



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E INNOVAZIONE TECNOLOGICA

Corso di Laurea Magistrale in Biologia
Curriculum Nutrizione e Ambiente

Tesi di Laurea

Verifiche di conformità nella produzione di integratori alimentari a base di nutraceutici e validazione di un nuovo metodo di analisi.

Relatore: Prof.ssa Simona MARTINOTTI 

Co-relatore: Dott.ssa Patrizia FORNASARI

Candidato: Jacopo GOLTARA



Matricola: 20019590

Anno Accademico 2022/2023

Indice

1. Introduzione	1
1.1 Integratori alimentari	1
1.1.1 Regolamentazione integratori	4
1.1.2 Etichettatura integratori alimentari.....	7
1.1.3 Produzione e confezionamento	8
1.1.4 Utilizzo integratori	8
1.1.5 Classificazione degli integratori.....	9
1.2 Silimarina	11
1.2.1 La silimarina come antiossidante	13
1.2.2 La silimarina e le sue proprietà antinfiammatorie	13
1.2.3 La silimarina e gli effetti sul diabete mellito	14
1.2.4 Malattie cardiovascolari e silimarina.....	15
1.2.5 Rischi possibili nell'assunzione di silimarina.....	16
1.2.6 Vie di assorbimento della silimarina	16
1.2.7 Eliminazione silimarina.....	19
1.3 Berberina	19
1.3.1 Principali funzioni della berberina.....	20
1.3.2 Effetti collaterali berberina.....	21
1.3.3 Gli effetti della berberina cloridrato sull'espressione di geni epatici coinvolti nel metabolismo del glucosio e dei lipidi	22
1.4 Monacolina K	22
1.4.1 Monacolina K e l'aterosclerosi.....	25
1.4.2 Possibili rischi dovuti all'assunzione di monacolina K.....	26
1.4.3 Indicazioni all'uso dei nutraceutici	27
1.5 Controllo su integratori alimentari: il sistema HACCP	28
2. Scopo tesi	30
3. Materiali e metodi	32
3.1 Dalla materia prima all'integratore	32
3.2 Analisi fisiche	34
3.3 Determinazione cromatografica della berberina cloruro nella materia prima e nel prodotto finito	38
3.4 Determinazione cromatografica della monacolina K nella materia prima e nel prodotto finito	40

3.5 Determinazione quantitativa UHPLC della silimarina nella materia prima e nel prodotto finito	43
3.6 Determinazione quantitativa dei metalli pesanti (Piombo, Cadmio e Nichel) su materia prima, semilavorato e prodotto finito mediante analisi in ICP-OES	45
3.7 Analisi microbiologiche	47
3.7.1 Preparazione Terreni	48
3.7.2 Preparazione campione	48
3.7.3 Semina su piastra	48
3.7.4 Test ELISA.....	49
3.8 Validazione metodo silimarina su nuovo HPLC	57
4. Analisi e risultati	60
4.1 Determinazione cromatografica della berberina cloruro nella materia prima.....	60
4.2 Determinazione cromatografica della monacolina K nella materia prima.....	65
4.3 Determinazione cromatografica della silimarina nella materia prima	70
4.4 Determinazione quantitativa dei metalli pesanti (Piombo, Cadmio e Nichel) su materia prima, semilavorato e prodotto finito mediante analisi in ICP-OES	75
4.5 Test ELISA per ricerca glutine	78
4.6 Analisi di stabilità.....	80
4.6.1 Stabilità berberina	80
4.6.2 Stabilità monacolina K.....	85
4.6.3 Stabilità silimarina	90
4.7 Validazione metodo su un nuovo strumento	105
4.7.1 Specificità	105
4.7.2 Precisione	106
4.7.2 Linearità	109
4.7.2 Accuratezza	110
5. Discussione.....	112
5.1 Osservazioni risultati analisi berberina cloruro	112
5.2 Osservazioni risultati analisi monacolina K.....	114
5.3 Osservazioni risultati analisi silimarina	115
5.3.1 Osservazioni validazione metodo su un nuovo strumento	117
6. Conclusione	119

Bibliografia	123
Sitografia	130
Fonti legislative e normative	131

1. Introduzione

1.1 Integratori alimentari

Per svolgere le proprie funzioni giornaliere il corpo umano deve introdurre tramite il cibo tutti i macro e micronutrienti indispensabili per la sua sopravvivenza e per il corretto funzionamento dell'organismo.

In base alla dieta di ogni individuo vengono introdotte diverse molecole, le quali saranno assorbite lungo il percorso che parte dalla bocca e prosegue dall'esofago fino all'apparato gastro intestinale.

In alcuni casi però non è possibile introdurre tutte le molecole fondamentali. Ciò può dipendere anche dal luogo in cui si vive. Ad esempio nei paesi in via di sviluppo è difficile riuscire ad avere a disposizione tutte le tipologie di nutrienti di cui si ha bisogno, oppure nei paesi sviluppati le persone prediligono mangiare in maggiori quantità cibi più grassi e anche fritti riducendo il consumo di frutta e verdura.

Tutto questo può provocare nell'organismo uno squilibrio dovuto alla mancanza di alcune molecole fondamentali, con un suo conseguente indebolimento ed aumento della vulnerabilità a vari agenti esterni.

Il concetto stesso di alimento sta subendo una profonda trasformazione: dal soddisfacimento di un bisogno primario siamo giunti ad un concetto di cibo come promessa di salute intesa come prevenzione e assenza di malattia. Basti pensare che a partire dagli anni '90 si è verificata una progressiva contrazione dei consumi di alcuni comparti storici dell'alimentazione nazionale (come vino, zucchero, burro e grassi animali) in favore di un aumento generalizzato di pesce, frutta, bevande analcoliche, yogurt e cereali.

Oggi i consumi sono orientati in modo sempre più attento alla qualità degli alimenti, non solo ai loro contenuti nutrizionali ma anche alla presenza di additivi, contaminanti e residui. Pur disponendo di linee guida per una sana e corretta educazione alimentare, promossa dal Ministero della Salute con l'attuazione di campagne informative e di prevenzione, oltre che con l'uso di nuovi e sempre aggiornati canali di informazione specializzati, si continua a seguire, soprattutto nei paesi industrializzati, un regime alimentare non sempre corretto e abitudini poco salutari. La sedentarietà, la tendenza a nutrirsi più del necessario, scelte alimentari affrettate imposte dal ritmo lavorativo quotidiano, lo stress accumulato e l'inquinamento sono tutti fattori che

insieme portano ad essere esposti, più che in passato, a patologie croniche quali l'ipertensione, l'obesità e il diabete. Diversi altri fattori di valenza strettamente socio-economica e tecnologica hanno determinato nei Paesi più sviluppati un impoverimento di fattori nutritivi essenziali nei cibi più comuni; in particolar modo i processi di raffinazione, i metodi di conservazione e la cottura possono compromettere il patrimonio nutrizionale degli alimenti. In tale contesto gli integratori alimentari hanno trovato il substrato ideale in un'ampia fascia di popolazione, tanto che il mercato di questi prodotti è stato contraddistinto nell'ultimo decennio da una forte espansione.

L'articolo 1 del D. Lgs. n.169 del 2004 definisce gli integratori come "i prodotti alimentari destinati ad integrare la comune dieta e che costituiscono una fonte concentrata di sostanze nutritive, quali le vitamine e i minerali, o di altre sostanze aventi un effetto nutritivo o fisiologico, in particolare ma non in via esclusiva aminoacidi, acidi grassi essenziali, fibre ed estratti di origine vegetale sia monocomposti che pluricomposti, in forme predosate" (Art. 1, Dgls. 21 maggio 2004 n. 169). Per forma predosata si intende capsule, pastiglie, compresse, pillole, gomme da masticare, polveri in bustina, liquidi in fiale, flaconi con contagocce o forme simili di liquidi e polveri, destinati a essere assunti in piccoli quantitativi unitari.

Lo scopo degli integratori alimentari è dunque quello di rimediare a carenze di alcuni nutrienti o di coadiuvare funzione fisiologiche andando ad aumentarne l'effetto.

Gli integratori alimentari non sono però considerati medicinali per cui non possono essere usati come farmaci o non possono curare o prevenire malattie. Essi, infatti, non sono regolamentati come medicinali, ma vengono considerati veri e propri alimenti, subordinati a tutta la legislazione che ne regola le varie caratteristiche e i vari aspetti. Gli integratori alimentari possono avere la capacità di aiutare e/o facilitare lo svolgimento di una funzione che è già propria dell'organismo e solo in questo senso deve essere inteso il termine "fisiologico" della definizione.

In generale, l'uso degli integratori è associato a: modulazione dei processi fisiologici modificati nel tempo da fattori endogeni ed esogeni, mantenimento di un buono stato di salute, miglioramento delle prestazioni fisiche e psichiche, riduzione dei fattori di rischio di condizioni patologiche, rafforzamento del sistema immunitario.

Il mercato degli integratori alimentari è in crescita esponenziale. Lo dimostra il recente rapporto "Consumer survey on food supplements in the EU", che riporta i risultati di un'indagine sui consumatori, condotta da Ipsos per conto di Food Supplements Europe (FSE). A tale rapporto fa riferimento anche il "Manifesto di Erice" redatto nel 2022 con

lo scopo di accrescere la consapevolezza sull'uso sicuro degli integratori alimentari e promuovere lo sviluppo di un sistema comune di monitoraggio europeo.

L'obiettivo dell'indagine è quello di fornire una migliore comprensione dei comportamenti, degli atteggiamenti e delle pratiche dei consumatori dell'UE in materia di alimenti e integratori alimentari.

Lo studio è stato condotto tra il 17 e il 30 marzo 2022, in 14 Stati membri dell'UE: Belgio, Repubblica Ceca, Danimarca, Germania, Spagna, Francia, Italia, Cipro, Paesi Bassi, Polonia, Romania, Slovenia, Finlandia e Svezia. In ogni Paese, la popolazione target era costituita da adulti di età pari o superiore ai 18 anni e la dimensione del campione target era di 1.000 persone, ad eccezione di Cipro, dove il target era di 200 persone. In totale sono state completate 13.249 interviste nei 14 paesi.

Quasi nove intervistati su dieci (88%) hanno utilizzato un integratore alimentare in qualche momento della loro vita. Come si può osservare nella Fig. 1.1, la metà ha assunto vitamina D o C (rispettivamente il 50% e il 48%), mentre il 41% ha assunto magnesio e il 39% ha assunto un integratore multivitaminico e/o minerale. Gli integratori più comunemente citati sono gli omega 3 o gli oli di pesce (27%), il ferro (27%), la vitamina B o il complesso B (25%) e il calcio (23%) (IPSOS, European Public Affairs, Consumers survey on food supplements in the EU, 2022).

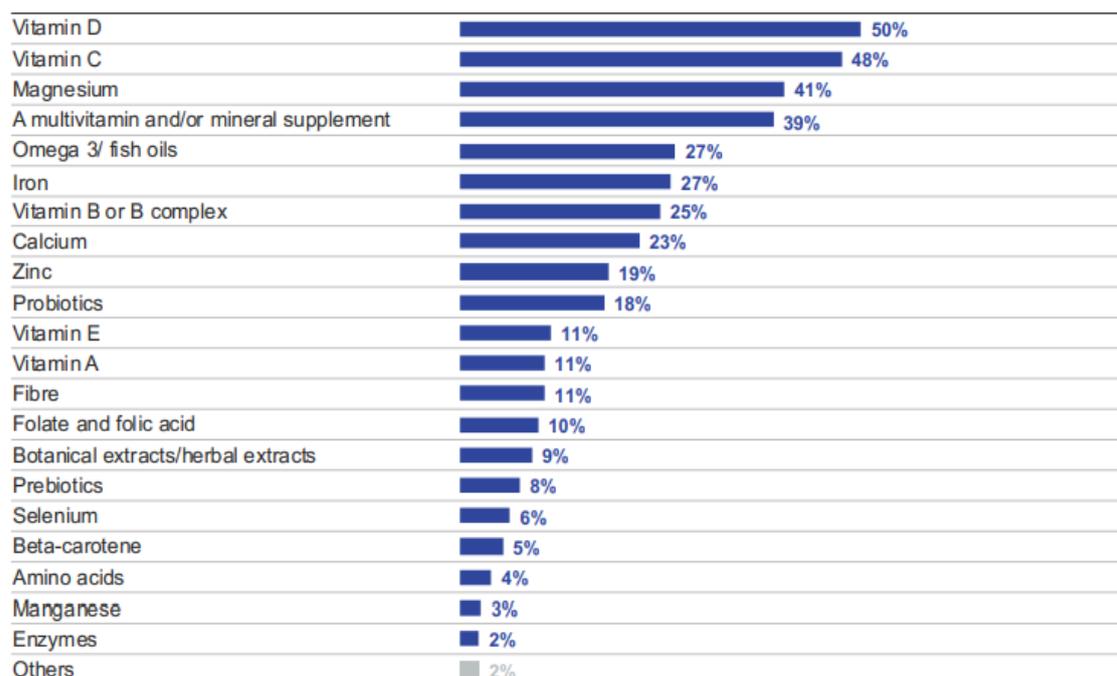


Fig. 1.1 Integratori usati in assoluto.

Gli integratori alimentari vengono solitamente pensati e formulati a livello aziendale, in base alla stagione e alla tipologia del consumatore cui potrebbero essere rivolti. In primavera possiamo trovare prodotti destinati a incrementare il drenaggio dei liquidi corporei e la funzionalità delle vie urinarie. Col sopraggiungere dell'estate l'attenzione è rivolta ai prodotti destinati al controllo del peso corporeo, mentre con l'arrivo dei mesi autunnali e invernali ai prodotti che portano benessere alle prime vie respiratorie. Oltre a questi tipi di integratori, ce ne sono alcuni che vengono richiesti tutto l'anno come, ad esempio, gli integratori per il corretto funzionamento dell'intestino, volti alla prevenzione dello sviluppo di fattori di rischio come il colesterolo, oppure per favorire il riposo notturno.

1.1.1 Regolamentazione integratori

Nell'UE vige un corpus legislativo armonizzato che disciplina le vitamine e i minerali nonché le sostanze utilizzate come loro fonti, le quali possono essere impiegate nella produzione di integratori alimentari. Per gli ingredienti diversi dalle vitamine e dai minerali, la Commissione europea ha stabilito altrettante norme armonizzate al fine di proteggere i consumatori da potenziali rischi per la salute e gestisce un elenco di sostanze note per o sospettate di avere effetti nocivi sulla salute, il cui uso è quindi sottoposto a limitazioni.

