

# STUDIO COLLABORATIVO

## BPA IN FOOD – INFORMAZIONI GENERALI

Il circuito "BPA IN FOOD" è un test interlaboratorio di tipo collaborativo (non valutativo) con l'obiettivo di determinare le concentrazioni di BPA in alimenti contaminati "naturalmente" (matrici alimentari non spikate). Le concentrazioni prese in esame sono quelle che si collocano nell'area dei limiti di legge attuali e futuri. Un primo obiettivo del circuito è quello di esplorare l'effetto matrice su più livelli di concentrazione e su matrici alimentari complesse: conserve ittiche e conserve vegetali. Un secondo obiettivo è quello di permettere ai laboratori partecipanti di realizzare la validazione del metodo analitico utilizzato.

ogni laboratorio partecipante riceverà un set di campioni "articolato" che si impegnerà ad analizzare completamente, seguendo le istruzioni. Al termine della prova collaborativa riceverà un **report conforme a ISO 17043 e ISO 13528** utilizzabile anche ai fini **dell'accreditamento del metodo**. La partecipazione all'interlaboratorio è **gratuita** e comprende i costi di spedizione in Europa. NOTA: la natura dei campioni, matrici alimentari contaminate "naturalmente", implica che i set di campioni a disposizione sono limitati. La garanzia di anonimato ci permette solamente di assegnarli in ordine di iscrizione.

Ogni partecipante riceverà un set di campioni completo denominato **VALIDATION SET**. Il test infatti è strutturato in modo da realizzare una "calibration curve" in matrice alimentare complessa attraverso l'utilizzo di quattro campioni a concentrazione crescente nell'ambito degli 0,00 – 2,00 mg/kg di BPA. In particolare le concentrazioni scelte per la "calibration curve" sono distribuite nel campo di misura che comprende entrambi i limiti previsti per legge (cioè 0,60 mg/kg come limite attuale e 0,05 mg/kg come possibile limite futuro). Questa scelta ha tenuto conto del detection limit delle metodiche analitiche più utilizzate in modo da permettere al maggior numero di laboratori di esprimere valori accettabili.

Il VALIDATION SET è composto di:

- a. 4 campioni di un prodotto alimentare liofilizzato (matrice proteica / amidacea con tracce di grassi) con concentrazioni di BPA distribuite uniformemente tra 0 e 2 mg/kg (curva di calibrazione "in matrice") a cui viene associato 1 campione della stessa matrice con il ruolo di "bianco" (esente BPA),
- b. 3 campioni spike con concentrazioni di BPA distribuite uniformemente tra 0 e 2 mg/kg (curva di calibrazione "in solvente") a cui viene associato 1 campione dello stesso solvente con il ruolo di "bianco" (esente BPA),
- c. 2 tubi contenenti un prodotto alimentare tal quale (la stessa matrice proteica / amidacea con tracce di grassi ma non liofilizzata) con concentrazioni di BPA su due livelli – su questi campioni verrà eseguita la prova di ripetibilità,
- d. 2 tubi contenenti un prodotto alimentare tal quale (matrice vegetale in olio di oliva) con concentrazioni di BPA su due livelli – su questi campioni verrà eseguita la prova di ripetibilità,
- e. istruzioni per la messa a punto della preparativa e indicazioni sull'esecuzione del metodo analitico da applicare – i laboratori saranno comunque liberi di scegliere il proprio metodo.

IN CASO DI DUBBI O PER INFORMAZIONI SCRIVERE ALLA MAIL [info@proficiencyproblemsolving.com](mailto:info@proficiencyproblemsolving.com)

# “PREPARAZIONE CAMPIONI”

## 1) COMPOSIZIONE DEL VALIDATION SET(\*)

Ogni laboratorio riceverà un VALIDATION SET costituito da:

- **4 campioni in PROVETTONI IN VETRO** di un prodotto alimentare liofilizzato (matrice proteica/amidacea/lipidica – identificato con “APG”) con concentrazioni di BPA decescenti e distribuite uniformemente tra 0 e 2 mg/kg (curva di calibrazione “in matrice”).

Il campione con numero 1 presenta la concentrazione più elevata, quello con numero 4 presenta la concentrazione più bassa. A questi , viene associato 1 campione della stessa matrice con il ruolo di “bianco” (esente BPA), Questi campioni serviranno per la **calibration curve(\*)** .

