



DIPARTIMENTO
SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE
E SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA



Ministero della Salute



istituto zooprofilattico sperimentale
della puglia e della basilicata



Workshop 20 Maggio 2021

Primo Workshop annuale del Laboratorio Nazionale di Riferimento per i trattamento degli alimenti e dei loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti

Roma - Istituto Superiore di Sanità

Metodi di conferma GC/MS per l'analisi di 2-
alchilciclobutanoni negli alimenti irradiati:
confronto tra metodo normato EN 1785:1996 e
metodo interno HS-SPME-GC/MS

Relatori: A. E. Chiaravalle, M. Campaniello

affiliazione: Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata

Metodi chimici di conferma

Norma UNI EN 1785:1996

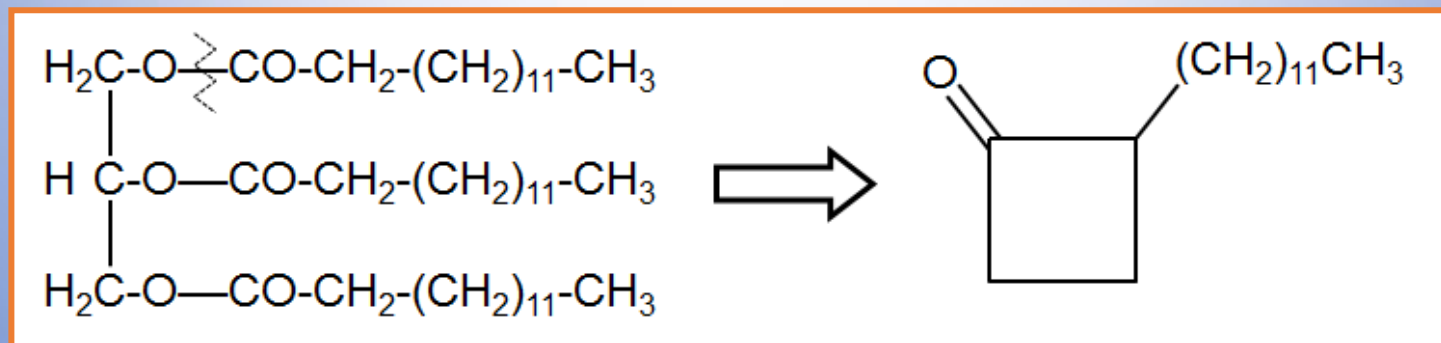
**Identificazione degli alimenti irradiati contenenti grassi
Analisi dei 2-alcilciclobutanoni mediante GC/MS**

Principio del metodo EN 1785

Analisi dei 2-alcilciclobutanoni mediante GC/MS

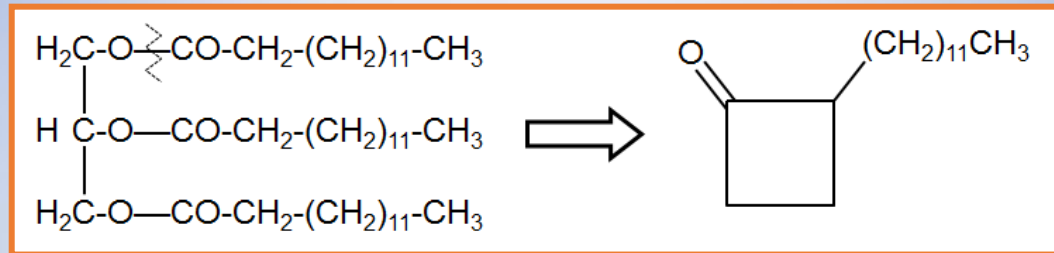
Durante l'irraggiamento l'ossigeno acilico legato nei trigliceridi viene scisso, dando luogo alla formazione di 2-alcilciclobutanoni contenenti lo stesso numero di atomi di carbonio dell'acido grasso progenitore, con il gruppo alchilico localizzato in posizione 2.

La formazione di alcilciclobutanoni è specifica del processo di irraggiamento e, a tutt'oggi, tali composti non sono stati riscontrati in alimenti non irradiati



Principio del metodo EN 1785

Analisi dei 2-alcilciclobutanoni mediante GC/MS



- Il tipo di **2-ACB** formato dipende dall'**acido grasso genitore**
 - **Acido palmitico: 2-dodecilciclobutanone (2-DCB)**
 - **Acido stearico: 2-tetradecilciclobutanone (2-TCB)**
- Il metodo prevede solo la **determinazione di 2-DCB e 2-TCB** mediante GC/MS
- Il metodo è stato **validato su carni crude di pollo e maiale e su uova intere liquide**

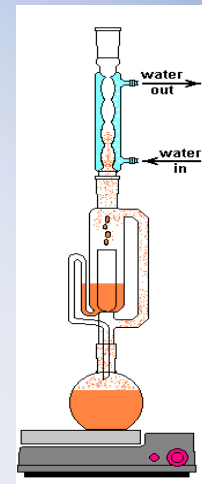
Procedura del metodo EN 1785

Analisi dei 2-alchilciclobutanoni mediante GC/MS

Fase preparativa

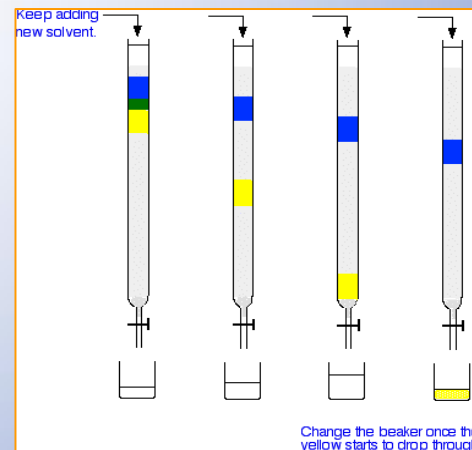
1. Estrazione della fase lipidica:

- Soxhlet con esano a refluxo per 6 h
- evaporazione overnight



2. Isolamento degli alchilciclobutanoni:

- utilizzo **colonna Florisil disattivata** (al 20%) su cui viene introdotta un'aliquota dell'estratto lipidico



1) Purificazione su colonna di Florisil®: 150 ml di esano

2) Eluizione con 150 ml dietilere/esano (1/99)

- lo **standard interno** (2-cicloesilcicloesanone) viene **aggiunto sull'eluato**

