



DIPARTIMENTO
**SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE
E SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA**

Workshop 2021

**LABORATORI NAZIONALI DI RIFERIMENTO PER I METALLI E I COMPOSTI AZOTATI
NEGLI ALIMENTI E NEI MANGIMI, PER GLI ADDITIVI NEI MANGIMI, PER I
CONTAMINANTI DA PROCESSO**

Perclorato negli alimenti: aggiornamenti normativi e analitici

Barbara De Santis - Francesca Debegnach

Laboratorio Nazionale per le Micotossine e le Tossine Vegetali Naturali
Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria
Rischio Chimico degli Alimenti



www.iss.it/sicurezza-alimentare-nutrizione-e-sanità-pubblica-veterinaria

PERCLORATO NEGLI ALIMENTI

AGGIORNAMENTI NORMATIVI E ANALITICI

Perclorato (ClO_4^-) è un contaminante emergente.
È un contaminante alimentare dell'acqua potabile e degli alimenti, presente nell'ambiente da fonti naturali e antropiche.



IL PERCLORATO

Acqua, suolo e fertilizzanti sono potenziali fonti di contaminazione da perclorato negli alimenti

Il perclorato si trova naturalmente nell'ambiente:

- si trova in miscela nei depositi di nitrato di sodio.

Come contaminante ambientale di origine antropica deriva:

- dall'uso di fertilizzanti a base di **nitrati**;
- dalla fabbricazione, uso e smaltimento del **perclorato di ammonio** utilizzato in processi industriali come propellente per razzi (applicazione principale), gonfiatore di air-bag, esplosivi, fuochi d'artificio e nei brillamenti;
- dalla degradazione **dell'ipoclorito di sodio** utilizzato come disinfettante dell'acqua.

LE FORME PRODOTTE DI PERCLORATO INCLUDONO ACIDO PERCLORICO E SALI DI AMMONIO, DI SODIO E DI POTASSIO

I SALI SONO ALTAMENTE SOLUBILI IN ACQUA.

IL PERCLORATO È STABILE IN ACQUA.

RAGGIUNGE LA CATENA ALIMENTARE:
ACQUA - ALIMENTI



IL QUADRO DELL'ANALISI DEL RISCHIO

- ✓ La contaminazione da perclorato è stata dapprima verificata negli USA negli anni 2000.
- ✓ Negli USA, i risultati di ampi studi di biomonitoraggio hanno dimostrato la presenza di livelli di background di perclorato nelle urine in una larga parte della popolazione.
- ✓ Nel 2019, l'EPA ha proposto un National Primary Drinking Water Regulation (NPDWR), proponendo un limite massimo e health-based Maximum Contaminant Level Goal
 - 18 µg/L.
 - 90 µg/L.

- ✓ Lo ione perclorato ha elevata tossicità;
- ✓ È stato caratterizzato come interferente endocrino, in grado di bloccare il recettore dello iodio nella tiroide;
- ✓ L'assunzione avviene con la dieta (sia attraverso gli alimenti vegetali che l'acqua)

- ✓ JECFA (2010) ha stabilito una PMTDI of 0.01 mg/kg bw
- ✓ CONTAM Panel (2014) sul modello matematico della BMD per gli effetti di inibizione sull'assunzione dello iodio nella tiroide, è stata stabilito un:
 - BMDL05: 0.0012 mg/kg pc die
 - TDI: 0.3 µg/kg pc

VALUTAZIONE - GESTIONE

I DATI E LE MISURE DI CONTROLLO

- EFSA (2014)
- Definizione di una dose giornaliera tollerabile di 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg pc}$ al giorno

Raccomandazione (UE) 2015/682 della Commissione - monitoraggio

Regolamento (UE) 2020/685
(modifica il reg (CE) n. 1881/2006
- tenori massimi di perclorato in alcuni alimenti

- EFSA (2017) valutazione dell'esposizione umana per il perclorato tenendo conto dei nuovi dati
- Sostanziale allineamento delle stime dei livelli di esposizione

REGOLAMENTO (UE) 2020/685

Prodotti alimentari ⁽¹⁾		Tenore massimo (mg/kg)
9.	Perclorato	
9.1.	Frutta e ortaggi ad eccezione di: — Cucurbitaceae e cavoli ricci — ortaggi a foglia ed erbe	0,05 0,10 0,50
9.2	Tè (<i>Camellia sinensis</i>), essiccato Infusioni a base di erbe e frutta, essiccate	0,75
9.3	Formule per lattanti, formule di proseguimento, alimenti a fini medici speciali destinati ai lattanti e ai bambini nella prima infanzia ^{(3) (4) (*)} Alimenti per l'infanzia ^{(3) (4)} Alimenti trasformati a base di cereali ^{(3) (29)}	0,01 0,02 0,01

(*) Le formule per la prima infanzia sono bevande a base di latte e prodotti simili a base di proteine destinati ai bambini nella prima infanzia. Tali prodotti non rientrano nel campo di applicazione del regolamento (UE) n. 609/2013 [Relazione della Commissione al Parlamento europeo e al Consiglio relativa alle formule per bambini nella prima infanzia (COM/2016/0169 final) (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?qid=1574093988200&uri=CELEX:52016DC0169>)].»