L'EFSA (European Food Safety Authority), tra il 2005 e il 2009, ha eseguito svariate valutazioni per regolamentare vitamine e sali minerali, in modo da stabilire i livelli di sicurezza di assunzione di determinate molecole oltre che la loro effettiva biodisponibilità per l'organismo. Per biodisponibilità si intende la quantità di molecola che è in grado di essere assorbita dall'organismo (Food-supplements, www.efsa.europa.eu).

Nel 2018 l'EFSA ha pubblicato la "Overview on Tolerable Upper Intake Levels derived by the Scientific Committee on Food (SCF)", ossia una Panoramica sui Livelli di Assunzione Superiore Tollerabile (UL), secondo quanto stabilito dal Comitato Scientifico dell'Alimentazione (SCF) e dal gruppo di esperti scientifici EFSA sui prodotti dietetici, l'alimentazione e le allergie (NDA).

Gli UL stabiliti dall'EFSA e dal disciolto SCF vengono usati come riferimento nella valutazione EFSA della sicurezza di sostanze nutritive aggiunte agli integratori alimentari, di cui si forniscono qui di seguito le due tabelle riepilogative.

	Unit	Age/Life-stage group								
		0-1 y	1-3 y	4-6 y	7-10 y	11-14 y	15-17 y	Adults	Pregnancy	Lactation
Boron	mg/d		3	4	5	7	9	10	10	10
Calcium	mg/d	No adequate data to derive a UL						2500	2500	2500
Chloride		No adequate data to derive a UL								
Chromium (trivalent)		No adequate data to derive a UL								
Copper	mg/d		1	2	3	4	4	5	Insufficient data	
Iodine	µg/d		200	250	300	450	500	600	600	600
Iron		No adequate data to derive a UL								
Magnesium ^(a)	mg/d		Insufficient data	250	250	250	250	250	250	250
Manganese		No adequate data to derive a UL								
Molybdenum	mg/d		0.1	0.2	0.25	0.4	0.5	0.6	0.6	0.6
Nickel		No adequate data to derive a UL								
Phosphorus		No adequate data to derive a UL								
Potassium		No adequate data to derive a UL								
Selenium	µg/d		60	90	130	200	250	300	300	300
Silicon		No adequate data to derive a UL								
Sodium		No adequate data to derive a UL								
Tin		No adequate data to derive a UL								
Vanadium		No adequate data to derive a UL								
Zinc	mg/d		7	10	13	18	22	25	25	25
	Unit	Age/Life-stage group								
		0-1 y	1-3 y	4-8 y	9-14 y	15-17 y	Adults	Pregnancy	Lactation	
Fluoride	mg/d		1.5	2.5	5	7	7	7	7	

Tabella 1. Riassunto dei Tolerable Upper Intake Levels (UL) dei minerali.

	Unit	Age/Life-stage group									
		0-6 mo	6-12 mo	1-3 y	4-6 y	7-10 y	11-14 y	15-17 y	Adults	Pregnancy	Lactation
VITAMINS											
Biotin		No adequate data to derive a UL									
β-Carotene		No adequate data to derive a UL									
Folic acid (synthetic)	µg/d			200	300	400	600	800	1000	1000	1000
Niacin											
Nicotinamide	mg/d			150	220	350	500	700	900	Inadequate data	
Nicotinic acid	mg/d			2	3	4	6	8	10	Inadequate data	
Pantothenic acid		No adequate data to derive a UL									
Vitamin A ^(a)	µg RE/d			800	1100	1500	2000	2600	3000 ^(b)	3000	3000
Vitamin B1		No adequate data to derive a UL									
Vitamin B12		No clearly defined adverse effects									
Vitamin B2		No adequate data to derive a UL									
Vitamin B6	mg/d			5	7	10	15	20	25	25	25
Vitamin C		No adequate data to derive a UL									
Vitamin D	µg/d	25	35	50	50	50	100	100	100	100	100
Vitamin E	mg/d			100	120	160	220	260	300	300	300
Vitamin K		No adequate data to derive a UL									
FATTY ACIDS											
DHA, EPA, DPA		No adequate data to derive a UL									

Tabella 2. Riassunto dei Tolerable Upper Intake Levels (UL) delle vitamine e di alcuni acidi grassi.

Se non tutte le molecole sono state valutate, ma si vuole usarle come componente di un integratore, il produttore deve presentare apposita domanda alla Commissione europea. In tal caso l'EFSA sarà incaricata di valutare i possibili rischi e la sicurezza della molecola in esame e formulerà un parere scientifico alla Commissione europea, che provvederà ad aggiornare la lista delle sostanze vitaminiche o dei minerali autorizzati ad essere inseriti negli integratori.

Nel caso descritto dall'art. 8 del regolamento (CE) 1925/2006, "... se una sostanza diversa dalle vitamine o dai minerali ... è aggiunta agli alimenti ... in condizioni che comporterebbero l'ingestione di quantità di questa sostanza notevolmente superiore a quelle ragionevolmente prevedibili ... in condizioni normali ... e/o rappresenterebbe

altrimenti un rischio potenziale per i consumatori ..." (Art. 8, Regolamento 1925/2006/CE), la Commissione europea può richiedere all'EFSA di valutare i rischi in cui si può incorrere in queste condizioni e nel caso inserire la molecola nella lista di quelle vietate, limitate o in corso di esame (Allegato III Regolamento 1925/2006/CE). L'allegato I della direttiva 2002/46/CE stabilisce l'elenco di vitamine e minerali che possono essere aggiunti per scopi nutrizionali agli integratori alimentari (ad esempio vitamina C, calcio). L'allegato II della stessa direttiva contiene un elenco di sostanze che sono autorizzate come fonte delle vitamine e dei minerali elencati nell'allegato I (ad esempio L-ascorbato di sodio come fonte di vitamina C, lattato di calcio come fonte di calcio).

Nella produzione di integratori alimentari può essere autorizzato l'uso di ingredienti diversi da vitamine e minerali, ad esempio prodotti botanici, sulla base di altre normative specifiche relative alla natura della sostanza (nuovi alimenti, sostanze per la fortificazione degli alimenti, alimenti per gruppi specifici).

Tuttavia le sostanze che non rientrano nelle categorie suindicate si possono ancora ritrovare negli integratori alimentari presenti sui mercati nazionali, a seconda delle disposizioni contenute nelle specifiche legislazioni di ciascuno Stato.

All'interno di un integratore possono essere presenti anche estratti ottenuti da fonte animale: il colostro bovino, la carnitina, la melatonina (ottenuta anche da fonte vegetale), la colina, il coenzima Q10 (ubichinone), acidi grassi polinsaturi, lattoferrina e molti altri ancora.

Anche gli estratti vegetali possono essere addizionati negli integratori. Attualmente sul sito del Ministero della Salute sono menzionate più di mille piante, essiccate oppure sotto forma di estratti, autorizzate all'utilizzo nella composizione di integratori alimentari, secondo le modalità definite da una specifica norma (D.M. 10 agosto 2018). Oltre alle sostanze aggiunte per scopi nutrizionali, gli integratori possono contenere anche additivi alimentari, vale a dire sostanze aggiunte ai prodotti per motivi tecnologici (ad esempio agenti di rivestimento delle compresse, edulcoranti). L'elenco degli additivi alimentari autorizzati è disponibile nel regolamento (CE) 1333/2008.

1.1.2 Etichettatura integratori alimentari

La direttiva 2002/46/CE stabilisce i requisiti obbligatori di etichettatura per gli integratori alimentari. Tali requisiti comprendono:

- la denominazione di vendita del prodotto, cioè “integratore alimentare”;
- l’effetto nutritivo o fisiologico attribuito all’integratore alimentare sulla base dei suoi costituenti, in modo da orientare le scelte del consumatore;
- il nome delle categorie di sostanze nutritive o altre sostanze che caratterizzano il prodotto, o un’indicazione relativa alla natura di tali componenti;
- la dose di prodotto consigliata per il consumo quotidiano;
- le quantità delle sostanze nutritive o delle altre sostanze aventi effetto fisiologico o nutritivo riportate in forma numerica e riferite alla dose giornaliera di prodotto raccomandata dal produttore;
- un’avvertenza a non eccedere le dosi giornaliere raccomandate;
- l’indicazione che gli integratori alimentari non vanno intesi come sostituto di una dieta variata;
- la raccomandazione di tenere i prodotti fuori dalla portata dei bambini.

Inoltre, le indicazioni sulla salute apposte sui prodotti alimentari non devono attribuire agli integratori alcuna proprietà di prevenire, curare o guarire una malattia nell’uomo, né fare riferimento a tali proprietà.



Fig. 1.2 Esempio di etichettatura apposta su un integratore alimentare.

La Commissione europea, di propria iniziativa o sulla base delle informazioni fornite dagli Stati membri, e a seguito di una valutazione dell'EFSA, può decidere di includere una determinata sostanza in un elenco di sostanze il cui uso negli alimenti è vietato, limitato o in corso di esame. Ciò può verificarsi quando l'aggiunta di una sostanza nei prodotti alimentari fa aumentare l'esposizione del consumatore a livelli notevolmente superiori rispetto a quelli di un normale consumo e/o rappresenta un potenziale rischio per i consumatori. Questa procedura è definita nell'art. 8 del regolamento (CE) 1925/2006 e le sostanze il cui uso negli alimenti è vietato, limitato o sottoposto a controllo sono elencate nel suo allegato III.

1.1.3 Produzione e confezionamento

La produzione e il confezionamento degli integratori alimentari sono soggetti al rispetto di tutte le condizioni e delle regole previste per gli alimenti dalla normativa comunitaria in materia di sicurezza alimentare, ovvero dal regolamento (CE) 178/2002 e dal cosiddetto "Pacchetto igiene", di cui fanno parte i regolamenti (CE) 852 e 853 del 2004, insieme al regolamento (UE) 625/2017.

I produttori di integratori alimentari devono quindi applicare le norme HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) e garantire la tracciabilità e rintracciabilità dei loro prodotti al pari di quanto previsto per gli altri alimenti.

Tutto ciò permette di avere un quadro completo dell'intero processo di produzione, lavorazione e confezionamento, oltre che della modalità di conservazione e scadenza dell'integratore alimentare. Nel caso in cui si manifestassero criticità si può risalire al prodotto tramite il lotto di lavorazione.

1.1.4 Utilizzo integratori

Generalmente gli integratori rientrano in un'operazione commerciale che fa presa su mode del momento e sulla comune convinzione che non abbiano comunque alcun effetto negativo, nel caso non riescano a raggiungere l'effetto desiderato. Se non necessari per un corretto funzionamento dell'organismo e se la loro carenza non deve essere corretta, non sussiste alcuna evidenza scientifica che documenti il beneficio di una extra-assunzione. I dati disponibili suggeriscono, al contrario, che l'uso cronico di questi prodotti sia rischioso.

Un pregiudizio comune è che il cibo di oggi non sia in grado di sopperire al fabbisogno quotidiano di nutrienti e che, pertanto, vada integrato. Il concetto di integrazione dà

l'impressione di completezza, di un rimedio possibile all'idea che gli alimenti siano insufficienti ad assicurare la nostra funzionalità e, perciò, la nostra salute.

In realtà, mai come in questi ultimi decenni, nei Paesi industrializzati vi è stata abbondanza di cibo, spesso iperproteico e ipercalorico, causa prevalente di obesità, patologia che si sta diffondendo in modo sempre più preoccupante. Esistono però casi in cui risulta comunque necessario integrare.

Si tratta di:

- carenze conseguenti a stati patologici, come alterata digestione/assorbimento, un diminuito introito o un'aumentata escrezione, malnutrizione;
- disturbi alimentari, vomito, degenza ospedaliera (mancata o ridotta sintesi endogena, epatopatia alcolica);
- carenze conseguenti a scelte etiche (carenza di ferro nei vegetariani, carenza di vitamina B12 nei vegani).

In linea generale un'alimentazione corretta ed equilibrata mette al sicuro da rischi di carenza da vitamine idrosolubili.

L'utilizzo di integratori alimentari è dunque limitato alla prevenzione della malnutrizione per difetto.

La loro presunta valenza salutistica nel promuovere il benessere fisico, nel ritardare l'invecchiamento e nel ridurre il rischio di sviluppare alcune patologie del benessere (malattie cardiovascolari o metaboliche, come anche alcune neoplasie) è ancora attualmente oggetto di studio e di ricerche.

1.1.5 Classificazione degli integratori

Le componenti che possono costituire gli integratori alimentari sono dunque molteplici: si va dalle vitamine ai minerali, ad acidi grassi ed erbe. La concentrazione di tutti questi ingredienti deve essere attentamente controllata e deve rispettare rigide normative. Negli integratori, oltre a questi ingredienti, sono contenuti anche eccipienti, cioè sostanze aggiunte al prodotto finale per diversi scopi, come conservanti e aromi.

In commercio a seconda degli ingredienti utilizzati possiamo trovare:

- integratori di vitamine e/o sali minerali, che sono oggi quelli più utilizzati dal consumatore "generico", ossia che non pratica sport particolari o ha altre esigenze specifiche;
- integratori di aminoacidi, prodotti dedicati a chi pratica sport con esercizio aerobico intenso e prolungato;

- derivati di aminoacidi, ad esempio a base di creatina, sostanza che viene normalmente sintetizzata nel nostro organismo a partire da tre aminoacidi diversi, ma che può essere integrata per soggetti che praticano sport come culturismo e sollevamento pesi, che richiedono molto sforzo muscolare;
- integratori di proteine, che vengono di solito utilizzati dagli sportivi in quanto sono indicati per implementare la massa muscolare;
- integratori di acidi grassi, utilizzati in caso di dieta povera di acidi grassi essenziali come omega 6 e omega 3; prevengono l'invecchiamento cutaneo e l'ossidazione cellulare e sono in generale utilizzati a scopo preventivo;
- integratori a base di probiotici, che favoriscono il riequilibrio o il mantenimento della flora batterica intestinale;
- integratori di fibre, che possono essere prevalentemente a base di guar, agar agar, glucomannano, pectina e psillio, utili per il controllo metabolico o per stimolare la funzionalità intestinale;
- integratori o complementi alimentari a base di ingredienti costituiti da piante o derivati come berberina, silimarina, monacolina K e altri;
- integratori proposti come coadiuvanti di diete per il controllo e la riduzione del peso, ad esempio la fibra alimentare solubile.