Procedura del metodo EN 1785

Analisi dei 2-alchilciclobutanoni mediante GC/MS

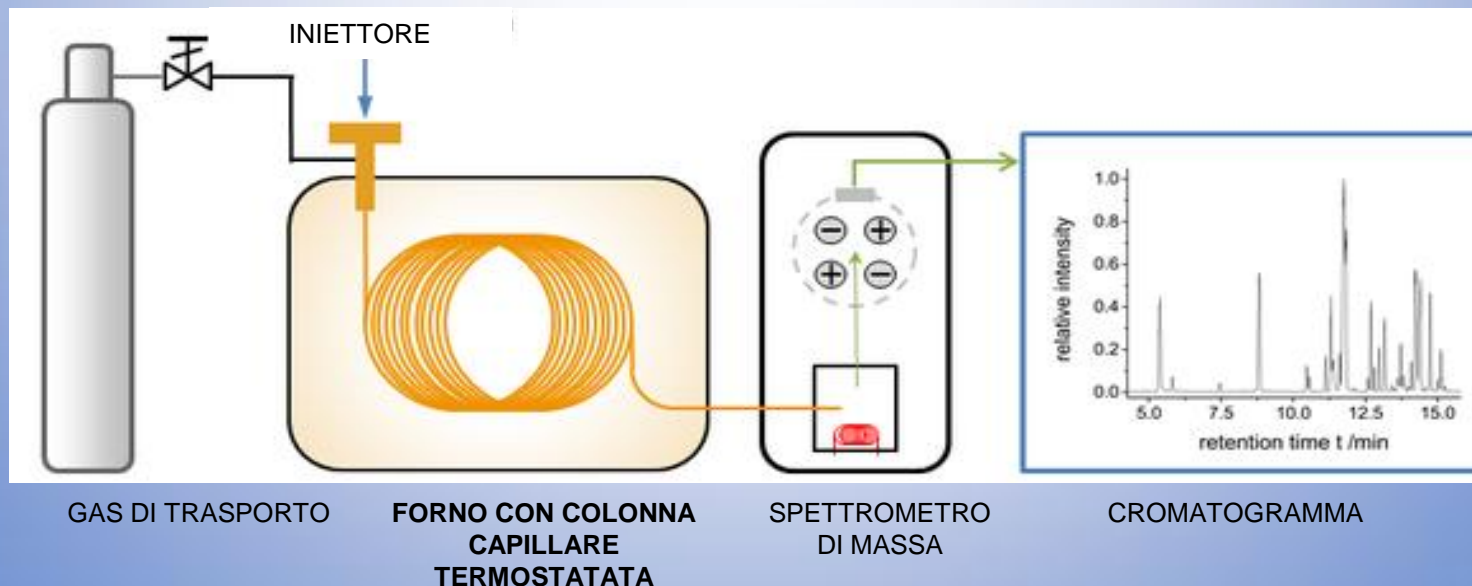
Principi della Gascromatografia accoppiata alla Spettrometria di massa (GC/MS)

GASCROMATOGRAFIA

- ▶ Tecnica separativa (separa gli analiti)
- ▶ Gas inerte di trasporto (elio)
- ▶ Campione introdotto tramite iniettore
- ▶ Analiti volatili
- ▶ Colonna capillare termostata (con rampa di temperatura per separare gli analiti)

SPETTROMETRIA DI MASSA

- ▶ Ionizzazione e frammentazione della molecola per impatto elettronico
- ▶ Separazione di una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica (m/z) tramite campi magnetici statici o oscillanti
- ▶ Rivelatore risponde agli ioni
- ▶ Il segnale elettrico prodotto viene trasformato in grafico (cromatogramma)



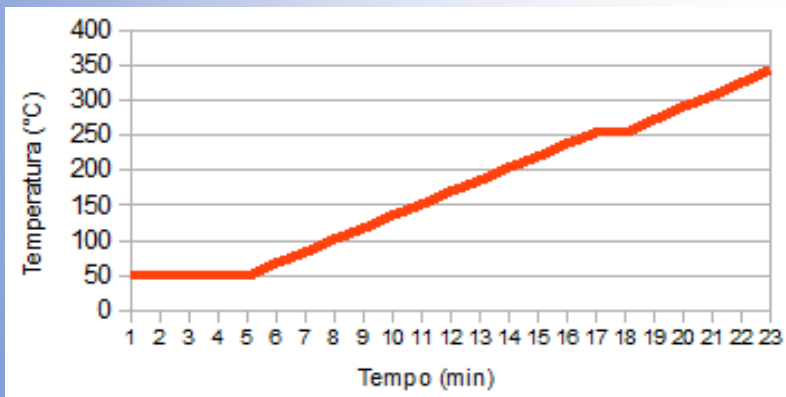
Procedura del metodo EN 1785

Analisi dei 2-alchilciclobutanoni mediante GC/MS

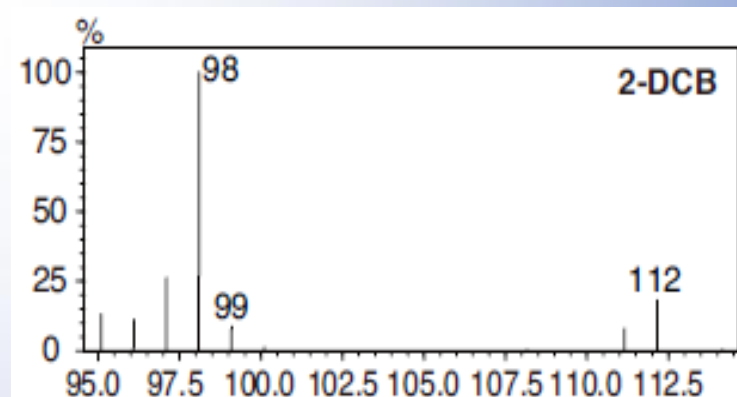
Fase analitica

Separazione gascromatografica dei 2-alchilciclobutanoni mediante colonne capillari non polari

INIEZIONE DEL CAMPIONE e CORSA CROMATOGRAFICA
CON RAMPA DI TEMPERATURA



ANALISI MASSA IN MODALITA' SELECTED ION
MONITORING (SIM) DEGLI IONI 98 E 112 m/z



Procedura del metodo EN 1785

Analisi dei 2-alchilciclobutanoni mediante GC/MS

■ Identificazione mediante MS:

➤ ioni m/z 98 e 112, presenti in rapporto caratteristico:

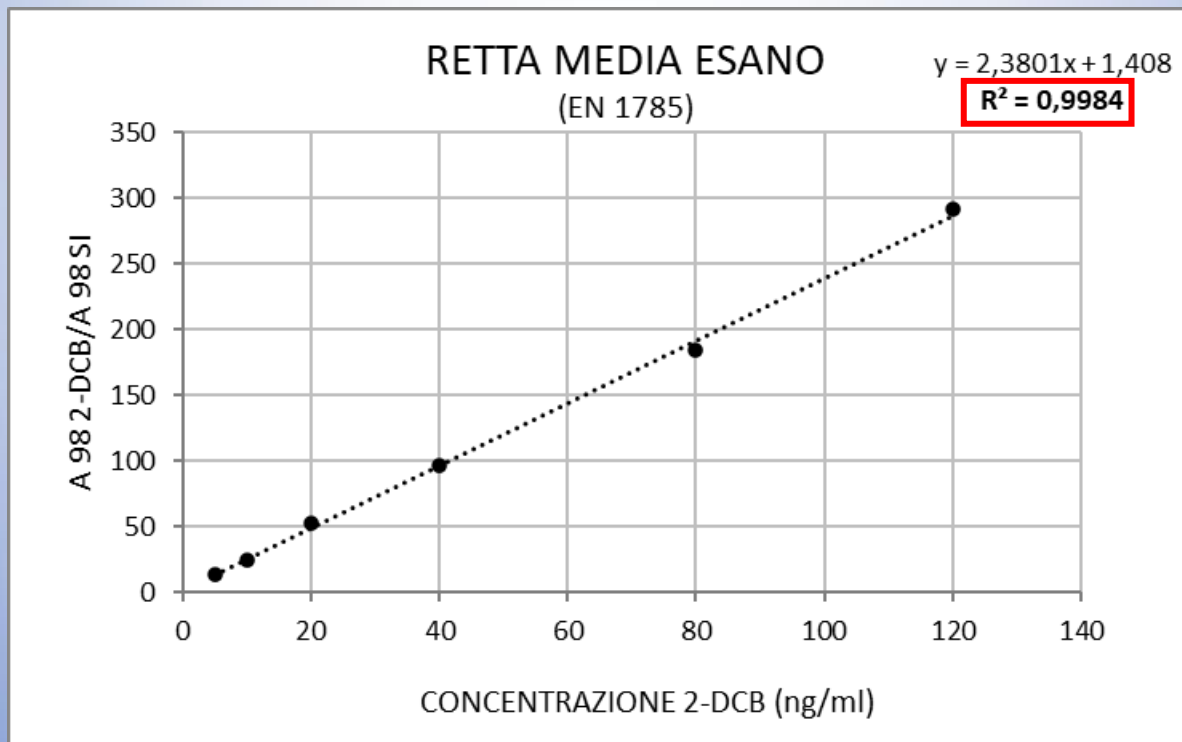
4,0-4,5:1 nel caso del **dodecilciclobutanone**

3,8-4,2:1 nel caso del **tetradecilciclobutanone**

- Per dare una **identificazione positiva** dei singoli ciclobutanoni, **entrambi gli ioni (98 e 112) devono essere presenti e nel rapporto previsto**
- I campioni vengono considerati irradiati quando **almeno uno dei 2-alchilciclobutanoni è stato identificato positivamente** e le **concentrazioni stimate superano quelle equivalenti ad un rapporto segnale/rumore di 3:1**
- **Il rapporto DCB:TCB riflette il rapporto tra gli acidi palmitico e stearico presente nel prodotto in esame**, fatta eccezione per campioni di carne di maiale

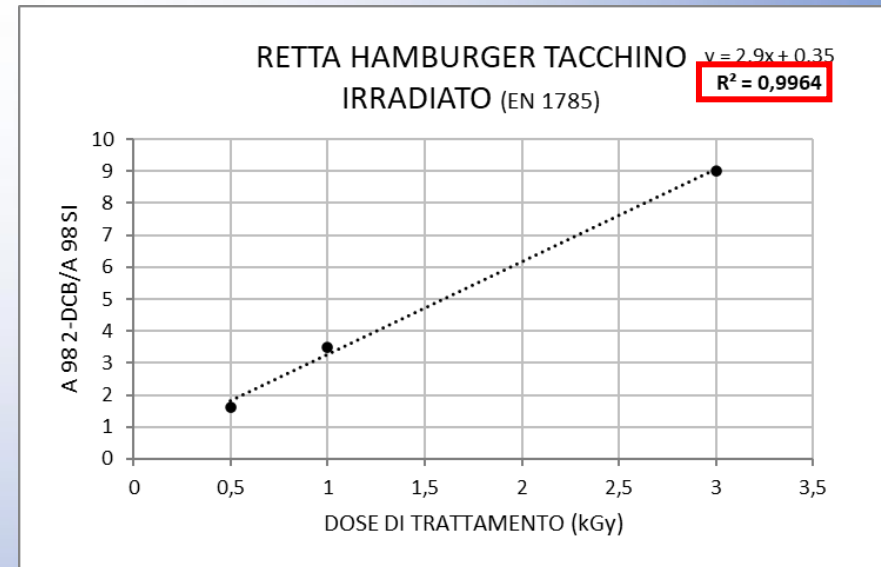
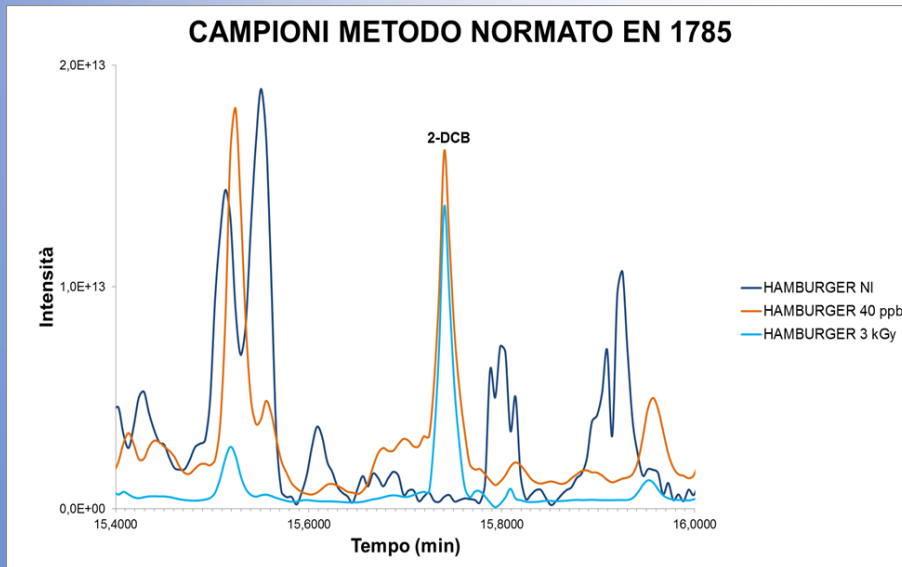
Metodo EN 1785 – Linearità strumentale