- ✓ Frutta e ortaggi
- ✓ Tè e infusi
- ✓ Alimenti per lattanti, alimenti a fini medici speciali destinati ai lattanti, alimenti per l'infanzia

(3) Per i prodotti alimentari indicati in questa categoria, si rimanda alla definizione di cui al regolamento (UE) n. 609/2013

(4) I tenori massimi si riferiscono ai prodotti pronti per l'uso (commercializzati come tali o ricostituiti secondo le istruzioni del fabbricante)

(29) Il tenore massimo si riferisce ai prodotti nella forma in cui vengono messi in vendita.

REGOLAMENTO (EC) 333/2007 (TESTO CONSOLIDATO)

REG UE 2019/2093 che modifica il regolamento (CE) n. 333/2007 per quanto riguarda l'analisi di 3-monocloro-1,2- propandiolo (3-MCPD) esteri degli acidi grassi, glicidil esteri degli acidi grassi, perclorato e acrilammide

TABELLA 1, TABELLA 2, TABELLA 3, TABELLA 4

- ✓ Suddivisione delle partite in **sottopartite** per i prodotti commercializzati **sfusi**
[$\geq 1500t$, 500 tonnellate; $>300t$ e $<1500t$, 3 sottopartite; $\geq 100t$ e $\leq 300t$, 100t; $<100t$, -]
- ✓ Suddivisione delle partite in **sottopartite** per gli altri prodotti
[≥ 15 , 15-30 t; <15 , -]
- ✓ Numero minimo di **campioni elementari** da prelevare da una partita o da una sottopartita
[<50 , 3; 50-500, 5; >500 10]
- ✓ Numero di **confezioni o unità** (campioni elementari) da prelevare per formare il campione globale nel caso di partita o sottopartita costituita da confezioni o unità singole
[≤ 25 , 1 confez.; 26-100, 5% (almeno 2 conf); >100 , 5% (al max 10 conf)]

REGOLAMENTO (EC) 333/2007 (TESTO CONSOLIDATO)

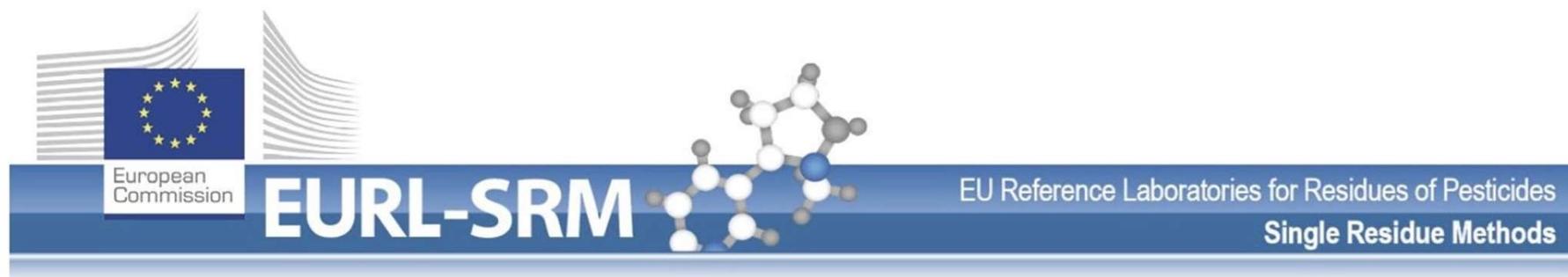
- Il **campione globale (CG)** deve essere di almeno **1 kg o 1 L**, salvo i casi in cui ciò non risulti possibile (es. il campione sia composto da una confezione o da un'unità).
- I **campioni elementari (CE)** devono avere peso/volume analogo. Ciascun CE deve pesare almeno **100 g** o avere un volume di **100 mL** per formare un CG di almeno 1 kg o 1 litro.
- **Criteri di prestazione**

Parametro	Criterio
Applicabilità	Tutti gli alimenti
Specificità	Nessuna interferenza di matrice o spettro
Ripetibilità (RSD _r)	0,66 volte l'RSD _R come derivata dall'equazione di Horwitz (modificata)
Riproducibilità (RSD _R)	Come derivata dall'equazione di Horwitz (modificata)
Recupero	70-110 %
Limite di rilevazione (LOD)	Tre decimi del LOQ
Limite di quantificazione (LOQ)	≤ due quinti del ML