Ma gli integratori, dunque, hanno effetti positivi sul corpo? E se sì, quali?

Per rispondere a questa domanda saranno prese in esame alcune molecole presenti negli integratori alimentari: la silimarina, la berberina e la monacolina K.

1.2 Silimarina

La silimarina è l'estratto standardizzato di cardo mariano (*Silybum marianum*), composto da 4 isomeri del flavonolignano: silibinina, isosilibinina, silidianina e silicristina (Fig. 1.3). Viene usata all'interno di integratori alimentari per disturbi gastrointestinali e malattie del fegato, oltre che come trattamento naturale per le malattie delle vie biliari.

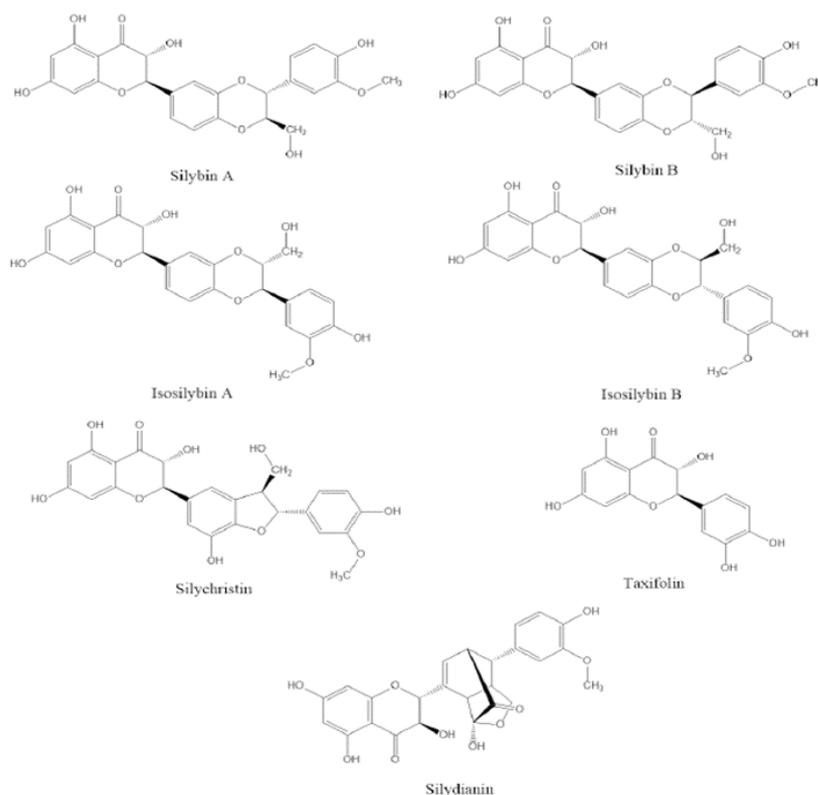


Fig. 1.3 Strutture chimiche dei fitocostituenti presenti nella silimarina (Wadhwa K. *et al.*, 2022).



Fig. 1.4 Cardo mariano.

Si è visto come la silimarina abbia un ampio spettro di proprietà epatoprotettive, che potrebbero essere utili in condizioni di danno epatico sia acuto che cronico, previene la perossidazione lipidica e i cambiamenti nella composizione dei fosfolipidi di membrana. Previene l'esaurimento del glutatione e migliora il profilo dei marcatori associati al danno epatico, dovuti probabilmente all'effetto della silibinina sulle cellule di Kupffer. Ad una certa concentrazione ottenibile *in vivo*, la silibinina inibisce la formazione di radicali dell'ossigeno prevenendo così possibili danni a livello epatico e riduce la sintesi del leucotriene B4 modulando la risposta infiammatoria (Dehmlow C. *et al.*, 1996). La silimarina, inoltre, si è rivelata un trattamento efficace nel contrastare gli effetti di molte tossine epatiche attraverso un'azione rigenerativa sugli epatociti.

I preparati di *Silybum marianum* hanno dimostrato di essere epatoprotettivi e citoprotettivi regolando l'infiammazione e interferendo con i meccanismi apoptotici mediati dal TNF- α (Gažák R. *et al.*, 2007).

La silimarina possiede un'enorme gamma di potenzialità biologiche e farmacologiche, perché è in grado di interagire direttamente o indirettamente con diversi bersagli molecolari, inclusi fattori di trascrizione, mediatori infiammatori, proteina chinasi, recettori ed enzimi, come illustrato in Fig. 1.5.

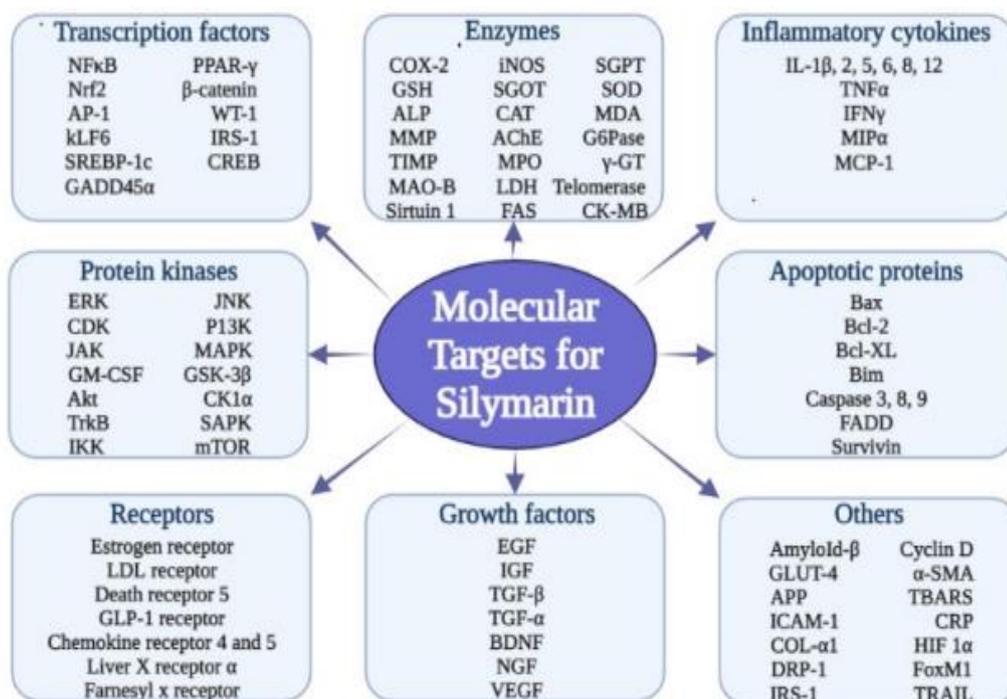


Fig. 1.5 Varie molecole target della silimarina (Wadhwa K. *et al.*, 2022).

La silimarina ha una lunga storia di uso tradizionale nella medicina ayurvedica come agente epatoprotettivo ed è oggi ampiamente utilizzata nel trattamento e nella gestione di numerosi disturbi epatici, come malattia epatica alcolica, tumori epatici, steatosi epatica non alcolica (NAFLD), steatoepatite non alcolica (NASH) e tossicità da farmaci. Nell'ultimo decennio sono stati condotti numerosi studi sulle potenti azioni epatoprotettive della silimarina e dei suoi flavonolignani.

La gamma-glutamyl transferasi (γ GT), la transaminasi glutammico-ossalacetica (SGOT), la transaminasi glutammico piruvica (SGPT) e il fosfato alcalino (ALP) sono enzimi essenziali e caratteristici del fegato e i loro livelli elevati indicano epatotossicità. È stato scoperto che la silimarina diminuisce i livelli di questi enzimi epatici, previene la fuga cellulare e la perdita di integrità funzionale delle membrane degli epatociti. Inoltre, la silimarina e i suoi flavonolignani hanno un ruolo significativo nella riduzione del colesterolo (CH), dei trigliceridi (TG), dei livelli di lipoproteine a bassa densità (LDL) e nell'aumento del contenuto di lipoproteine ad alta densità (HDL) (Derosa G. *et al.*, 2015).

1.2.1 La silimarina come antiossidante

Recentemente è stato valutato l'effetto epatoprotettivo della silimarina su un modello di ratto con NAFLD indotta da fruttosio, dove il trattamento con silimarina ha migliorato significativamente il profilo lipidico e la funzionalità epatica insieme allo stato di stress ossidativo (Mengesha T. *et al.*, 2021).

L'olio di *Sylibum marianum* impedisce lo stress ossidativo nella dieta ricca di grassi (HFD) aumentando i livelli di enzimi antiossidanti endogeni. Inoltre, nel fegato migliora la sintesi e l'ossidazione degli acidi grassi epatici, riducendo i livelli di mRNA dell'acido grasso sintasi (FAS), del recettore X α e della proteina legante l'elemento regolatore degli steroli 1c (SREBP-1c) (Zhu S. *et al.*, 2018).

1.2.2 La silimarina e le sue proprietà antinfiammatorie

Insieme allo stress ossidativo, l'infiammazione è considerata un altro mediatore fondamentale della NAFLD e della NASH. Fondamenti preclinici e clinici hanno rivelato che la silimarina presenta azioni antinfiammatorie; infatti, è in grado di reprimere il rilascio di citochine (Ou Q. *et al.*, 2018; Aghazadeh S. *et al.*, 2011; Kim S.H. *et al.*, 2016; Zhang B. *et al.*, 2018; Clichici S. *et al.*, 2015; Federico A. *et al.*, 2019) oltre che

ridurre significativamente i livelli del fattore di necrosi tumorale- α (TNF α) pro-infiammatorio e le interleuchine IL-6, IL-1 β e IL-12 β (Ou Q. *et al.*, 2018).

Diversi studi hanno inoltre evidenziato che anche l'effetto immunomodulatore della silimarina e dei suoi biocostituenti potrebbe svolgere un ruolo notevole nell'epatoprotezione (Abenavoli L. *et al.*, 2017; Gharagozloo M. *et al.*, 2013).

Si è evidenziato poi che il comportamento anti-apoptotico e pro-apoptotico della silimarina facilita notevolmente la protezione del fegato, sfruttando sempre il suo effetto antiossidante, che regola negativamente l'apoptosi.

1.2.3 La silimarina e gli effetti sul diabete mellito

Il diabete mellito (DM) è una malattia metabolica progressiva caratterizzata da iperglicemia cronica dovuta a resistenza e ridotta sintesi di insulina. La silimarina e i suoi costituenti sono stati descritti per il loro potenziale effetto ipoglicemico tramite prove sperimentali e cliniche; i risultati hanno suggerito che essa è in grado di ridurre il livello di glucosio nel sangue oltre ad aumentare la secrezione di insulina. La silimarina inibisce anche la gluconeogenesi e la glucosio-6-fosfatasi (G6Pase) (Guigas B. *et al.*, 2007).

L'iperglicemia cronica va ad influenzare la catena respiratoria mitocondriale producendo danni ossidativi, con conseguente crescita e sviluppo del DM e delle sue complicanze associate. Il trattamento con silimarina previene significativamente il danno ossidativo impedendo la perossidazione lipidica, l'ossidazione delle proteine e la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Feng B. *et al.*, 2016; Amniattalab A. *et al.*, 2016; Malekinejad H. *et al.*, 2014).

È stato osservato che la silicristina A, uno dei composti bioattivi degli estratti di silimarina, protegge significativamente l'apoptosi indotta da ROS nelle cellule INS 1, elevando i livelli di proteina Bax e caspasi-3 scissa e determinano una down-regulation delle espressioni geniche Bcl-2 e pro-caspasi-3 (Qin N. *et al.*, 2017).

L'infiammazione è un altro fattore chiave nella progressione e nelle complicanze del diabete. Le citochine infiammatorie hanno un ruolo decisivo nella gestione dell'omeostasi del glucosio e della resistenza all'insulina. Qualsiasi cambiamento anomalo nelle citochine pro-infiammatorie (IL-6 e TNF- α) potrebbe diminuire la sensibilità all'insulina e determinare una forma di resistenza ad essa. Al contrario, le infiltrazioni di queste cellule possono causare insufficienza delle cellule β pancreatiche (Guo Y. *et al.*, 2016).

Diversi studi hanno rilevato che il trattamento con silimarina riduce la risposta infiammatoria inibendo i geni bersaglio di NF- κ B (Guo Y. *et al.*, 2016; Kim E.J. *et al.*, 2014), l'interferone- γ (IFN- γ), la generazione di ossido nitrico (NO) indotta da TNF- α e IL-1 β , sopprimendo l'espressione inducibile di ossido nitrico sintasi (iNOS) nelle cellule β pancreatiche attraverso la modulazione dell'attività di NF- κ B e la via di segnalazione delle chinasi 1/2 regolata dal segnale ERK1/2, impedendo così la degradazione delle cellule β pancreatiche (Kim E.J. *et al.*, 2014).

È stato osservato che la silibinina modula anche l'espressione del recettore del glucagone-like peptide (GLP)-1 nel duodeno e attiva i neuroni attorno al tratto solitario stimolando l'asse intestino-cervello-fegato, dimostrando così l'azione antidiabetica potenziale della silimarina (Xu F. *et al.*, 2018).

Il fattore di trascrizione Pdx1 si ritiene che sia direttamente coinvolto nella crescita del pancreas e nell'espressione del gene dell'insulina; i risultati di uno studio hanno rivelato che la silimarina aumenta i livelli di Pdx1 e l'espressione del gene dell'insulina nei ratti pancreatectomizzati, determinando miglioramenti nella proliferazione delle cellule β (Soto C. *et al.*, 2014).

Inoltre, è emerso che la somministrazione di silimarina aumenta la regolazione dell'espressione del gene NKx6.1, responsabile della neogenesi e della differenziazione e mantenimento delle cellule β del pancreas (Soto C. *et al.*, 2014).

Infine, si è dimostrato che la silibinina attiva il substrato del recettore dell'insulina attraverso la via di segnalazione IRS-1/PI3K/Akt, che di conseguenza aumenta l'assorbimento del glucosio mediato dall'insulina e trasloca il trasportatore del glucosio GLUT4 (Li H.B. *et al.*, 2015).