- Soluzioni di 2-DCB in esano a 5 – 10 – 20 – 40 – 80 – 120 ng/ml
- Retta media di tre analisi ripetute
- $R^2 \geq 0,99$



Metodo EN 1785 – Risultati

- Il metodo EN 1785 permette di identificare i campioni trattati con radiazioni ionizzanti a dose superiore a 0,5 kGy
- La quantità di 2-DCB prodotta durante l'irraggiamento è direttamente proporzionale alla dose impartita, vi è quindi una correlazione lineare tra 2-DCB e dose di trattamento



Metodo EN 1785 – Conclusioni

VANTAGGI

- Metodo di **conferma**
- Metodo **quantitativo**
- **Risposta lineare** alla dose di irraggiamento ($R^2 \geq 0,99$)

SVANTAGGI

- **Metodo lungo** e con utilizzo di **grossi volumi di solvente**
- **Applicabile solo a matrici contenenti lipidi**
- **Non ripetibile e riproducibile**
- **Bassi valori di recupero**

NUOVI METODI PER LA RICERCA DI 2-ACB

Tecnica di microestrazione in fase solida in spazio di testa e separazione/rivelazione con gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (HS-SPME-GC/MS)

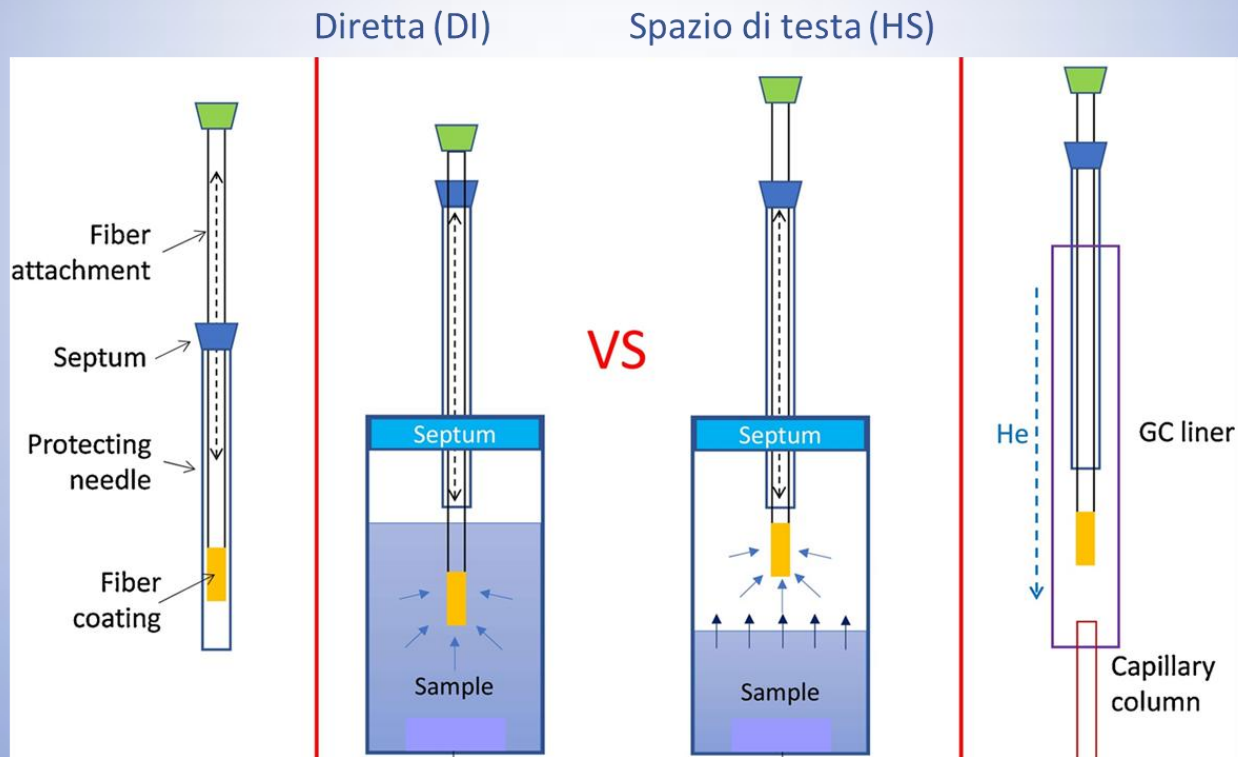
- **Metodo analitico alternativo**, che si pone come obiettivo quello di superare le difficoltà preparative legate al metodo normato
- **Microestrazione in fase solida in spazio di testa (HS-SPME) degli 2-ACB e successiva separazione/rivelazione con tecnica gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS)**
- **Ottimizzazione e validazione del metodo HS-SPME GC-MS (carne di pollame)**
- **Applicazione a prodotti a base di carne processata (hamburger e salsicce di pollo e tacchino)**
- **Applicazione a matrici vegetali (frutta fresca tropicale e frutta secca a guscio)**

NUOVI METODI PER LA RICERCA DI 2-ACB HS-SPME-GC/MS

Composizione della fibra

Estrazione degli analiti

Desorbimento (iniettore PTV)



Determinazione del 2-DCB (HS-SPME-GC/MS) preparazione del campione

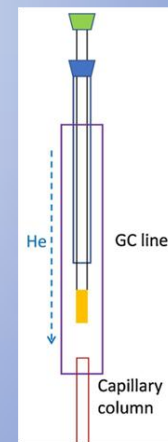
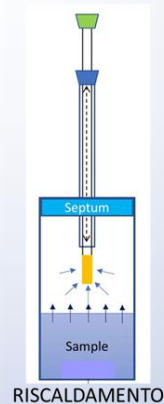
- 1) 2 o 5 g di campione macinato + 5 ml di H₂O ultrapura + Standard Interno
- 2) Sonicazione per 10 minuti a temperatura ambiente
- 3) Inserimento del campione nell'autocampionatore
- 4) Condizionamento della fibra ad alta temperatura
- 5) Arricchimento dello spazio di testa
- 6) Esposizione della fibra nello spazio di testa e assorbimento degli analiti
- 7) Desorbimento nell'iniettore PTV



ARRICCHIMENTO DELLO SPAZIO DI TESTA



ASSORBIMENTO DELL'ANALITA



- Caja, M.M., Ruiz del Castillo, M.L., & Blanch, G.P. (2008). Solid phase microextraction as a methodology in the detection of irradiation markers in ground beef. *Food Chemistry*, 110, 531-537. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.024>
- Soncin, S., Panseri, S., Rusconi, M., Mariani, M., Chiesa, L.M., & Biondi, P.A. (2012). 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*, 134, 440-444. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.089>

