificare positivamente la presenza di 2-ACB nel campione analizzato mediante analisi in GC/MS occorre innanzitutto verificare la presenza di un picco con un tempo di ritenzione confrontabile (entro $\pm 0,5$ %) con il tempo di ritenzione degli standard di 2-DCB o 2-TCB, oppure di un campione di controllo acquisito nella stessa seduta analitica.

Successivamente si verifica la presenza degli ioni 98 m/z e 112 m/z che devono comparire negli spettri di massa in un rapporto caratteristico:

- 4,0-4,5:1 nel caso del dodecilciclobutanone;
- 3,8-4,2:1 nel caso del tetradecilciclobutanone.

I campioni vengono considerati irradiati quando almeno uno dei due 2-ACB è stato identificato positivamente e le concentrazioni stimate superano quelle equivalenti ad un rapporto segnale/rumore di 3:1.

In caso di risultato positivo in modalità MRM occorre eseguire una scansione nell'intervallo m/z 95-115, per confermare che gli ioni m/z 98 e 112 m/z siano quelli presenti con intensità maggiore al tempo di ritenzione del 2-ACB.

Valutazione dei risultati

La valutazione dei risultati è basata sui dati ottenuti nel corso di test di validazione internazionali e nazionali e su dati presenti in letteratura.

In Figura 5 si riportano alcuni esempi di cromatogrammi ottenuti da test intralaboratorio (presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata) eseguiti su campioni di pollo irradiati a dosi comprese tra 0,5 e 5 kGy. Non è stato riscontrato alcun risultato falso negativo o falso positivo, in linea con quanto riportato in letteratura. Tutte le analisi sono state eseguite subito dopo il trattamento dei campioni irradiati al livello di dose uguale o maggiore di 0,5 kGy e ciascun campione è stato correttamente identificato sia utilizzando la modalità SIM che MRM. Poiché tutti i bianchi campione sono stati riconosciuti come non irradiati, il metodo UNI EN 1785 è risultato specifico per l'analita in esame che non risulta interferito da analiti analoghi e/o componenti della matrice.

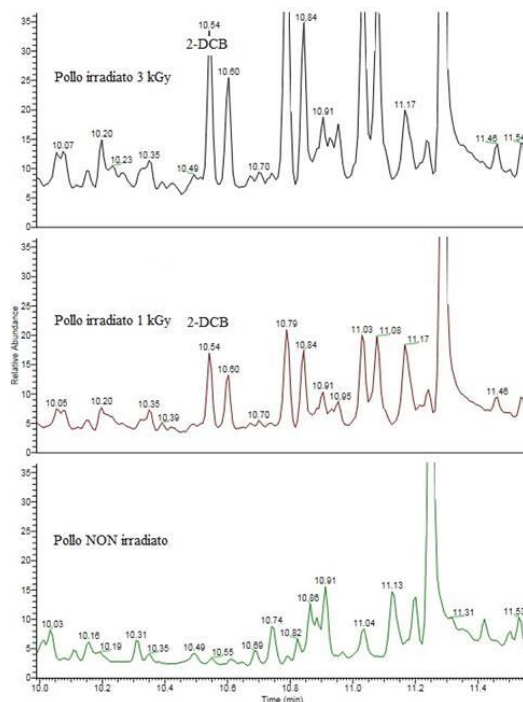


Figura 5. Sequenza di 3 spettri di campioni di pollo: irradiato a 3 Gy, irradiato a 1 kGy e non irradiato

In Tabella 4 è riportato lo schema decisionale dei parametri utilizzati per l'identificazione, attraverso il 2-DCB, dei campioni irradiati. Nel caso in cui una o più condizioni non dovessero essere rispettate l'esito del campione risulta "non irradiato".