1.2.4 Malattie cardiovascolari e silimarina

Le malattie cardiovascolari rappresentano attualmente la principale causa di mortalità negli adulti anziani e sono solitamente associate al danno ischemico (Wang X. *et al.*, 2020). La ricerca ha rivolto grande attenzione a questo fenomeno, al fine di individuare nuove possibili soluzioni e promuovere la salute cardiaca. Sono stati pertanto effettuati vari studi *in vitro* e *in vivo* che descrivono gli effetti cardioprotettivi della silimarina, dai quali emerge la sua utilità nel ridurre i livelli di malondialdeide (MDA), lattato deidrogenasi (LDH), troponina C e creatinchinasi-MB (CK-MB), importanti biomarcatori cardiaci (Alabdian M.A., 2015; Al-Rasheed N.M. *et al.*, 2014; Rao P.R. e Viswanath R.K., 2007).

Il trattamento con silimarina riduce anche lo stress ossidativo del miocardio aumentando la catalasi (CAT) e l'attività della superossido dismutasi (SOD), nonché il contenuto di glutatione (GSH) nel cuore (Taghiabadi E. *et al.*, 2012).

Oltre che abbassare il livello degli enzimi cardiaci, essa protegge il cuore arrestando l'apoptosi dei cardiomiociti, diminuisce il rapporto Bax/Bcl-2, abbassa il contenuto citosolico di citocromo C e i livelli di caspasi-3 nel cuore (Taghiabadi E. *et al.*, 2012).

Si evince da alcuni studi come l'assunzione di silimarina nei ratti intossicati da CCl₄ diminuisca notevolmente il livello di VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), un importante biomarcatore angiogenico.

Si è osservato un miglioramento del livello dei biomarcatori infiammatori e immunologici, come ad esempio TNF- α , InF γ , IL-6 e proteina C-reattiva (CRP), a seguito di utilizzo di silimarina e si è indagata la sua potenza antinfiammatoria nella protezione contro il danno miocardico (Al-Rasheed N.M. *et al.*, 2014).

La 2,3-deidrosilibinina, un costituente della silimarina, aumenta notevolmente l'espressione del gene della luciferasi e i livelli di cAMP (cyclic Adenosine Monophosphate) intracellulare, inducendo anche l'inibizione dell'enzima fosfodiesterasi nei cardiomiociti isolati di ratto (Gabrielová E. *et al.*, 2015).

La silimarina sembrerebbe svolgere un ruolo fondamentale nel ridurre i livelli elevati della pressione atriale (BP), in particolare la pressione arteriosa sistolica e arteriosa basale oltre che la frequenza cardiaca, sia nel modello di ipertensione indotta da deossicorticosterone acetato e dieta ricca di sale (DOXA-salt diet), sia nel modello di ipertensione indotta dal fruttosio.

1.2.5 Rischi possibili nell'assunzione di silimarina

Riguardo alle possibili complicazioni dovute ad un'assunzione errata di silimarina, non è stato segnalato alcun caso di sovradosaggio e sono disponibili dati provenienti da studi clinici condotti su oltre 4.000 pazienti.

I dati clinici confermano quindi la tollerabilità e la sicurezza della silimarina e del cardo mariano, mentre i dati sulla genotossicità sono piuttosto contraddittori (EMA, 2015).

1.2.6 Vie di assorbimento della silimarina

La silimarina ha un assorbimento orale solo del 23-47% circa e una rapida coniugazione di fase II, che porta ad una bassa biodisponibilità (Javed S. *et al.*, 2011).

È opinione comune che la silimarina soffra di una bassa biodisponibilità a causa della scarsa solubilità in acqua (Bijak M., 2017). Il modello monostrato cellulare Caco-2 è stato utilizzato per studiare l'assorbimento intestinale della silibinina (Yuan Z.W. *et al.*, 2018). I rapporti medi di efflusso misurati della silibinina A e della silibinina B erano rispettivamente 5,05 e 4,61, indicando un meccanismo di trasporto attivo. Inoltre, MK571 (un inibitore specifico della proteina associata alla resistenza multifarmaco, MRP2) ha ridotto significativamente il rapporto di efflusso di silibinina, mentre sia Ko143 (un inibitore specifico della proteina di resistenza del cancro al seno, BCRP) che la ciclosporina A (un inibitore sia del BCRP che della glicoproteina P) avevano un minore effetto, suggerendo che l'efflusso intestinale di silibinina è mediato da MRP e probabilmente BCRP.

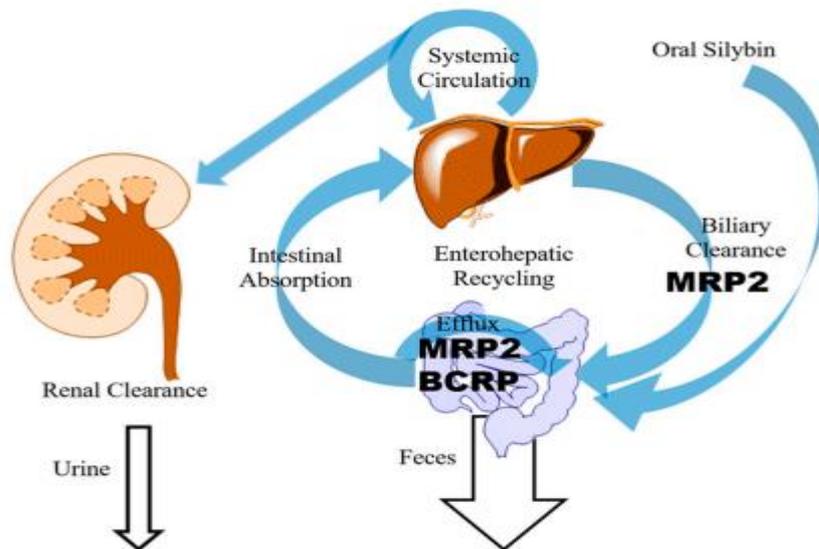


Fig. 1.6 Trasportatori adibiti alla disposizione della silimarina nell'organismo e la sua eliminazione (Xie Y. *et al.*, 2019).

Dopo la somministrazione orale, la silibinina subisce sia la biotrasformazione di fase I che quella di fase II (Kren V. *et al.*, 2013). I metaboliti di fase I della silibinina includono principalmente quelli O-demetilati mediati dall'isoenzima CYP2C8 (Jančová P. *et al.*, 2007). Inoltre, si osservano anche quattro metaboliti minori, di cui tre monoidrossilici e uno diidrossilico, sebbene le loro strutture non siano confermate (Gunaratna C. *et al.*, 2003). La silibinina e i suoi metaboliti di fase I subiscono un'ampia biotrasformazione di fase II, poiché la maggior parte della silibinina nel sistema esiste in forma coniugata, con circa il 55% di coniugati glucuronidati e il 28% di coniugati solfati (Fried M.W. *et al.*, 2012; Loguercio C. *et al.*, 2011). Le reazioni di glucuronidazione della silibinina

sono mediate dalla UDP-glucuronosiltransferasi (UGT)1A1, 1A6, 1A7, 1A9, 2B7 e 2B15, mentre le reazioni di solforazione sono mediate dalle solfotransferasi (SULT) (Jančová P. *et al.*, 2011). Dopo la somministrazione di silimarina sono stati rilevati nel plasma quattro monoglucuronidi, 1 diglucuronide, 3 monosolfati, 2 glucuronidi solfati e glucuronide O-demetilato (Hoh C.S. *et al.*, 2007 e 2006).

Esistono due principali siti di glucuronidazione, C-7 e C-20. La silibinina è glucuronidata in modo stereoselettivo, con la silibinina B glucuronidata in modo più efficiente nella posizione C-20, mentre la silibinina A glucuronidata in modo simile su entrambi i siti (Han Y.H. *et al.*, 2004), a causa dell'attività stereoselettiva di alcune isoforme UGT (Jančová P. *et al.*, 2011). Il rapido ed esteso metabolismo di fase II della silibinina è stato considerato la ragione principale della sua bassa biodisponibilità. Tuttavia, in un gruppo di 56 soggetti con diagnosi di epatite C (HCV) o di steatosi epatica non alcolica (NAFLD), l'allele mutante UGT1A1*28 ha prodotto poca variabilità tra soggetti nella farmacocinetica della silibinina (Xie Y. *et al.*, 2019). Questi dati indicano che il ruolo dell'attività degli enzimi metabolici è oscurato da altri fattori più prevalenti.

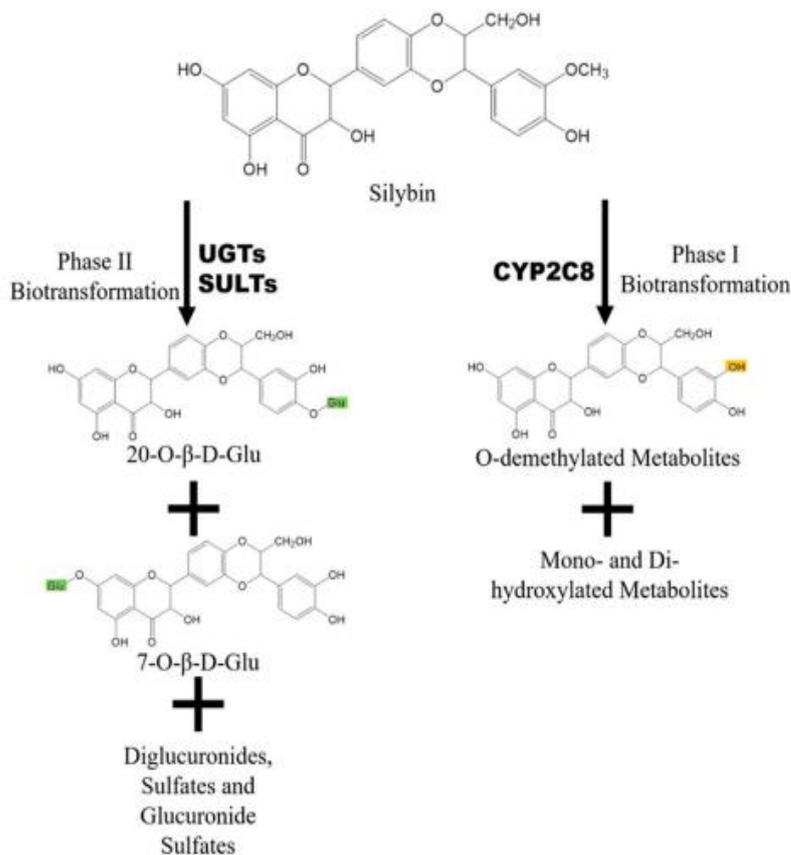


Fig. 1.7 Metabolismo della silibinina e i suoi metaboliti. UGT: UDP-glucuronosiltransferasi; SULTs: solfotransferasi; CYP2C8: Citocromo P450 2C8 (Xie Y. *et al.*, 2019).

1.2.7 Eliminazione silimarina

Sia la silimarina libera che quella coniugata vengono eliminate rapidamente *in vivo*. Tuttavia, l'escrezione renale di silibinina è bassa e rappresenta solo l'1-2% di una dose orale originale nell'arco delle 24 ore (Lorenz D. *et al.*, 1984). Invece, l'escrezione epatobiliare è estesa, poiché la concentrazione biliare di silibinina è circa 100 volte superiore alla concentrazione sierica nei pazienti (Lorenz D. *et al.*, 1984). Sulla base del rapporto di distribuzione AUCbile/AUCsangue (rapporto di distribuzione sanguinabile) ($30 \pm 9,4$) della silibinina totale, si presume che la silibinina venga escreta nella bile attraverso il trasporto attivo (Wu J.W. *et al.*, 2007). Come con la maggior parte dei flavonoidi, il comportamento farmacocinetico della silibinina *in vivo* mostra una circolazione enteroepatica, dove la silibinina glucuronidata escreta subisce la scissione enzimatica batterica dei legami β -glucosidici e viene riassorbita (Wen Z.W. *et al.*, 2008). Miranda *et al.*, utilizzando fegato di ratto perfuso di ratti Wistar wild type carenti di MRP2 (TR-), hanno dimostrato che MRP2 è il trasportatore principalmente responsabile dell'escrezione biliare di silibinina libera e coniugata (Miranda S.R. *et al.*, 2008). Rimane sconosciuto se e in che misura la BCRP sia coinvolta nell'escrezione biliare della silibinina (Yuan Z.W. *et al.*, 2018). Prendendo in considerazione i trasportatori di efflusso responsabili dell'escrezione e dell'assorbimento della silibinina e dei suoi metaboliti, i ricercatori hanno dimostrato che i potenziatori della biodisponibilità, o bio-potenziatori, aumentano la biodisponibilità e gli effetti farmacologici della silibinina *in vivo*.

1.3 Berberina

La berberina è un alcaloide vegetale con una lunga storia di uso medicinale. È presente in *Hydrastis canadensis* (goldenseal), *Coptis chinensis* (coptis o filo d'oro), *Berberis aquifolium* (uva dell'Oregon), *Berberis vulgaris* (crespino) e *Berberis aristata* (curcuma arborea, un arbusto spinoso eretto originario della regione settentrionale dell'Himalaya). La pianta è ampiamente distribuita dall'Himalaya allo Sri Lanka, al Bhutan e alle aree collinari del Nepal nella regione dell'Himalaya e in Cina. L'alcaloide berberina si trova nelle radici, nei rizomi e nella corteccia dello stelo delle piante. Gli estratti e i decotti di berberina hanno dimostrato una significativa attività antimicrobica contro una varietà di organismi, tra cui batteri, virus, funghi, protozoi, elminti e clamidia.

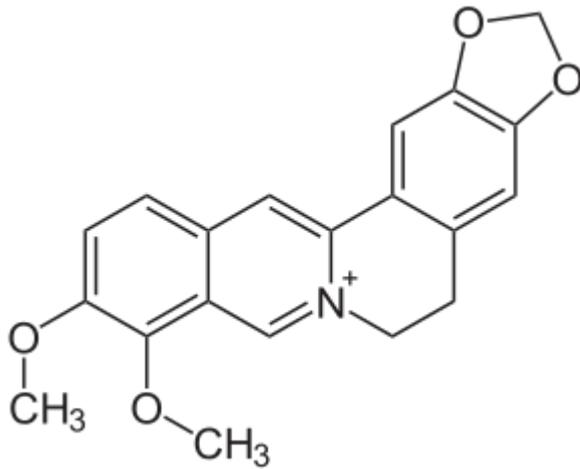


Fig. 1.8 Formula chimica berberina (Pirillo A. e Catapano L., 2015).



Fig. 1.9 *Berberis aristata*.