Determinazione del 2-DCB

(HS-SPME-GC/MS)

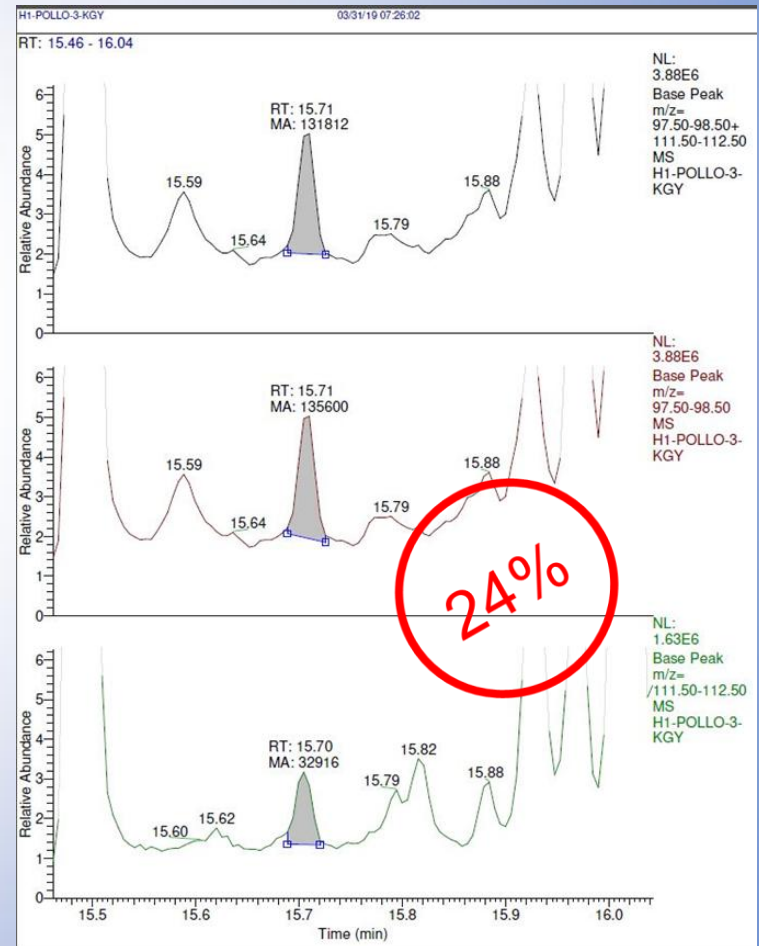
Analisi GC/MS, identificazione e riconoscimento dei picchi cromatografici

Analisi GC/MS

- Gascromatografia mediante colonna apolare
- Analisi massa in modalità Selected Ion Monitoring (SIM) DEGLI IONI 98 E 112 m/z

Identificazione 2-DCB

- Sovrapposizione del tempo di ritenzione (tr) di uno standard di 2-DCB iniettato nella stessa seduta di analisi
- Verifica di un valore di Segnale/Rumore (S/N) ≥ 3
- Rapporto tra l'area dello ione 112 m/z e l'area dello ione 98 m/z $\geq 22,5\%$ (4,0-4,5:1)



Determinazione del 2-DCB

(HS-SPME-GC/MS)

Validazione su carni di pollame

Linea guida Eurachem 2014

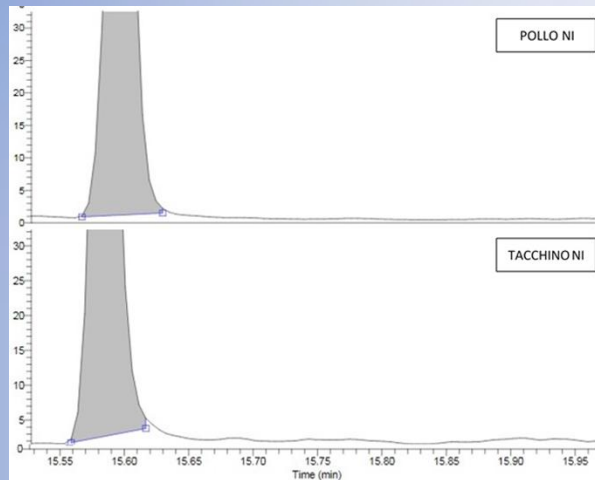
- Selettività
- Livello di dose minimo (MDL)
- Limite di rilevabilità (LOD)
- Specificità diagnostica e sensibilità diagnostica (valutazione della percentuale di falsi negati e falsi positivi)
- Linearità strumentale con costruzione di rette di 2-DCB in solvente
- Linearità del metodo analitico con costruzione di rette di 2-DCB in matrice additivata ed irradiata

Determinazione del 2-DCB

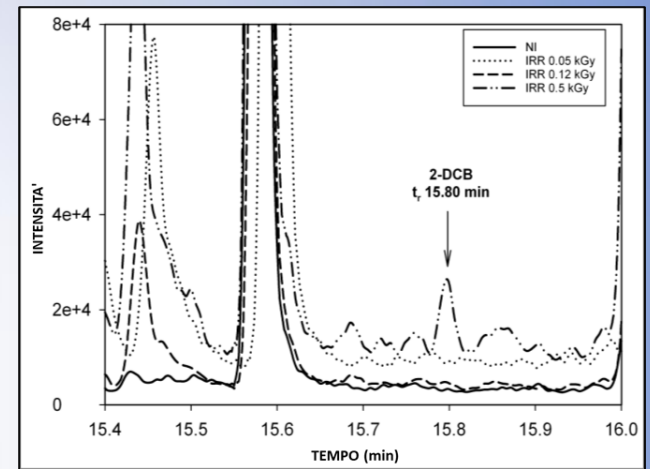
(HS-SPME-GC/MS)

Validazione su carni di pollame

Selettività (assenza di picchi interferenti)