(0.0012-0.06 mg/kg)

(0.004-0.2 mg/kg)

DETERMINAZIONE DEL PERCLORATO (1)

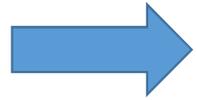


**Quick Method for the Analysis of
Numerous Highly Polar Pesticides in Food Involving
Extraction with Acidified Methanol and LC-MS/MS Measurement
*I. Food of Plant Origin (QuPpe-PO-Method)***



www.iss.it/sicurezza-alimentare-nutrizione-e-sanità-pubblica-veterinaria

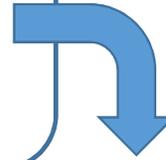
DETERMINAZIONE DEL PERCLORATO (2)



To obtain representative test-portions from the laboratory sample, proceed as required by the valid regulations and guidelines.

WEIGH sample homogenate into 50 mL centrifuge tube

- Fresh fruits and vegetables (with high water content): **10 g**
- Previously re-hydrated dry fruit: **13,5 g** (containing 5 g sample)
 - Dry commodities (dried fruits): **5 g**



ADJUST WATER CONTENT of sample to 10 mL

(Mandatory for matrices with <80% water. If no ILIS used mandatory for ALL matrices)
e.g. +10 mL of water to 5g of dried fruits
+2mLwater to10g potato
+7mLwaterto5g garlic

Add 100 µL isotopically-labeled internal standard (ILIS) mix



DETERMINAZIONE DEL PERCLORATO (3)

ADD EXTRACTION SOLVENT (10 mL methanol containing 1 % formic acid)

SHAKE thoroughly for 1 min / 15 min for dry commodities

Preferably **FREEZE-OUT** extract until completely frozen
e.g. >90min at -18 Corca. 30min at -80 C

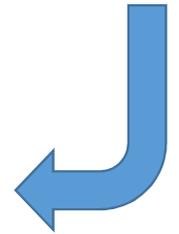
CENTRIFUGE (5 min at >3,000 g but preferably >10,000 g); preferably cryogenic centrifugation (e.g. to -10 C)
(if centrifuge is not refrigerated, swiftly proceed with centrifugation and the following step to avoid redissolution of matrix)

DETERMINAZIONE DEL PERCLORATO (4)



dSPE to Remove Lipids for High Oil Content samples (e.g. avocado):
(this step may be skipped if sample was centrifuged frozen)
TRANSFER 4 mL raw extract into a tube containing 200 mg **C18-sorbent**,
SHAKE for 1 min and **CENTRIFUGE** (>3,000 g for 5 min)

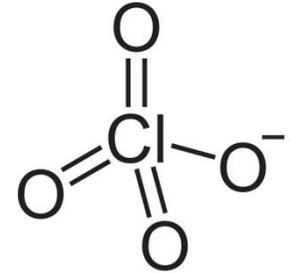
WITHDRAW SUPERNATANT AND FILTER it into a plastic autosampler vial
(use syringe filter of 0.2 µm pore size; e.g. H-PTFE)
(withdraw cold supernatant quickly after centrifugation to avoid that matrix components redissolve)



LC-MS/MS analysis



DETERMINAZIONE DEL PERCLORATO (5)



LC-MS/MS ANALYSIS (ESI-)

Hypercarb (carbon) – M1.3/M1.4 (PerChloPhos)

Eluent A 1% acetic acid in water + 5% methanol

Eluent B 1% acetic acid in methanol

Trinity Q (Hilic) – M1.5

Eluent A 50M Ammonium formate (pH 2.9) in water+acetonitrile 6+4

Eluent B mL 5 M Ammoniumformate and 4.5 mL Formic acid ad 300 mL water, add 200 mL ACN

Torus DEA (Hilic) – M1.6/M1.7

Eluent A 1.2% formic acid in water (+10 mmol ammonium formate in water)

Eluent B 0.5 % formic acid in Acetonitrile

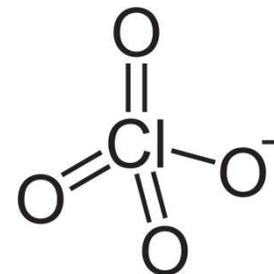
Obelisc-R (Hilic) – M2

Eluent A 50 mmol NH₄-formate in water + 0.1 % formic acid use brown glass bottles

Eluent B



DETERMINAZIONE DEL PERCLORATO



ORBITRAP (LC-HRMS) - Acquisizione *full-scan* con *data dependent* (Full MS/dd-MS²)