1.3.1 Principali funzioni della berberina

Berberis aristata è utilizzata nella medicina ayurvedica da molto tempo. Tradizionalmente se ne fa uso per far fronte a processi infiammatori, nella guarigione delle ferite, nelle malattie della pelle, nella menorragia, nell'ittero e nelle affezioni degli occhi (Sharma K. *et al.*, 2011). È stato scoperto che la berberina svolge anche attività ipolipidemizzanti e ipocolesterolemizzanti; tale attività si esercita principalmente attraverso due diversi meccanismi:

- ✓ sovraregola l'espressione epatica dei recettori LDL, allungando l'emivita dell'mRNA dei recettori LDL attraverso una stabilizzazione della sequenza stessa; questa modalità di azione è totalmente indipendente dalla concentrazione intracellulare di colesterolo e dal processo di attivazione della proteina legante l'elemento regolatore degli steroli (Abidi P. *et al.*, 2005);
- ✓ inibisce la proproteina convertasi subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) provocando un aumento dei livelli e una limitata degradazione del recettore epatico per le LDL (Li H. *et al.*, 2009).

L'aumento dei recettori LDL porta ad un assorbimento più efficiente delle LDL dal flusso sanguigno e ad una riduzione delle malattie cardiovascolari (Cicero A.F.G. *et al.*, 2007).

La berberina possiede anche alcuni meccanismi d'azione secondari; ad esempio riduce l'assorbimento intestinale del colesterolo aumentando l'escrezione fecale, oltre che favorire il turnover epatico del colesterolo e la formazione degli acidi biliari (Li X.Y. *et al.*, 2015).

Si è notata anche una riduzione media dal -15% al -20% del colesterolo LDL circolante, con singole somministrazioni orali da 500 mg fino a 1500 mg di berberina (Cicero A.F.G *et al.*, 2017).

In Cina, i medicinali a base di erbe sono e sono stati comunemente usati come approccio alternativo per il trattamento dell'iperlipidemia. Molti studi sulla berberina, infatti, vengono condotti in estremo Oriente e sono tuttora oggetto di una revisione sistemica.

La berberina da sola o in associazione con altri integratori alimentari potrebbe fungere da alternativa per pazienti intolleranti alle statine e per pazienti resistenti all'inizio della terapia con statine.

1.3.2 Effetti collaterali berberina

Sebbene la berberina sembri generalmente sicura, possono verificarsi alcuni effetti collaterali, come la stitichezza; infatti, la berberina è stata a lungo utilizzata come rimedio tradizionale per la diarrea infettiva in Cina. Tuttavia, gli effetti collaterali sono risultati tollerabili e sono stati alleviati dopo averne ridotto la dose (Dong H. *et al.*, 2013).

Può anche essere un'alternativa efficace per il trattamento delle dislipidemie. Una meta-analisi ha dimostrato che la berberina (range 600 mg – 1500 mg) ha notevolmente abbassato la concentrazione plasmatica di colesterolo totale, LDL-C e TG in monoterapia e come terapia aggiuntiva. Inoltre, ha aumentato moderatamente i livelli di HDL-C quando è stata usata in monoterapia. L'incidenza di eventi avversi non differiva tra il gruppo berberina e il gruppo di controllo. Questi risultati indicano che il trattamento con berberina è efficace e sicuro per il trattamento delle dislipidemie (Ju J. *et al.*, 2018).

Riguardo la dose terapeutica di berberina, fino a 0,5 g/die sono ben tollerate e le reazioni gastrointestinali avverse sono più spesso causate da sovradosaggio ≥ 4 g (Zhao Y. *et al.*, 2021).

Si è visto come la berberina somministrata per via orale sia ben tollerata nei roditori (da 100 a 300 mg/kg) e nell'uomo (500 mg dalle due alle tre volte al giorno/persona) (Lee Y.S. *et al.*, 2006; Leng S.H. *et al.*, 2004; Yin J. *et al.*, 2008; Zhang Y. *et al.*, 2008). Altri studi hanno dimostrato che la berberina cloridrato 25 μ M è ben tollerata dagli epatociti primari. Gli effetti citotossici osservati alle concentrazioni di 50 o 100 μ M di berberina cloridrato sono sensati, siccome la berberina e i suoi derivati hanno inibito

l'attività del complesso mitocondriale I della catena di trasporto degli elettroni (Turner N. *et al.*, 2008).

La tolleranza della berberina negli studi *in vivo* può essere attribuita alla sua scarsa biodisponibilità dovuta alla glicoproteina P nell'intestino tenue, che agisce attivamente rimuovendo la berberina e facendola uscire nel lume intestinale (Pan G. *et al.*, 2002).

1.3.3 Gli effetti della berberina cloridrato sull'espressione di geni epatici coinvolti nel metabolismo del glucosio e dei lipidi

Sono stati condotti studi sugli effetti della berberina cloridrato sull'espressione genica, in particolare su Gck (Glucokinase), G6pc (Glucose-6-phosphatase), Srebp-1c (Sterol regulatory element-binding protein 1c) e Pck1 (Phosphoenolpyruvate carboxykinase). La berberina aumenta l'espressione di Gck, è in grado di sopprimere l'espressione di G6pc in assenza di insulina e attenua l'espressione di Srebp-1c indotta da insulina. La berberina cloridrato ha dimostrato la capacità di regolare l'espressione di questi quattro geni dipendenti dall'insulina negli epatociti primari. La regolazione può essere mascherata dal trattamento con insulina (come Gck e G6pc). D'altra parte, la berberina cloridrato può modificare l'azione dell'insulina sull'espressione del suo gene bersaglio a valle (come Srebp-1c).

1.4 Monacolina K

Il riso rosso fermentato (RYR) è stato utilizzato per molti secoli nei paesi asiatici come colorante e medicinale versatile ed ha suscitato interesse tra i ricercatori occidentali, soprattutto nel XXI° secolo, grazie alle sue proprietà di riduzione del colesterolo, che potrebbero avere implicazioni pratiche per la salute dei pazienti intolleranti alle statine (Banach M. *et al.*, 2018 e 2019; Cicero A.F.G. *et al.*, 2017; Gerards M.C. *et al.*, 2015). Esso si ottiene dalla fermentazione del riso comune con la muffa *Monascus purpureus*. Durante il processo di fermentazione si produce un colore rosso in aggiunta ad una serie di sostanze attive ad azione farmacologica e tossica. La concentrazione di monacoline nel RYR raggiunge solitamente l'1,9%. Sono stati identificati diversi tipi di monacoline in base al ceppo di lievito utilizzato e alle condizioni di fermentazione. Uno di questi sottotipi è la monacolina K, isolata per la prima volta dal professor Akira Endo, biochimico giapponese, la cui ricerca sulla relazione tra funghi e biosintesi del colesterolo ha portato allo sviluppo di statine.

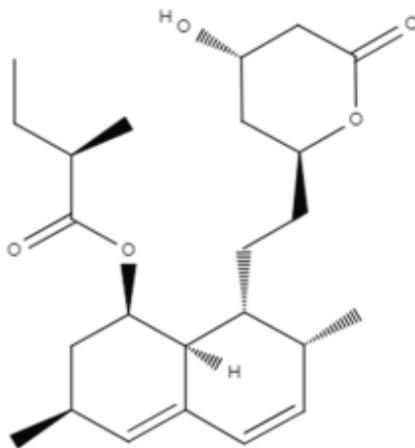


Fig. 1.10 Struttura chimica monacolina K (Fukami H. *et al.*, 2021).

La monacolina K è strutturalmente identica alla lovastatina, ragione per cui il RYR mostra i suoi effetti ipolipemici (Banach M. *et al.*, 2019), sebbene i loro profili farmacocinetici e la loro biodisponibilità siano diversi. La monacolina K è disponibile in due forme, ovvero lattone (forma inattiva) e acido idrossilico (forma attiva), che viene meglio assorbita (Banach M. *et al.*, 2019; Cicero A.F.G. *et al.*, 2017). La forma attiva partecipa alla riduzione del colesterolo totale e delle LDL. La monacolina K, analogamente alla lovastatina e ad altre statine, inibisce la 3-idrossi-3-metil-glutaril-coenzima A reduttasi (HMG CoA), il principale enzima responsabile della sintesi del colesterolo nel fegato (Banach M. *et al.*, 2019). Ciò si traduce in un'elevata attività dei recettori LDL sugli epatociti. La monacolina K viene catabolizzata nel fegato dagli enzimi 3A4 del citocromo 450 (CYP 450) e dalla glicoproteina P, che partecipano al catabolismo di molti farmaci (Banach M. *et al.*, 2018; Chen C.H. *et al.*, 2012).

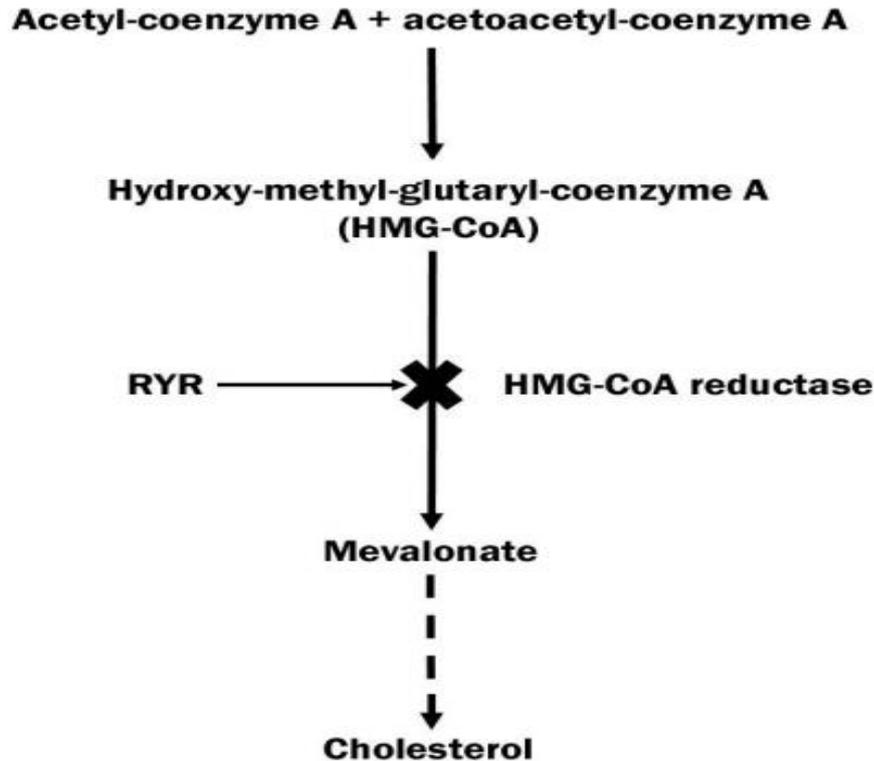


Fig. 1.11 Effetti del RYR sulla formazione del colesterolo (Cicero A.F.G. *et al.*, 2019).

Nelle persone sane con ipercolesterolemia da lieve a moderata e in quelle ad alto rischio di malattie cardiovascolari, le formulazioni RYR riducono i livelli di colesterolo totale (TC) del 16–31%, LDL-C del 22–32% e trigliceridi (TG) dello 0–36% a dosi comprese tra 200 e 3.600 mg/die; riducono anche il rischio di malattie cardiovascolari (Sahebkar A. *et al.*, 2016). L'effetto ipolipemizzante è dose-dipendente.

Dai risultati di una meta-analisi emerge che il RYR ha un effetto clinicamente e statisticamente significativo per quanto riguarda la riduzione del colesterolo LDL. Dai 2 ai 24 mesi di trattamento si è rilevata una diminuzione media di 1,02 mmol/L (~ 40 mg/dl) rispetto al placebo, evidenziando che potrebbe essere un metodo sicuro e un'opzione terapeutica efficace per il trattamento della dislipidemia e del rischio cardiovascolare nei pazienti intolleranti alle statine (Gerards M.C. *et al.*, 2015).

Le preparazioni di riso rosso fermentato hanno dimostrato di essere sicure ed efficaci nel migliorare i profili lipidici e, in una certa misura, nel ridurre il rischio di eventi cardiovascolari. Il riso rosso fermentato non dovrebbe essere utilizzato di routine in sostituzione dei trattamenti convenzionali (statine, ezetimibe e inibitori di PCSK9) per i quali esistono dati di qualità superiore sugli esiti a lungo termine. Tuttavia, in situazioni specifiche (intolleranza alle statine, pazienti con dislipidemia non eleggibili alla terapia

con statine, forte preferenza del paziente) può essere preso in considerazione l'uso del riso rosso fermentato.

Quando si consiglia un prodotto a base di riso rosso fermentato ai pazienti, è importante assicurarsi che esso rispetti i principi di GMP (Good Manufacturing Practice), al fine di garantire la coerenza della dose del principio attivo e l'assenza di contaminanti dannosi.

Uno degli ingredienti presenti nel riso rosso fermentato, oltre alle statine, è il GABA (acido gamma-amminobutirrico o γ -amminobutirrico), il quale esercita un effetto ipotensivo attraverso la riduzione della vasocostrizione adrenergica mediante il suo effetto soppressivo sul rilascio di trasmettitori nervosi simpatici, mediato dai recettori GABA presinaptici (Fujimura S. *et al.*, 1999; Hayakawa K. *et al.*, 2002). Inoltre, il GABA promuove l'escrezione di sodio dai reni e sopprime l'aumento della pressione sanguigna (Hayakawa K. *et al.*, 2005; Monasterolo L.A. *et al.*, 1996).

1.4.1 Monacolina K e l'aterosclerosi

Lo stress ossidativo è anche considerato un bersaglio terapeutico correlato all'aterosclerosi. L'ossigeno reattivo inattiva l'NO e allo stesso tempo danneggia le cellule endoteliali vascolari e riduce la produzione di NO. È stato anche suggerito che le LDL plasmatiche sopprimono l'attività della NO sintasi (NOS) nelle cellule endoteliali vascolari mediante radicali idrossilici e simili, riducendo così la produzione di NO e promuovendo l'arteriosclerosi (Ehara S. *et al.*, 2001; Laufs U. *et al.*, 1998).

La lovastatina inibisce l'ossidazione delle LDL e ciò migliora la funzione endoteliale vascolare (reazione vasocostrittrice) nell'iperlipidemia e, in particolare, l'uso combinato di un antiossidante può migliorarne l'efficacia. L'attività antiossidante è stata segnalata anche nei pigmenti del riso rosso fermentato (Srianta I. *et al.*, 2017; Wada M. *et al.*, 2007): la monascina e l'anakaflavina hanno soppresso l'ossidazione del colesterolo LDL (Lee C.L. *et al.*, 2018). Inoltre, un precedente studio clinico ha riportato che un estratto di riso rosso fermentato riduce i livelli plasmatici di LDL ossidato, indice di stress ossidativo, e l'attività della fosfolipasi A2 associata alle lipoproteine (Hermans N. *et al.*, 2017).