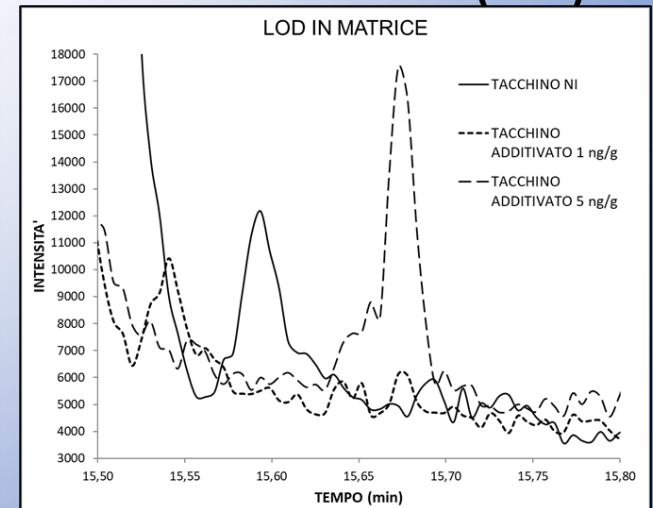
Livello di dose minimo (MDL)



Specificità diagnostica e sensibilità diagnostica

| | Campioni irradiati | Campioni non irradiati | |
|--------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Campioni positivi | Campioni veri positivi: 18 | Campioni falsi positivi: 0 | N. totale di Campioni positivi: 18 |
| Campioni negativi | Campioni falsi negativi: 0 | Campioni veri negativi: 36 | N. totale di Campioni negativi: 36 |
| | N. totale di campioni irradiati: 18 | N. totale di campioni non irradiati: 36 | |

Limite di rilevabilità (LOD)

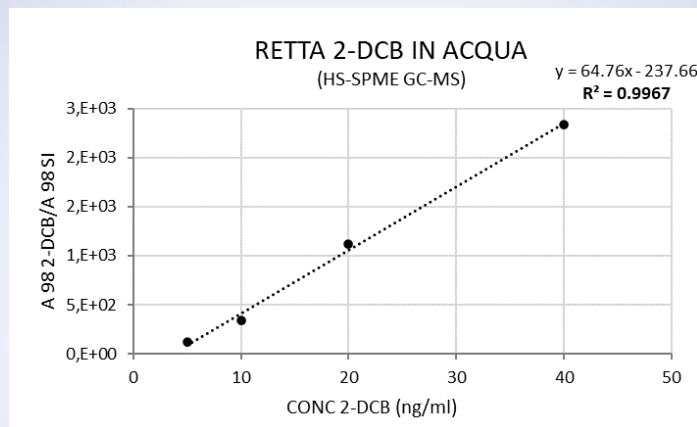


Determinazione del 2-DCB

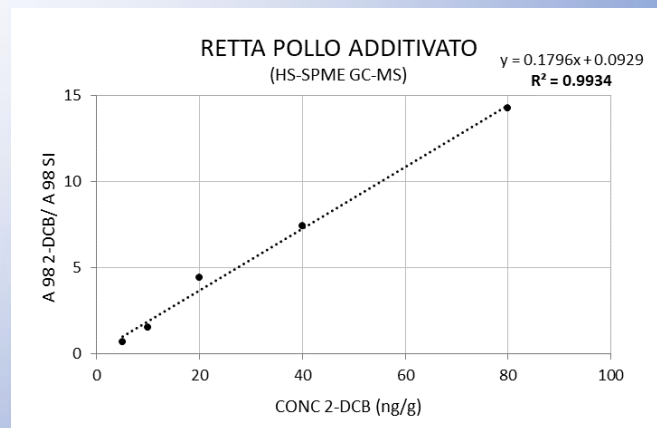
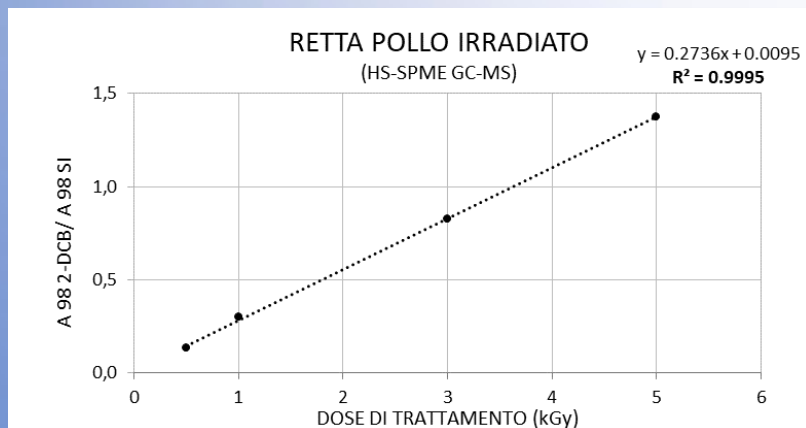
(HS-SPME-GC/MS)

Validazione su carni di pollame

- linearità strumentale: rette di 2-DCB in solvente



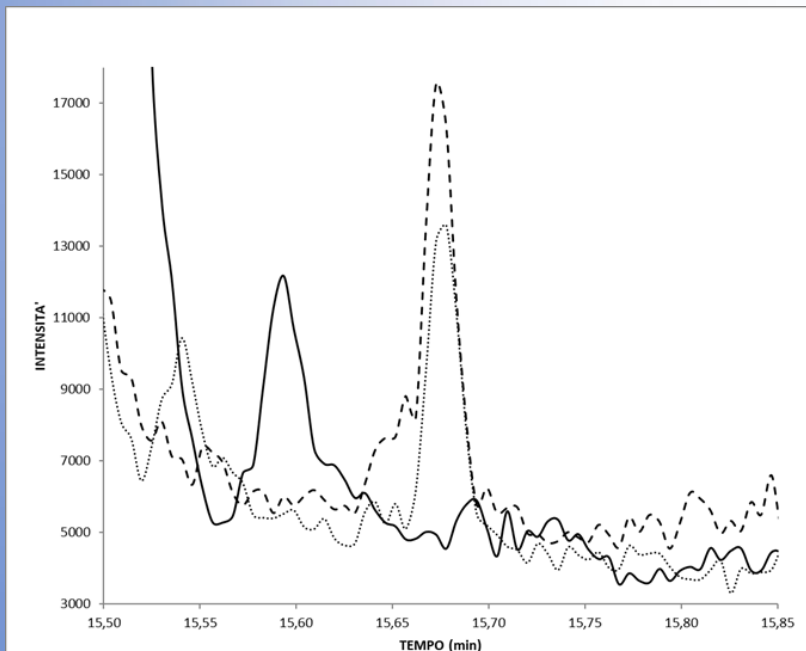
- linearità del metodo analitico: rette di 2-DCB in matrice additivata ed irradiata