Tabella 4. Metodo UNI EN 1785: schema decisionale applicato alle matrici del Piano

Matrice	Parametri di identificazione 2-DCB	Campione irradiato
Pollame	Tempo di ritenzione (tr)	Presenza di un picco tr campione = tr standard \pm 0,5%
	Rapporto Ionico (RI) RI= (A112 / A98) *100	RI campione = RI standard \pm 20%
	Rapporto segnale rumore (S/N)	lone m/z 98 > 3 lone m/z 112 > 3
	Full Scan m/z 95-115	lioni m/z 98 e m/z 112 con intensità maggiore

Il metodo UNI EN 1785 applicato alle matrici indicate nel Piano è di conferma e il risultato analitico (positivo o negativo) è sempre valido.

Bibliografia di riferimento

Boniglia C, Onori S, Saporà O. *Trattamento degli alimenti con radiazioni ionizzanti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2004. (Rapporti ISTISAN 04/21).

- Caja MM, del Castillo MLR, Blanch GP. Solid phase microextraction as a methodology in the detection of irradiation markers in ground beef. *Food Chemistry* 2008;110:531-7.
- Delincée H. Analytical methods to identify irradiated foods – a review. *Radiation Physics and Chemistry* 2002; 63:455-458.
- Gadgil P, Hachmeister KA, Smith JS. 2-Alkylcyclobutanones as irradiation dose indicators in irradiated ground beef patties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2002;50:5746-50.
- Herbert CG, Johnstone RAW. *Mass Spectrometry Basics*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2003.
- Marchioni E, Horvatovich P, Ndiaye B, Miesch M, Hasselmann C. Detection of low amount of irradiated ingredients in non-irradiated precooked meals. *Radiation Physics and Chemistry* 2002;63:447-50.
- Nawar WW. *The decomposition of food lipids by ionizing radiation*. In: *Proceedings International Colloquium. Identification of irradiated food*. Luxembourg: Commission of the European Communities; 1973. (EUR 5126 d/e/f/i/n). p. 117-25.
- Ndiaye B, Jamet G, Miesch M, Hasselmann C, Marchioni E. 2-Alkylcyclobutanones as markers for irradiated foodstuffs II. The CEN (European Committee for Standardization) method: field of application and limit of utilization. *Radiation Physics and Chemistry* 1999;55:437-45.
- Schreiber GA, Helle N, Bögl KW. Detection of irradiated food – methods and routine applications. *International Journal of Radiat Biology* 1993;63:105-30.
- Soncin S, Panseri S, Rusconi M, Mariani M, Chiesa LM, Biondi PA. Improved determination of 2-dodecylcyclobutanone in irradiated ground beef patties by gas-chromatography–mass-spectrometry (GC/MS) coupled with solid-phase microextraction (SPME) technique. *Food Chemistry* 2012;34:440-4.
- Stevenson MH, Kilpatrick DJ, McMurray CH. *A European collaborative blind trial using 2-dodecylcyclobutanone and 2-tetradecylcyclobutanone to detect irradiated chicken, pork and liquid whole egg*. FAO/IAEA Report. Vienna; 1994.
- Stevenson MH, Meier W, Kilpatrick DJ. *A European collaborative blind trial using volatile hydrocarbons and 2-dodecylcyclobutanone to detect irradiated chicken meat*. BCR Information, 1994. Luxembourg: Commission of the European Communities, 1994. (Report EUR/15969/en).
- Stevenson MH. Validation of the cyclobutanone protocol for detection of irradiated lipid containing foods by interlaboratory trials. In: McMurray CH, Stewart EM, Gray R, Pearce J (Ed.). *Detection methods for irradiated foods - current status*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry; 1996. p. 269-84.
- Variyar PS, Chatterjee S, Sajilata MG, Singhal RS, Sharma A. Natural existence of 2-alkylcyclobutanones. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2008;56:11817-23.

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di dicembre 2017, 12° Suppl.*

*Stampato in proprio
Settore Attività Editoriali – Istituto Superiore di Sanità*

Roma, dicembre 2017