È stato anche dimostrato che il riso rosso fermentato ottenuto da riso integrale, riso nero e riso rosso migliora la funzione endoteliale vascolare con una maggiore produzione di NO (Kono I., 2012) e che la monascina e l'anakaflavina agiscono come agonisti dei recettori attivati dal proliferatore del perossisoma (PPAR), come PPAR α

(Hsu W.H. *et al.*, 2014). I PPAR coinvolti nel metabolismo dei carboidrati, dei lipidi e dell'energia sono anche implicati nello sviluppo di malattie legate allo stile di vita, come l'obesità e l'aterosclerosi. Gli agonisti dei PPAR α (fibrati) sono stati utilizzati clinicamente come farmaci antiiperlipidemici. La funzione vascolare può essere migliorata aumentando l'NO, sopprimendo lo stress ossidativo, l'ipertensione e l'obesità (Sasaki S. *et al.*, 2002; Higashi Y. *et al.*, 2000; Ting H.H. *et al.*, 1996). Gli ingredienti contenuti nel riso rosso fermentato, come la monacolina K (lovastatina), il GABA e i pigmenti del riso rosso fermentato (pigmenti azaphilone) possono esercitare effetti sinergici o additivi per ridurre il rischio di aterosclerosi e altre malattie circolatorie (Fig. 1.12).

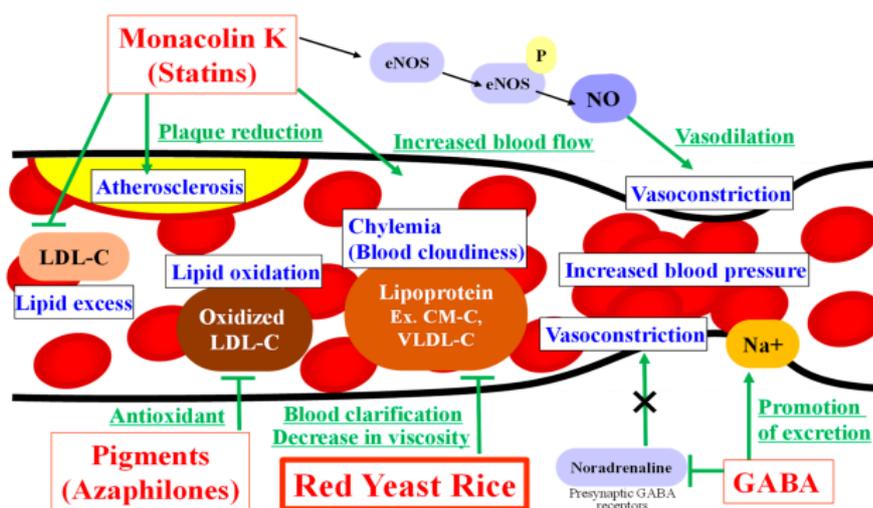


Fig. 1.12 Schema degli effetti della monacolina K (Fukami H. *et al.*, 2021).

1.4.2 Possibili rischi dovuti all'assunzione di monacolina K

Non tutti i prodotti sono standardizzati e spesso mancano informazioni sul contenuto di monacolina K. Le formulazioni RYR variano significativamente in termini di quantità di questo principio attivo (Farkouh A. *et al.*, 2019), che può differire da quella dichiarata dal produttore (Brouwers J.R. *et al.*, 2016). Un altro rischio è che alcune formulazioni RYR contengano sostanze tossiche, come la citrinina, che può provocare danni renali (iperplasia endoteliale glomerulare, aumento del rischio di adenomi e altri tumori). La citrinina è dannosa per la crescita di un embrione *in vitro* e *in vivo* ed è quindi sia nefrotossica che teratogena (Cicero A.F.G. *et al.*, 2017).

1.4.3 Indicazioni all'uso dei nutraceutici

Per i pazienti intolleranti alle statine, l'International Lipid Expert Panel raccomanda il riso rosso fermentato e la berberina tra tutti i nutraceutici statine (Cicero A.F.G. *et al.*, 2017). Secondo studi cinesi, l'unico nutraceutico che ha soddisfatto questa condizione è il riso rosso fermentato. La monacolina K, essendo una statina, può interagire con altri farmaci. Sebbene la probabilità che si manifestino sintomi muscolari sia bassa, non può essere completamente esclusa.

Il consumo di combinazioni di nutraceutici con diverse azioni ipolipemizzanti, in aggiunta ad uno stile di vita sano, potrebbe essere una valida alternativa per prevenire la malattia coronarica nei pazienti con moderata ipercolesterolemia e, in alcuni casi, con intolleranza alle statine (Banach M. *et al.*, 2018; Cicero A.F.G. *et al.*, 2016). In particolare, l'interazione tra RYR e prodotti naturali con diversi meccanismi d'azione può avere un effetto sinergico. Ad esempio, il RYR che inibisce l'enzima HMG-CoA reduttasi potrebbe essere vantaggiosamente accoppiato con altri nutraceutici per aumentare l'escrezione dei lipidi nell'intestino (steroli vegetali, fibre solubili, probiotici, glucomannano), migliorare l'assorbimento epatico del colesterolo (proteine della soia, berberina), o indurre l'escrezione di LDL-C (acido clorogenico, proteine di soia, berberina) (Cicero A.F.G. *et al.*, 2015).

Le proprietà ipolipemizzanti di RYR (3 mg di monacolina K) combinate con policosanoli (10 mg) e berberina (500 mg) sono l'associazione più studiata e quella per la quale sono disponibili meta-analisi di RCT. L'associazione RYR-policosanolo-berberina può migliorare il C-LDL di 23,6 mg/dL, il C-HDL di 2,71 mg/dL, i TG di 14,2 mg/dL e il glucosio di 2,52 mg/dL, con miglioramenti nei profili lipidici e glicemici mantenuti a lungo termine (Pirro M. *et al.*, 2016). Questa combinazione si è rivelata sicura e ben tollerata nell'80% dei pazienti adulti e anziani che erano precedentemente intolleranti al trattamento con statine (De Castro-Orós I. *et al.*, 2016; Marazzi G. *et al.*, 2011).

Altri studi condotti su questa combinazione nutraceutica hanno rilevato che essa migliora la funzione endoteliale e la velocità dell'onda di polso nei pazienti dislipidemicici (Cicero A.F.G. *et al.*, 2013) e si è rivelato altrettanto efficace quanto le statine a dosaggio moderato nel ridurre il colesterolo LDL in pazienti con ipercolesterolemia primaria e una storia di intolleranza alle statine o rifiuto del trattamento con statine (Pisciotta L. *et al.*, 2012).

1.5 Controllo su integratori alimentari: il sistema HACCP

Autocontrollo e sistema HACCP non sono termini sinonimi. Il concetto di autocontrollo ha una valenza più ampia che discende dalla responsabilizzazione dell'Operatore del settore alimentare (OSA) in materia di igiene e sicurezza degli alimenti e corrisponde all'obbligo di tenuta sotto controllo delle proprie produzioni.

L'autocontrollo è obbligatorio per tutti gli operatori che a qualunque livello siano coinvolti nella filiera della produzione alimentare.

L'HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) è invece un sistema che consente di applicare l'autocontrollo in maniera razionale e organizzata.

I principi su cui si basa l'elaborazione di un piano HACCP sono sette:

1. identificare ogni pericolo da prevenire, eliminare o ridurre;
2. identificare i punti critici di controllo (CCP - Critical Control Points) nelle fasi in cui è possibile prevenire, eliminare o ridurre un rischio;
3. stabilire i limiti critici che differenziano l'accettabilità dalla inaccettabilità;
4. stabilire e applicare procedure di sorveglianza efficaci nei punti critici di controllo;
5. stabilire azioni correttive se un punto critico non risulta sotto controllo (superamento dei limiti critici stabiliti);
6. stabilire le procedure da applicare regolarmente per verificare l'effettivo funzionamento delle misure adottate;
7. predisporre documenti e registrazioni adeguati alla natura e alle dimensioni dell'impresa alimentare.

La prima codifica normativa in Europa risale al 1993 con la direttiva 43/93/CEE (recepita in Italia con il D. Lgs 26 maggio 1997 n. 155, ora abrogato). Questa normativa è stata sostituita dal regolamento CE 178/2002 e dal regolamento CE 852/2004.

Data l'ampia gamma di imprese alimentari prese in considerazione dal regolamento CE 852/2004 e la grande varietà di prodotti alimentari e di procedure di produzione applicate agli alimenti, sono state redatte dalla Commissione Europea delle Linee guida generali sullo sviluppo e sull'applicazione delle procedure basate sui principi del sistema HACCP, come documento diretto ad aiutare tutti coloro che intervengono nella catena della produzione alimentare.

Considerando un'impresa alimentare, il responsabile del piano di autocontrollo deve predisporlo e metterlo in atto con l'attiva partecipazione della dirigenza e del personale,

avvalendosi, se ce ne fosse bisogno, anche di un supporto tecnico-scientifico esterno. Il piano deve essere applicabile e applicato, finalizzato a prevenire le cause di insorgenza di non conformità prima che esse si verifichino, oltre a prevedere le opportune azioni correttive per minimizzare i rischi qualora, nonostante l'applicazione delle misure preventive, si verifichi una non-conformità.

L'obiettivo principale è di istituire un sistema documentato con cui l'impresa sia in grado di dimostrare di aver messo in campo azioni tali da minimizzare il rischio. Per facilitare l'adozione di piani di autocontrollo adeguati vengono resi disponibili Manuali di Corretta Prassi Igienica (Good Hygiene Practice o GHP), che costituiscono documenti orientativi voluti dalla normativa comunitaria ed utilizzabili come guida all'applicazione dei sistemi di autocontrollo (www.salute.gov.it, 2019).

2. Scopo tesi

Secondo il già citato regolamento (CE) 178/2002 della legislazione alimentare dell'UE, gli integratori alimentari sono da considerarsi alimenti. In quanto tali, è responsabilità del produttore, importatore, fornitore o distributore garantire che un integratore alimentare immesso sul mercato sia privo di rischi per il consumatore, perseguendo buone prassi di fabbricazione in conformità alla normativa dell'UE e alla specifica legislazione nazionale, sia del Paese produttore, sia di quello verso cui vengono esportati i prodotti. La legislazione vigente si occupa del ciclo completo di produzione fino al controllo di qualità di un integratore alimentare, dall'acquisizione di tutti i materiali in ogni specifica fase di lavorazione, confezionamento e stoccaggio sino alla distribuzione e alla vendita del prodotto finito.

Gli integratori alimentari contenenti estratti o derivati vegetali destinati alla vendita nell'Unione Europea devono essere conformi ai requisiti previsti dalla legislazione alimentare dell'UE per quanto riguarda composizione, etichettatura, qualità e sicurezza. Per formulazioni che contengono estratti vegetali è richiesta corrispondenza fra etichetta e preparazione per i suoi componenti biologicamente attivi, sia in termini quantitativi sia qualitativi.

Per valutare la sicurezza di un integratore alimentare contenente estratti vegetali o preparazioni botaniche devono essere considerati i rischi di sicurezza intrinseci della pianta in questione e al contempo il suo processo di fabbricazione.

La sicurezza alimentare è dunque il requisito basilare sia per la tutela della salute del consumatore che per gli interessi dell'impresa.

Nel corso del mio tirocinio curriculare svolto presso Meda Pharma, un'azienda farmaceutica del gruppo Viatris specializzata nella produzione di integratori alimentari a base di estratti naturali, ho avuto l'opportunità di operare attivamente all'interno del laboratorio di Controllo Qualità (chimico e microbiologico). Qui ho potuto verificare di persona quanto l'elemento sicurezza sia preponderante nello svolgimento del processo produttivo.

Seguendo il flusso di produzione:

1. sono state eseguite analisi sulle materie prime per confermare i criteri di purezza microbiologica e chimica;
2. sono state effettuate analisi per verificare se nelle miscele contenenti le molecole in esame (berberina, monacolina K e silimarina) fossero presenti delle

- impurezze (contaminanti), derivanti dalla materia prima o dalla produzione dell'integratore;
3. determinazione quantitativa dei metalli pesanti (Piombo, Cadmio e Nichel) su materia prima, semilavorato e prodotto finito mediante analisi in ICP-OES, per verificare l'assenza dei suddetti metalli, che se ingeriti possono determinare problemi all'organismo;
 4. per tenere sotto controllo il processo di pulizia e lavaggio degli impianti di produzione, si è reso necessario rilevare l'eventuale presenza di batteri, funghi e lieviti ricorrendo all'uso di tamponi sulle superfici a contatto con il prodotto o di analisi specifiche sulle acque di risciacquo;
 5. in aggiunta a funghi e batteri, potrebbero anche essere presenti residui di prodotti che sono stati miscelati e confezionati precedentemente, pertanto tramite test ELISA si sono ricercate possibili tracce di allergeni, quali glutine, lattoglobuline, proteine di crostacei o soia;
 6. sono state condotte analisi specifiche sul prodotto finito per confermare il quantitativo di ingredienti riportato in etichetta, per escludere allergeni e per garantire la purezza microbiologica;
 7. dopo l'arrivo di un nuovo strumento è stato validato un metodo di analisi per la determinazione del titolo di un ingrediente funzionale, tramite un processo durato più giorni, che ha permesso di verificare l'accuratezza, la precisione, la linearità e la specificità;
 8. per i prodotti contenenti le molecole in esame, descritte in introduzione, sono stati condotti anche studi di stabilità effettuando titolazioni, per accertare che a distanza di mesi la molecola si mantenesse costante, ossia non si modificasse la quantità dei suoi costituenti attivi dichiarati in etichetta, i quali devono essere garantiti con una certa percentuale fino alla data di scadenza dell'integratore.

In questo elaborato di tesi è stato effettuato il monitoraggio chimico-fisico e microbiologico routinario in un'attività di produzione di integratori alimentari contenenti berberina, monacolina K e silimarina, per valutare sia la conformità ai requisiti stabiliti per legge, sia l'efficacia del piano di autocontrollo.