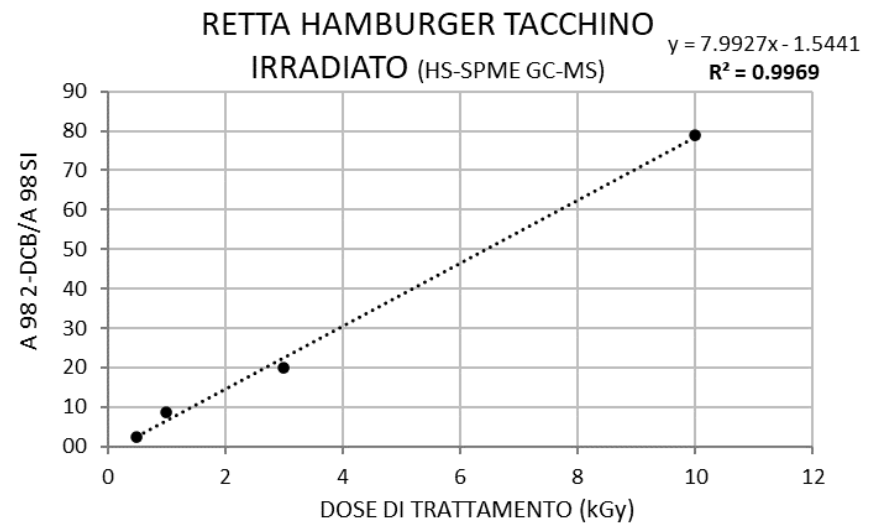
Determinazione del 2-DCB (HS-SPME-GC/MS) Applicazione a carni lavorate

Cromatogramma di hamburger di tacchino:

- non irradiato (linea continua)
- irradiato alla dose di 0,5 kGy (linea a puntini)
- additivato a concentrazione di 2-DCB di 5,0 ng/g (linea tratteggiata)



Linearità del metodo HS-SPME GC-MS in
hamburger irradiato



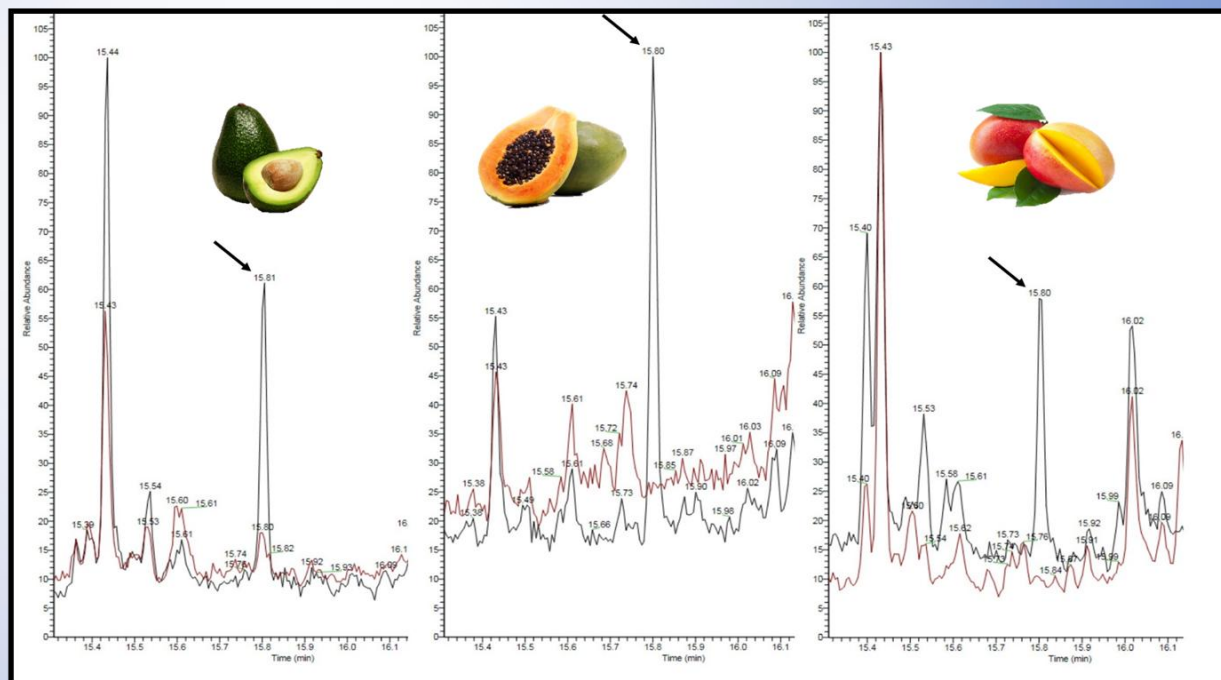
Determinazione del 2-DCB

(HS-SPME-GC/MS)

Applicazione a frutta fresca tropicale

Per quanto riguarda la frutta fresca tropicale è stata individuata la parte da analizzare (polpa o seme del frutto) in base al suo contenuto lipidico

| MATRICE | CONTENUTO LIPIDICO MEDIO (g/100g prodotto) |
|-----------------|--------------------------------------------|
| AVOCADO (POLPA) | 15 |
| PAPAYA (SEME) | 30 |
| MANGO (SEME) | 10 |