*(\*) per ulteriori informazioni sul “Validation set” e sulla “Calibration curve” (si veda la “LETTERA DI PRESENTAZIONE”)*

Labels:

- 1-APG-cc (concentrazione superiore)
- 2-APG-cc
- 3-APG-cc
- 4-APG-cc (concentrazione inferiore)
- Blank-cc

- **3 campioni spike in VIAL** con concentrazioni di BPA in acetonitrile decescenti e distribuite uniformemente tra 0 e 2 mg/kg (curva di calibrazione “in solvente”). Anche in questo caso il campione con numero 1 presenta la concentrazione più elevata, quello con numero 3 presenta la concentrazione più bassa

A questi, viene associato 1 campione dello stesso solvente con il ruolo di “bianco” (esente BPA),

Labels:

- 1-Spike (concentrazione superiore)
- 2-Spike
- 3-Spike (concentrazione inferiore)
- Solvent

- **2 Campioni in TUBETTO IN ALLUMINIO** di un prodotto alimentare tal quale (stessa matrice proteica / amidacea / lipidica identificata con “APG” ma non liofilizzata) con concentrazioni di BPA su due livelli

Su questi campioni verrà eseguita la prova di ripetibilità,

Labels:

- a-APG-Tube
- b-APG-Tube

Le sigle “a” e “b” identificano coating di diversa natura chimica.

- **2 Campioni in TUBETTO IN ALLUMINIO** di un prodotto alimentare tal quale a matrice vegetale in olio di oliva (codificata come “VG”) con concentrazioni di BPA su due livelli.

Su questi campioni verrà eseguita la prova di ripetibilità,

Labels:

- a-VG-Tube
- b-VG-Tube

Le sigle “a” e “b” identificano coating di diversa natura chimica.

## 2) PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: ISTRUZIONI GENERALI

- ✓ Per la manipolazione ed eventuale conservazione dei campioni utilizzare esclusivamente materiali privi di BPA, evitare dunque plastiche o metalli verniciati a vantaggio di vetro, acciaio e alluminio non ricoperti;
- ✓ Analizzare entro 3 giorni dalla ricezione del campione, nel frattempo conservare preferibilmente a temperatura di 2-4°C.

## 3) PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: PROVETTONI IN VETRO DI MATERIALE LIOFILIZZATO

- ✓ Rimuovere delicatamente la copertura di alluminio con le mani, facendo attenzione.
- ✓ Togliere il tappo colore oro che chiude la provetta. Rimuovere anche la protezione in carta contenente due bustine: il gel di silice essiccante e l'oxygen absorbers .
- ✓ Il campione risulta compresso e coperto da un sigillo circolare di colore bianco. Fare delicatamente pressione con una spatolina su un lato del sigillo e spingere piano verso il basso per aiutare lo spostamento verso l'alto del cerchietto. Una volta girato verso l'alto il sigillo, utilizzare la pinzetta per rimuoverlo dalla provetta, riprendere con la spatolina l'eventuale residuo di campione sul sigillo e versarlo nel beaker.
- ✓ Girare la provetta al di sopra del beaker e versare totalmente all'interno il campione liofilizzato. Probabilmente si avrà difficoltà perché il campione pressato rimane adeso alle pareti della provetta. Aiutarsi con la spatola picchiettando sul campione pressato, facendo sempre attenzione che non venga perso all'esterno campione.
- ✓ Una volta trasferito il campione all'interno del beaker cercare di rimuovere con la spatolina i grumi che si sono formati.
- ✓ All'interno della provetta si troveranno ancora tracce di campione. Impostare la pipetta a 10mL e versare all'interno 10mL di acqua distillata e scuotere delicatamente la provetta facendo sì che tutti i residui sul vetro vengano ripresi. Versare l'acqua all'interno del beaker con il campione (per volume totale da aggiungere al campione vedere tabella allegata). Fare questa operazione quanto necessario per recuperare tutto il campione nel beaker senza, chiaramente, superare i mL di acqua distillata totali necessari
- ✓ Omogeneizzare con la spatolina il campione idratato avendo cura di eliminare tutti i grumi formati. Questa operazione potrà richiedere diversi minuti (dai 15 minuti alla mezz'ora).
- ✓ Prelevare le aliquote necessarie per le analisi (per istruzioni relative alle analisi vedere "LETTERA: ISTRUZIONI METODO ANALITICO)

TABELLA PER REIDRATAZIONE

| <b>CAMPIONE</b> | <b>mL di Acqua distillata da aggiungere</b> |
|-----------------|---|
| <b>1-APG-cc</b> | 29  |
| <b>2-APG-cc</b> | 29  |
| <b>3-APG-cc</b> | 60  |
| <b>4-APG-cc</b> | 60  |
| <b>Blank</b>    | 48  |