Sorgente

Polarità: ESI-

Sheath gas flow rate: 35 (unità arbitrarie)

Auxiliary gas flow rate: 20 (unità arbitrarie)

Sweep gas flow rate: 0

Spray voltage (kV): 3.5

Capillary temperature ° C: 280

S-lens RF level: 50 (unità arbitrarie)

Aux gas heater temperature ° C: 260

Full MS

Resolution: 70000

ACG target: 3×10^6

Maximum IT: 100 ms

Scan range: **50**-200 m/z

dd-MS²

Resolution: 17500

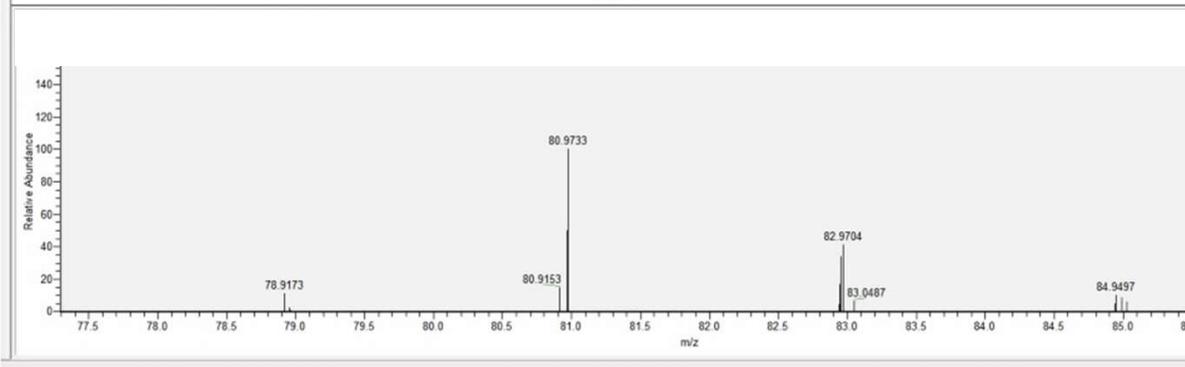
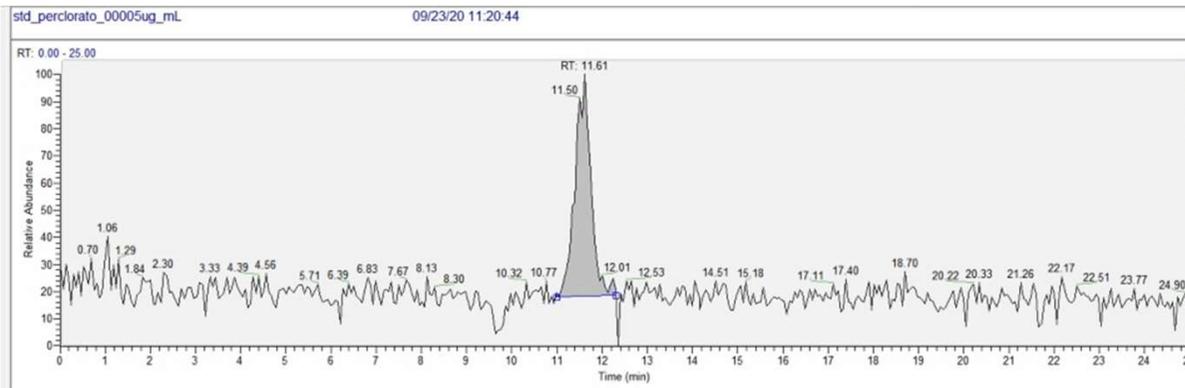
ACG target: 1×10^5

Maximum IT: 65 ms

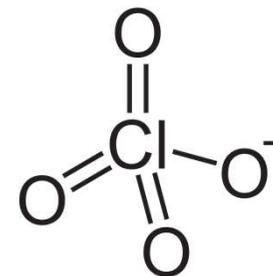
Isolation window: 1 m/z



DETERMINAZIONE DEL PERCLORATO



Compound	Parent	Fragment (m/z)
Perchlorate	99 (³⁵ Cl)	83
	101 (³⁷ Cl)	85
Perchlorate- ¹⁸ O ₄ (ILIS)	107 (³⁵ Cl)	89
	109 (³⁷ Cl)	91



0.5-5.0 ng/mL
 0.002-0.020 mg/kg
 (LOQ<0.004 mg/kg)





GRAZIE PER L'ATTENZIONE

barbara.desantis@iss.it
francesca.debegnach@iss.it

ISS

**Laboratorio nazionale per le micotossine e
le tossine vegetali naturali**



www.iss.it/sicurezza-alimentare-nutrizione-e-sanità-pubblica-veterinaria