Lo scopo del lavoro è quello di ottenere dei risultati utili per analizzare in maniera più approfondita e dettagliata la qualità del processo produttivo nel suo insieme, indagando sulle materie prime e sul prodotto finito nelle varie fasi della produzione e sull'ambiente di lavoro, oltre che validare un metodo di analisi su un nuovo strumento.

3. Materiali e metodi

3.1 Dalla materia prima all'integratore

Dopo aver definito cosa sia un integratore, le sue funzioni e i possibili rischi, oltre ad avere analizzato come vengono regolamentati e come evitare l'insorgenza di non-conformità, la domanda che sorge è: ma come viene prodotto un integratore alimentare?

Nell'azienda in cui ho svolto attività di tirocinio in qualità di stagista, ho potuto osservare da vicino tutto il percorso che va dall'acquisto delle materie prime presso i fornitori, fino ad arrivare alla messa in commercio del prodotto.

La prima fase della produzione consiste infatti nell'acquisto di materie prime dal fornitore e il successivo deposito in magazzino. Durante questa fase vengono controllate tutte le caratteristiche descritte nella bolla e nell'ordine, in particolare la sicurezza e l'integrità del materiale.

Vengono poi effettuati dei campionamenti per verificare che la materia prima sia conforme; nel caso in cui lo sia, viene messa a disposizione per essere utilizzata successivamente nel processo produttivo, mentre in caso contrario viene isolata e messa in quarantena in quanto non-conforme.

Non è detto che le materie prime in magazzino vengano subito utilizzate. Per questo risulta molto importante conservarle ad una data temperatura e umidità, soprattutto perché alcune molecole più sensibili possono modificare la loro struttura e perdere le caratteristiche che sono alla base dell'integratore alimentare in cui verranno utilizzate. Si passa in seguito al vero e proprio processo di produzione durante il quale le materie prime vengono pesate e inserite in un miscelatore.

La pesata viene effettuata sotto cappa e, se utilizzate materie prime che potrebbero contenere allergeni, si mette in atto il protocollo di pulizia completa sotto cappa, per evitare che le future pesate possano essere contaminate da tracce di allergeni vari.

Dal miscelatore si ottiene quindi una miscela omogenea da cui si effettua un campionamento, per verificare tutte le caratteristiche chimico-fisiche per ciascun lotto di prodotto.

Dalla miscela si passa alla comprimitrice, il macchinario adibito alla compressione delle polveri dell'integratore, in modo da ottenere la compressa finita. A questo punto

vengono prelevate alcune compresse per poter svolgere le dovute analisi chimico-fisiche poco prima del confezionamento.

Le compresse possono essere rivestite con un filmante che svolge diverse funzioni. In alcuni casi il filmante serve semplicemente a limitare il sapore poco gradevole della compressa, come ad esempio negli integratori contenenti berberina, essendo una sostanza molto amara. In altri casi il filmante è utile per evitare che la compressa si disgreghi prima di arrivare nel sito di assorbimento. Se ad esempio l'integratore deve essere assorbito a livello intestinale, allora servirà un rivestimento in grado di resistere lungo il tragitto fino all'intestino e soprattutto al pH dello stomaco, per poi disgregarsi e venire assorbito al raggiungimento dell'organo interessato.

Il confezionamento consiste nel sigillare le compresse in blister, inseriti poi con il foglietto illustrativo nelle confezioni. Ciascuna confezione deve riportare un'etichettatura in cui sono presenti tutti i dati riportati nella direttiva 2002/46/CE, cui si è già fatto riferimento.

Prima di essere spediti e messi in commercio, i lotti devono attendere che il laboratorio di Controllo Qualità (QC) disponga dei risultati delle analisi effettuate per poter validare la conformità del lotto. È necessario che il lotto disponga di convalida, sia per quanto concerne la parte chimico-fisica che microbiologica, per poter essere sbloccato e conseguentemente spedito e messo in vendita.

Quando una linea termina la produzione di un integratore per dare inizio ad un altro, tutti i macchinari sono sottoposti a lavaggio ed accurata pulizia in modo da evitare contaminazioni; in particolare si potrebbero presentare tracce di allergeni o glutine derivate dal precedente integratore. Inoltre dopo il lavaggio, il primo lotto è sottoposto ad analisi chimico-fisiche e microbiologiche per valutare l'esclusione di contaminazione dal prodotto precedente e dall'attività di lavaggio stesso.

Quando arriva in laboratorio il campione da analizzare, un programma informatico interno all'azienda fornisce indicazioni su tutti i test da svolgere, sia chimico-fisici che microbiologici.

3.2 Analisi fisiche

Alcune analisi si differenziano tra materia prima, miscela e prodotto finito, mentre altre sono identiche o differiscono solo in qualche passaggio.

In primo luogo l'integratore alimentare sotto forma di compressa deve possedere delle caratteristiche fisiche standard all'interno di un range stabilito, come peso, lunghezza, durezza, spessore, friabilità, tempo di disgregazione e la perdita di peso dovuta all'essiccamento.

Per analizzare le prime quattro era presente un tester semiautomatico per compresse sul quale vengono posate dieci compresse. Selezionando il codice del campione, esso misura le grandezze sopra citate e ne fa la media.



Fig. 3.1 Tester semiautomatico per compresse.

Per calcolare la friabilità si pesano dieci compresse e si inseriscono all'interno di uno strumento chiamato friabilator (USP) a forma di ruota che compie 100 giri; l'attrito che si forma tra le compresse e la superficie dello strumento determina un distaccamento della polvere dal campione.

Si pesano poi nuovamente le dieci compresse e si calcola la percentuale di friabilità del campione tramite la formula $(\text{Peso Iniziale} - \text{Peso Finale}) / \text{Peso Iniziale}$ e lo si moltiplica x100.



Fig. 3.2 Friabilator (USP).

Per calcolare la perdita di peso, nel caso della materia prima e della miscela, si prende un grammo di polvere e la si inserisce in una bilancia termica che calcolerà la perdita di umidità del campione; nel caso invece si tratti di una compressa bisogna prima tritarla per renderla polvere e successivamente si procede come per la materia prima e la miscela.



Fig. 3.3 Bilancia termica.

Per calcolare il tempo di disgregazione si utilizza uno strumento chiamato disgregatore, nel quale sono presenti due braccia che si muovono verso l'alto ed il basso, collegate a due cellette al cui interno possono essere posizionate sei compresse ciascuna. Le cellette vengono inserite in becker contenenti acqua o

soluzioni che imitano le condizioni di pH all'interno dell'apparato gastrointestinale, e mantenute alla temperatura di circa 36/37°C.

Dopo avere inserito le compresse nelle cellette, si aggiungono dei pesetti in modo da evitare che fuoriescano, ed anche al fine di favorire la simulazione dei movimenti peristaltici.

Ogni prodotto ha tempi di disgregazione diversi e alcune tipologie di integratori alimentari, che devono resistere al pH dello stomaco, possono impiegare anche due ore.



Fig. 3.4 Disgregatore.

Andando più nello specifico, per poter determinare quantitativamente berberina, monacolina K e silimarina nei vari integratori, bisogna utilizzare per ognuna di esse uno specifico metodo che permette di estrarre la molecola che si intende analizzare, per poterla esaminare tramite HPLC-UV (Cromatografia Liquida ad Alta Prestazione). Si tratta di una tecnica cromatografica grazie alla quale è possibile separare due o più composti presenti in un solvente, sfruttando l'equilibrio di affinità tra una "fase stazionaria" posta all'interno della colonna cromatografica e una "fase mobile" che fluisce attraverso essa. Una sostanza più affine alla fase stazionaria che alla fase mobile impiega un tempo maggiore a percorrere la colonna cromatografica (tempo di

ritenzione), rispetto ad una sostanza con bassa affinità per la fase stazionaria ed alta per la fase mobile.

Il campione da analizzare è iniettato all'inizio della colonna cromatografica dove è "spinto" attraverso la fase stazionaria dalla fase mobile applicando pressioni dell'ordine delle centinaia di atmosfere. Per ottenere un'elevata efficienza nella separazione è necessario che le dimensioni delle particelle del riempimento siano molto ridotte (di solito hanno diametri compresi da 3 a 10 μm); per questo motivo è indispensabile applicare un'elevata pressione se si vuole mantenere una ragionevole velocità di flusso dell'eluente e quindi un tempo di analisi adeguato.

Alla fine della colonna è applicato un rivelatore (RI, UV-VIS, spettrofluorimetrico, spettrometro di massa) e un calcolatore che permettono un'analisi in continuo dell'uscita della colonna e dunque di poter quantificare e/o identificare le sostanze iniettate tramite apposito cromatogramma. Nel nostro caso è stato utilizzato un rivelatore UV-VIS.



Fig. 3.5 HPLC-UV.

Durante la preparazione dei campioni spesso si ricorre all'uso di sostanze tossiche per poter estrarre la molecola in esame; per questo motivo, dopo aver effettuato la pesatura, la maggior parte delle azioni viene svolta sotto cappa.

3.3 Determinazione cromatografica della berberina cloruro nella materia prima e nel prodotto finito

Materiali

- Acqua deionizzata
- Metanolo
- Acido orto-fosforico 85%
- Bilancia termica
- HPLC-UV UlitMate 3000
- Colonna: Kinetex C-18 100*3.0mm – 2.6 μm , 100 Å
- Precolonna: Phenomenex C18 4*2mm
- Eluente A: Metanolo
- Eluente B: Acido ortofosforico 0.1% in acqua

Procedimento

Preparazione soluzione standard

Essiccare a 105°C fino a peso costante tramite bilancia termica almeno 500 mg di polvere di Berberina cloruro standard.

In un matraccio da 50 mL introdurre 50 mg accuratamente pesati di berberina cloruro standard essiccata, sciogliere e portare a volume con metanolo (soluzione madre). In un matraccio da 20 mL diluire con metanolo 2 mL di soluzione madre.

Soluzioni campione materia prima

Essiccare a 105°C fino a peso costante tramite bilancia termica almeno 1000 mg di polvere di materia prima.

In un matraccio da 50 mL introdurre 50 mg accuratamente pesati di materia prima essiccata, sospendere e portare a volume con metanolo. Lasciare in agitazione magnetica per 15 minuti, quindi filtrare con filtro di carta banda blu. In un matraccio da 20 mL diluire con metanolo 2 mL della soluzione filtrata.

Soluzioni campione compresse

Tritare finemente, dopo averne calcolato il peso medio, dieci compresse.

In un matraccio da 50 mL introdurre 100 mg accuratamente pesati di polvere, sospendere e portare a volume con metanolo. Lasciare in agitazione magnetica per

15 minuti, quindi filtrare con filtro di carta banda blu. In un matraccio da 20 mL diluire con metanolo 2 mL della soluzione filtrata.

Si preparano almeno due soluzioni indipendenti.

Risultati

Materia Prima

Il contenuto di berberina cloruro nella materia prima si calcola come media di almeno due determinazioni indipendenti. Per ognuna il titolo percentuale è calcolato con la seguente formula:

$$\% \text{ Berberina Cloruro} = \frac{A_c \cdot P_{std}}{A_{std} \cdot P_c} \cdot P$$

Dove:

A_c = area del picco della berberina cloruro nella soluzione campione;

A_{std} = area media del picco della berberina cloruro nella soluzione standard;

P_{std} = peso dello standard, in mg;

P_c = peso della polvere campione analizzata, in mg;

P = purezza della berberina cloruro standard, in %.

Prodotto finito

Il contenuto di berberina cloruro nel prodotto finito si calcola come media di almeno due determinazioni indipendenti. Per ognuna il titolo percentuale è calcolato con la seguente formula:

$$\% \text{ Berberina Cloruro} = \frac{A_c \cdot P_{std} \cdot PM}{A_{std} \cdot P_c \cdot C_t} \cdot P$$

Dove:

A_c = area del picco della berberina cloruro nella soluzione campione;

A_{std} = area media del picco della berberina cloruro nella soluzione standard;

P_{std} = peso dello standard, in mg;

P_c = peso della polvere campione analizzata, in mg;

P = purezza della berberina cloruro standard, in %;

PM = peso medio del lotto di compresse analizzato, in mg;

C_t = contenuto teorico di berberina cloruro per compressa, pari a 500 mg.

3.4 Determinazione cromatografica della monacolina K nella materia prima e nel prodotto finito

Materiali

- Acetonitrile
- Acido orto-fosforico 85% (H₃PO₄)
- Metanolo
- Acqua deionizzata
- Mevinolina standard o Lovastatina standard
- Diluente: Metanolo/Acqua (75:25) (v/v)
- Colonna: Pursuit XRs C8 5 µm 250*4.6 mm
- Precolonna: Phenomenex C18 4*3mm
- Eluente A: Acetonitrile
- Eluente B: Acido ortofosforico 0.1%

Procedimento

Preparazione soluzione standard

In matraccio ambrato da 50 mL si introducono circa 10 mg esattamente pesati di monacolina K standard, si scioglie e si porta a volume con metanolo 75%. Si sonica in bagno ad ultrasuoni per un'ora. La soluzione standard può essere conservata in freezer.



Fig. 3.6 Sonicatore.

Soluzioni campione materia prima

In un matraccio ambrato da 50 mL si introducono circa 350 mg accuratamente pesati e si aggiungono 25 mL di metanolo 75% con una pipetta a doppia tacca o con dispenser automatico. Si lascia in agitazione magnetica per 10 minuti e quindi si sonica per un'ora a 40°C. Si filtra la sospensione con filtro a membrana in PVDF (Polivinilidenefluoruro) da 0.45 µm. Si preparano almeno tre soluzioni indipendenti.

Soluzioni campione compresse 1

Polvere T: si tritano finemente con mulino analitico, dopo averne calcolato il peso medio, dieci compresse.

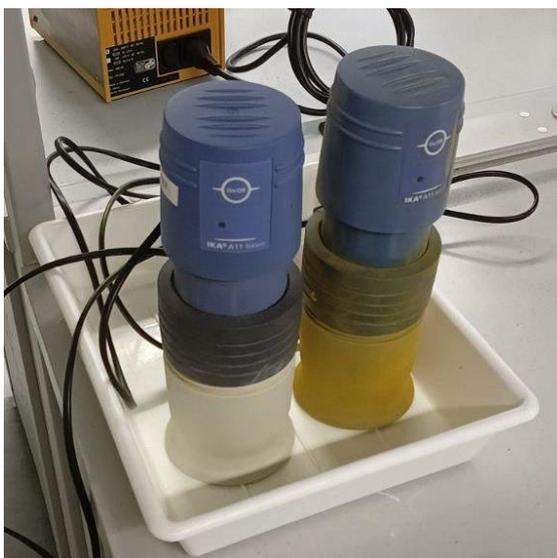


Fig. 3.7 Mulino analitico.