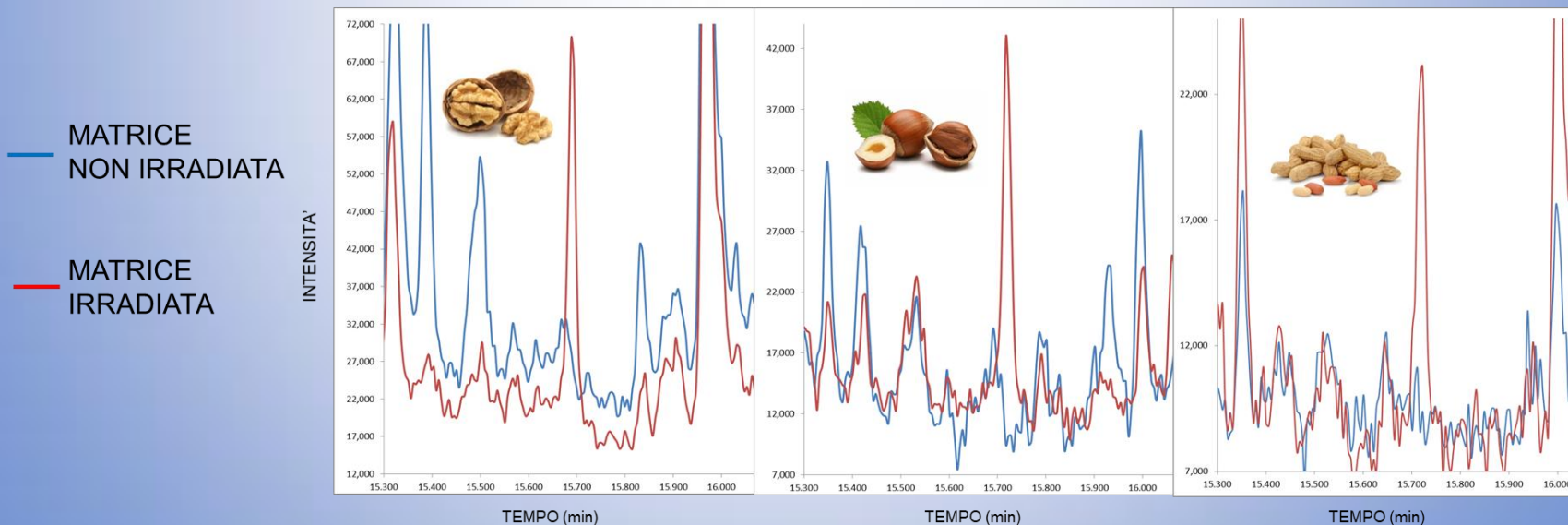
Determinazione del 2-DCB

(HS-SPME-GC/MS)

Applicazione a frutta secca a guscio

Per la frutta secca a guscio è stato necessario ridurre il peso di campione da analizzare a causa della proprietà igroscopica della matrice

| MATRICE | NOCI | NOCCIOLE | ARACHIDI |
|--------------------------------------------|------|----------|----------|
| CONTENUTO LIPIDICO MEDIO (g/100g prodotto) | 57 | 64 | 50 |



Determinazione del 2-DCB

(HS-SPME-GC/MS)

Riassunto validazione

- **Limiti di rilevabilità (MDL e LOD):** il metodo permette di individuare l'analita, con un rapporto $S/N \geq 3$, per valori di irraggiamento $\geq 0,5$ kGy e per concentrazioni ≥ 5 ng/g
- **Specificità diagnostica e Sensibilità diagnostica:** il metodo è capace di discriminare al 100% i campioni irraggiati dai campioni non irraggiati
- **Linearità:** l'area del 2-DCB aumenta proporzionalmente con l'aumentare della dose di trattamento ed ha una dipendenza lineare da questo ($R^2 \geq 0,99$)
- **Applicabile a matrici animali e vegetali**

Determinazione del 2-DCB (HS-SPME-GC/MS)



Original article

Validation of an alternative method for the identification of 2-dodecylcyclobutanone (2-DCB) of irradiated meats by solid-phase microextraction (SPME) gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS)

Maria Campaniello,  Giuliana Marchesani,*  Rosalia Zianni,  Marina Tarallo, Michele Mangiacotti & A. Eugenio Chiaravalle 

Centro di Riferenza Nazionale per la Ricerca della Radioattività nel Settore Zootecnico-Veterinario, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Via Manfredonia 20, 71121 Foggia, Italy

(Received 22 May 2019; Accepted in revised form 19 August 2019)

Summary A rapid and simple procedure to detect irradiated food containing fat is proposed. This method is based on HS-SPME coupled with GC-MS to determine the presence of a radiolytic product in irradiated meats: 2-dodecylcyclobutanone (2-DCB) and is proposed as an alternative to EN 1785:2003, which is a long and complex procedure. The qualitative confirmation method is validated on different type of meats: chicken, turkey, duck, beef, pork on both nonirradiated and irradiated samples at different dose levels (0.05, 0.12, 0.5, 1.0 and 3.0 kGy) with a biological X-ray irradiator. The validation parameters investigated are selectivity, minimum dose level (MDL), limit of detection (LOD), sensitivity and specificity. The MDL and LOD values were 0.5 kGy and 5.0 ng mL⁻¹, respectively, for all matrices. No false positives or false negatives occurred, and 100% of samples were correctly identified. The results show that HS-SPME GC-MS is suitable for routine analysis.

Keywords 2-DCB, Food control, Food Irradiation, HS-SPME GC-MS, Meat, Validation.

Campaniello, M., **Marchesani, G.**, Zianni, R., Tarallo, M., Mangiacotti, M. and Chiaravalle, A.E. (2020), Validation of an alternative method for the identification of 2-dodecylcyclobutanone (2-DCB) of irradiated meats by solid-phase microextraction (SPME) gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). *Int J Food Sci Technol*, 55: 961-969. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14353>

Determinazione del 2-DCB

(HS-SPME-GC/MS)

Conclusioni

VANTAGGI

- Metodo di **conferma**
- **Rapido e sensibile**
- **Non necessita preparazione del campione**
- **Risposta lineare** alla dose di irraggiamento ($R^2 \geq 0,99$)

SVANTAGGI

- **Applicabile solo a matrici contenenti lipidi**
- **Analisi matrice-dipendente**

DETERMINAZIONE DI 2-DCB

CONFRONTO TRA METODO EN 1785 E METODO INTERNO HS-SPME-GC/MS

| | METODO UNI 1785 | METODO HS-SPME-GC/MS |
|-------------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| MODALITA' OPERATIVE | | |
| QUANTITA' MATRICE | 20 g | 2/5 g |
| ESTRAZIONE LIPIDI | SI | NO |
| PURIFICAZIONE ESTRATTO | SI (FLORISIL) | NO |
| IMPIEGO DI SOLVENTI | SI (<u>ESANO CIRCA 500 ml</u>) | SI (<u>ACQUA 5 ml</u>) |
| TEMPO DI ANALISI | CIRCA <u>2 GIORNI</u> | CIRCA <u>2 ORE</u> |
| MATRICE | <u>SOLO ANIMALE</u> | <u>ANIMALE E VEGETALE</u> |
| RISULTATI ANALITICI | | |
| LINEARITA' STRUMENTALE | SI ($R^2 \geq 0,99$) | SI ($R^2 \geq 0,99$) |
| LINEARITA' MATRICE IRRAGGIATA | SI ($R^2 \geq 0,99$) | SI ($R^2 \geq 0,99$) |
| LIVELLO DI DOSE MINIMO (MDL) | MDL $\geq 0,5$ kGy | MDL $\geq 0,5$ kGy |
| LIMITE DI RILEVABILITÀ (LOD) | LOD ≥ 5 ng/g | LOD ≥ 5 ng/g |



DIPARTIMENTO
SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE
E SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA



Ministero della Salute



istituto zooprofilattico sperimentale
della puglia e della basilicata



LNR-ALIRR

Dott.ssa Giuliana Marchesani: Ricercatrice

Dott.ssa Rosalia Zianni: borsista

Dott. Andrea Chiappinelli: Collaboratore di ricerca

Grazie per l'attenzione