#### 4) PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: PRODOTTO IN TUBO

- ✓ Spremere il prodotto dal tubetto simulando l'abituale utilizzo da parte del consumatore, arrotolando progressivamente il retro del tubetto per agevolare la fuoriuscita di tutto il prodotto;
- ✓ Raccogliere il prodotto in un beaker di dimensioni idonee;
- ✓ Omogeneizzare il prodotto mescolandolo delicatamente con una spatola per qualche minuto;
- ✓ Prelevare le aliquote necessarie per le analisi (per istruzioni relative alle analisi vedere "LETTERA: ISTRUZIONI METODO ANALITICO)

IN CASO DI DUBBI O PER INFORMAZIONI SCRIVERE ALLA MAIL: [info@proficiencyproblemsolving.com](mailto:info@proficiencyproblemsolving.com)

# “ISTRUZIONI METODO ANALITICO”

## ISTRUZIONI DA INSERIRE PER FORNIRE CHIARIMENTI SUL METODO ANALITICO

### MATERIALE FORNITO

Per la validazione del metodo analitico vengono fornite come da LETTERA “PREPARAZIONE CAMPIONI”:

- Tre soluzioni di Bisfenolo A (CAS 80-05-7) a tre differenti concentrazioni note per verificare i parametri prestazionali relativi alla metodica in matrice solvente.
- Aliquote differenti patè di pesce naturalmente contaminata

### INDICAZIONI PER LO SVOLGIMENTO DEL METODO ANALITICO

#### INTRODUZIONE

La procedura si propone di determinare la concentrazione di Bisfenolo A (CAS 80-05-7) in matrici alimentari complesse (conservie ittiche e conserve vegetali) previa estrazione con metodo QuEChERS e successiva separazione ed analisi attraverso LC/MSMS. La quantificazione è effettuata mediante utilizzo di uno standard interno.

LoQ: 0,01 mg/kg

Campo di misura: 0,01 mg/kg -0,1 mg/kg. Valore massimo 10 mg/kg (considerando successive diluizioni del campione)

#### ESTRAZIONE mediante QuEChERS (adatti per alimenti grassi)

#### **CAMPIONE INCOGNITO**

Pesare  $10 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$  di alimento in un tubo da centrifuga da 50 ml; nel caso di campioni molto concentrati ridurre il peso a  $1 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ . Aggiungere 10 ml di acqua per migliorare la dispersione del campione. Aggiungere 10 ml di Acetonitrile e procedere con le fasi di estrazione come da metodo QuEChERS. L'estratto verrà analizzato tramite LC MS MS.

#### **CALIBRAZIONE**

Si può procedere in due modi differenti:

- STANDARD ADDITION:** utilizzo del campione contaminato per tutti i sette punti di calibrazione. Pesare sei aliquote da  $10 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$  di alimento con concentrazione incognita in un tubo da centrifuga da 50 ml; nel caso in cui si sia pesato  $1 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$  per il campione, pesare la stessa aliquota anche per la calibrazione. Aggiungere 10 ml di acqua per migliorare la dispersione del campione. Aggiungere 10 ml di Acetonitrile con spike differenti per ottenere i punti della retta di calibrazione desiderati. (e.g. mg/kg 0,001 - 0,005 - 0,010 - 0,025 - 0,060 - 0,080)  
Procedere con le fasi di estrazione come da metodo QuEChERS. Gli estratti verranno analizzati, in sequenza dopo il campione incognito, tramite LC MS MS.
- MATRIX-MATCHED:** eseguire la calibrazione in matrice utilizzando il campione “bianco” fornito. Pesare sei aliquote da  $10 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$  di “bianco” in un tubo da centrifuga da 50 ml; nel caso in cui si sia pesato  $1 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$  per il campione, pesare la stessa aliquota anche per la calibrazione. Aggiungere 10 ml di acqua per migliorare la dispersione del campione. Aggiungere 10 ml di Acetonitrile con spike differenti per ottenere i punti

della retta di calibrazione desiderati. (e.g. mg/kg 0,001 - 0,005 - 0,010 - 0,025 - 0,060 - 0,080). Procedere con le fasi di estrazione come da metodo QuEChERS. Gli estratti verranno analizzati, in sequenza dopo il campione incognito, tramite LC MS MS.

### ***ANALISI STRUMENTALE***

Metodo di acquisizione:

- Analisi LC-MSMS in modalità MRM.

Colonna e fasi mobili:

- Colonna C18 50mmx2,1mm - 1,8UM o simile.
- Fase mobile A: Acqua Fase mobile B: Metanolo + 2mM di ammonio acetato.