In un matraccio ambrato da 50 mL si introduce circa la quantità di miscela o di polvere T indicata nel metodo, accuratamente pesata, e si aggiungono 25 mL di metanolo 75% con una pipetta a doppia tacca o con dispenser automatico. Si lascia in agitazione magnetica per 10 minuti e quindi si sonica per un'ora a 40°C. Si congela per 30 minuti. Si filtra la sospensione con filtri a membrana in PVDF da 0.45 µm. Si preparano almeno due soluzioni indipendenti.

Soluzioni campione compresse 2

Polvere T: si tritano finemente con mulino analitico, dopo averne calcolato il peso medio, dieci compresse.

In un matraccio tarato ambrato da 50 mL si introduce circa la quantità di miscela o di polvere T indicata nel procedimento accuratamente pesata e si aggiungono 25 mL di metanolo 75% con una pipetta a doppia tacca o con dispenser automatico. Si lascia in agitazione magnetica per 10 minuti e quindi si sonica per un'ora a 40°C. Si congela per 30 minuti. Si centrifuga 10 minuti a 5000 rpm e si filtra la sospensione con filtri a membrana in PVDF da 0.45 µm. Si preparano almeno due soluzioni indipendenti. Si considera l'Area totale della monacolina K data dalla somma delle Aree dei picchi delle forme MKA, MKL e MKM per la materia prima e per il prodotto finito. Il picco relativo a DMK non viene utilizzato nelle analisi di routine.

Materia Prima

Il titolo percentuale di monacolina K nel campione materia prima si calcola come media di almeno due determinazioni indipendenti. Per ognuna il titolo percentuale è calcolato con la seguente formula:

$$\% \text{ Monacolina K} = \frac{A_c \cdot P_{std}}{A_{std} \cdot P_c \cdot f} \cdot P$$

Dove:

A_c = area totale dei picchi della monacolina K nella soluzione campione;

A_{std} = area totale media dei picchi della monacolina K della soluzione standard;

P_{std} = peso dello standard, in mg;

P_c = peso del campione analizzato, in mg;

P = purezza della Monacolina K standard in %;

f = fattore di diluizione, pari a 2.

Prodotto finito

Il titolo percentuale di monacolina K nel campione prodotto finito si calcola come media di almeno due determinazioni indipendenti. Per ognuna il titolo percentuale è calcolato con la seguente formula:

$$\% \text{ Monacolina K} = \frac{A_c \cdot P_{std} \cdot PM}{A_{std} \cdot P_c \cdot C_t \cdot f} \cdot P$$

Dove:

A_c = area totale dei picchi della monacolina K nella soluzione campione;

A_{std} = area totale media dei picchi della monacolina K della soluzione standard;

P_{std} = peso dello standard, in mg;

P_c = peso del campione analizzato, in mg;

P = purezza della monacolina K standard in %;

PM = peso medio del lotto di compresse analizzato, in mg;

C_t = contenuto teorico di monacolina K per compressa, in mg;

f = fattore di diluizione, pari a 2.

3.5 Determinazione quantitativa UHPLC della silimarina nella materia prima e nel prodotto finito

Materiali

- Acqua deionizzata
- Metanolo
- Acido orto-fosforico 85%
- Colonna: Zorbax Eclipse Plus RRHT C18 1.8 micron 50*3.0 mm
- Precolonna: Phenomenex C18 4*3.0 mm
- Eluente A: 70 mL Acqua + 30 mL Metanolo + 0.1 mL Acido o-fosforico
- Eluente B: 30 mL Acqua + 70 mL Metanolo + 0.1 mL Acido o-fosforico

Procedimento

Preparazione dello standard

In un matraccio tarato ambrato da 50 mL introdurre circa 12 mg esattamente pesati di silibinina standard, sciogliere e portare a volume con metanolo. Si tappa e si lascia in agitazione magnetica per 10 minuti. Si sonica in bagno ad ultrasuoni per 30 minuti.

Preparazione del campione materia prima

In matraccio tarato ambrato da 50 mL introdurre circa 60 mg accuratamente pesati di silimarina materia prima, si diluisce e si porta a volume con metanolo. Si lascia in agitazione magnetica per 10 minuti. Si sonica in bagno ad ultrasuoni per 30 minuti. Si filtra con filtri a membrana PVDF da 0.22 mcm. Si preparano almeno due soluzioni indipendenti.

Preparazione del campione prodotto finito

Polvere T: tritare finemente, dopo averne calcolato il peso medio, dieci compresse. In un matraccio da 50 mL introdurre circa 150 mg di miscela o di polvere T, accuratamente pesata. Si diluisce e si porta a volume con metanolo. Si lascia in agitazione magnetica per 10 minuti e quindi si sonica in un bagno ad ultrasuoni per 30 minuti. Si filtra la sospensione con filtri a membrana PVDF da 0.22 µm. Si preparano almeno due soluzioni indipendenti.

Risultati

Materia prima

Il contenuto di silimarina è determinato considerando l'area totale ottenuta dalla somma delle aree dei picchi di silicristina, silidianina A e B, silibinina A e B, isosilibinina A e B.

Il titolo percentuale di silimarina totale nella materia prima si calcola come media di almeno due determinazioni indipendenti. Per ognuna il titolo percentuale è calcolato con la seguente formula:

$$\% \text{ Silimarina UV} = \% \text{ Silimarina UPLC} * f = \frac{A_c * P_{st}}{A_{st} * P_c} * P * \frac{100}{100 - pp} * f$$

Dove:

A_c = area totale silimarina nella soluzione campione;

A_{st} = area media silibinina nella soluzione standard;

P_{st} = peso della silibinina standard, in mg;

P_c = peso della materia prima campione analizzata, in mg;

P = purezza della silibinina standard, in percentuale;

pp = perdita peso del campione, in percentuale;

f = fattore di conversione UPLC→UV (Pharmeuropa), pari a 1.3;

C_t = contenuto teorico silimarina per singola dose, pari a 210 mg.

Prodotto finito

Il contenuto di silimarina nelle compresse si calcola come media di almeno due determinazioni indipendenti. Per ognuna il contenuto è calcolato con le seguenti formule:

$$\% \text{ Titolo Silimarina UV} = \% \text{ Titolo Silimarina UPLC} * f = \frac{A_c * P_{st} * PM}{A_{st} * P_c * C_t / f} * P$$

Dove:

A_c = area totale silimarina nella soluzione campione;

A_{st} = area media silibinina nella soluzione standard;

P_{st} = peso della silibinina standard, in mg;

P_c = peso della polvere campione analizzata, in mg;

PM = peso medio del lotto di compresse, in mg;

P = purezza della silibinina standard, in percentuale;

f = fattore di conversione UPLC→UV (Pharmeuropa), pari a 1.3;

C_t = contenuto teorico silimarina per singola dose, pari a 210 mg.

3.6 Determinazione quantitativa dei metalli pesanti (Piombo, Cadmio e Nichel) su materia prima, semilavorato e prodotto finito mediante analisi in ICP-OES

Materiali

- Microwave digestion system Multiwave Go Anton Paar (LCH139)
- HNO₃ conc. 69%
- H₂O₂ 30%
- H₂O deionizzata
- Argon
- Azoto
- Aria
- Soluzione standard multielementare

Procedimento

Bianco di calibrazione

Prima di effettuare le letture di analisi si legge un bianco di calibrazione. Quest'ultimo verrà sottratto dallo strumento eliminando possibili interferenze derivanti dalle sostanze di preparazione. Il bianco di calibrazione consiste in acqua deionizzata.

Soluzione standard

Si preparano per diluizione dalla soluzione madre standard, alla concentrazione di 10 ppm, quattro soluzioni indipendenti a concentrazione crescente.

- Standard 1: prelevare 0.1 mL di soluzione madre da 10 ppm e trasferirli in un matraccio da 1000 mL portando a volume con acqua in modo da ottenere una soluzione alla concentrazione di 0.001 ppm.
- Standard 2: prelevare 0.1 mL di soluzione madre da 10 ppm e trasferirli in un matraccio da 100 mL portando a volume con acqua in modo da ottenere una soluzione alla concentrazione di 0.01 ppm.
- Standard 3: prelevare 1 mL di soluzione madre da 10 ppm e trasferirli in un matraccio da 100 mL portando a volume con acqua in modo da ottenere una soluzione alla concentrazione di 0.1 ppm.
- Standard 4: prelevare 5 mL di soluzione madre da 10 ppm e trasferirli in un matraccio da 100 mL portando a volume con acqua in modo da ottenere una soluzione alla concentrazione di 0.5 ppm.

Soluzioni campione materia prima

Introdurre all'interno di un vessel del sistema a microonde 500 mg di materia prima accuratamente pesata, aggiungere 6 mL di HNO₃ con 69% e 1 mL di H₂O₂ al 30%. Chiudere ciascun vessel e posizionarlo all'interno del rotore del sistema a microonde, impostare la sequenza di analisi utilizzando il programma di digestione "Metalli Pesanti". Lasciar raffreddare e diluire con 50 mL di acqua demineralizzata, filtrare con filtri PVDF 0.45 µm. Infine, analizzare la soluzione all'ICP ottico.

Soluzioni semilavorato e prodotto finito

Introdurre all'interno di un vessel del sistema a microonde 500 mg accuratamente pesato di semilavorato o prodotto finito. Successivamente aggiungere 6 mL di HNO₃ con 69% e 1 mL di H₂O₂ al 30%. Chiudere ciascun vessel e posizionarlo all'interno del

rotore del sistema a microonde, impostare la sequenza di analisi utilizzando il programma di digestione “Metalli Pesanti”. Lasciar raffreddare e diluire a 50 ml con acqua demineralizzata, si filtra con filtri PVDF 0.45 µm. Effettuare una diluizione 1:2 e analizzare la soluzione all’ ICP ottico.

Risultati

La misurazione viene fatta mediante una tripla lettura per ogni metallo che si deve determinare alle condizioni analitiche sotto riportate.

- Lunghezza d’onda Cd: 228.802 nm
- Flusso Gas plasma: 15 L/min
- Flusso Aux: 0.2 L/min
- Flusso Neb: 0.6 L/min
- Potenza: 1400 Watt
- Flusso pompa: 1.5 ml/min
- Tipo di visualizzazione: assiale
- Numero di repliche: 3
- Delay time: 60

3.7 Analisi microbiologiche

Oltre alla parte di analisi chimiche e fisiche, vengono effettuate anche analisi microbiologiche per accertarsi che non siano presenti agenti patogeni negli integratori alimentari che poi verranno messi in commercio.

I terreni principalmente utilizzati sono il TSA (Tryptic Soy Agar) per i batteri e SDA (Sabouraud Dextrose Agar) per funghi e lieviti.

La validazione dei lotti richiede tre giorni per i batteri e cinque giorni per funghi e lieviti, dovuto ai tempi di crescita diversi tra i vari microorganismi.

I patogeni che si vanno a ricercare sono principalmente microorganismi che possono provocare danni all’organismo, se ingeriti.

Si tratta nello specifico di:

- *E.coli*
- *S.Aureus*
- *Salmonella*
- muffe e lieviti

3.7.1 Preparazione Terreni

Prima di poter andare a piastrare i possibili microrganismi presenti nelle compresse, è necessario preparare i terreni di coltura.

Solitamente vengono venduti in polvere e bisogna reidratarli in un volume noto descritto sull'etichetta del contenitore del terreno.

Spesso le misure sono rapportate a 1000mL; disponendo però da prassi di bottiglie da 1000 mL è preferibile riempirle di acqua deionizzata solo fino ad 800 mL e rapportare il terreno da pesare a quel volume. Questo perché, dopo aver pesato la giusta quantità di terreno e averlo inserito nelle bottiglie, si deve effettuare un passaggio in autoclave per eliminare ogni possibile microrganismo presente nei terreni.

L'autoclave è uno strumento adibito alla sterilizzazione e nel nostro caso viene utilizzato per i terreni di coltura. Viene impostato a 121°C per 15 minuti alla pressione di 1 atm.

3.7.2 Preparazione campione

Per fare in modo che i microrganismi presenti sul campione possano crescere è importante eliminare i conservanti, che agiscono andando ad impedirne la riproduzione.

Per questo motivo si usa un diluente specifico, preparato in modo simile ai terreni e anch'esso sterilizzato in autoclave.

Si pesano 5 mg di campione e si sciolgono in 50 mL di diluente precedentemente preparato. Non bisogna lasciare per troppo tempo il campione nel diluente prima della semina, altrimenti si potrebbero alterare i risultati. È fondamentale siglare le piastre e predisporre tutto l'occorrente prima della preparazione del campione.

3.7.3 Semina su piastra

Per la semina su piastra vengono utilizzate piastre Petri, sulle quali si devono indicare tipologia di terreno di coltura, data e numero campione.

La semina avviene sia su SDA che su TSA, quindi per ogni campione vengono utilizzate due piastre. Prima si preleva 1 mL e si inserisce nella piastra vuota, poi viene colato il terreno di coltura. Si lascia raffreddare per solidificare il terreno e a seguire si inseriscono le piastre di SDA in un incubatore a 25°C, ideale per la crescita di lieviti e muffe, mentre le piastre di TSA vengono inserite in un incubatore a 35°C, ideale per la crescita dei batteri.

3.7.4 Test ELISA

Il saggio immunoassorbente legato ad un enzima (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), il cui acronimo è ELISA, è una tecnica biomolecolare molto diffusa, ad alta sensibilità.

È una tecnologia affidabile per rilevare eventuali agenti patogeni, caratterizzata da una esecuzione rapida che si basa sull'utilizzo di antigeni ed anticorpi marcati con un enzima, generalmente la perossidasi (HRP), una molecola del gruppo delle ossidoreduttasi con attività antiossidante, la quale agisce da catalizzatore di una reazione di ossido-riduzione.

Il test ELISA consente la rilevazione e l'identificazione qualitativa e quantitativa di una sostanza specifica, dosandola mentre si lega ad un'altra che ne rileva la presenza.

Le analisi effettuate si basano sulla tecnologia sandwich a fase solida, dove gli anticorpi contro l'antigene di interesse sono legati ai micropozzetti. Dopo il legame con l'antigene viene inserito l'enzima coniugato, che si lega al complesso antigene-anticorpo in un tutt'uno, dando la tipica forma di sandwich.

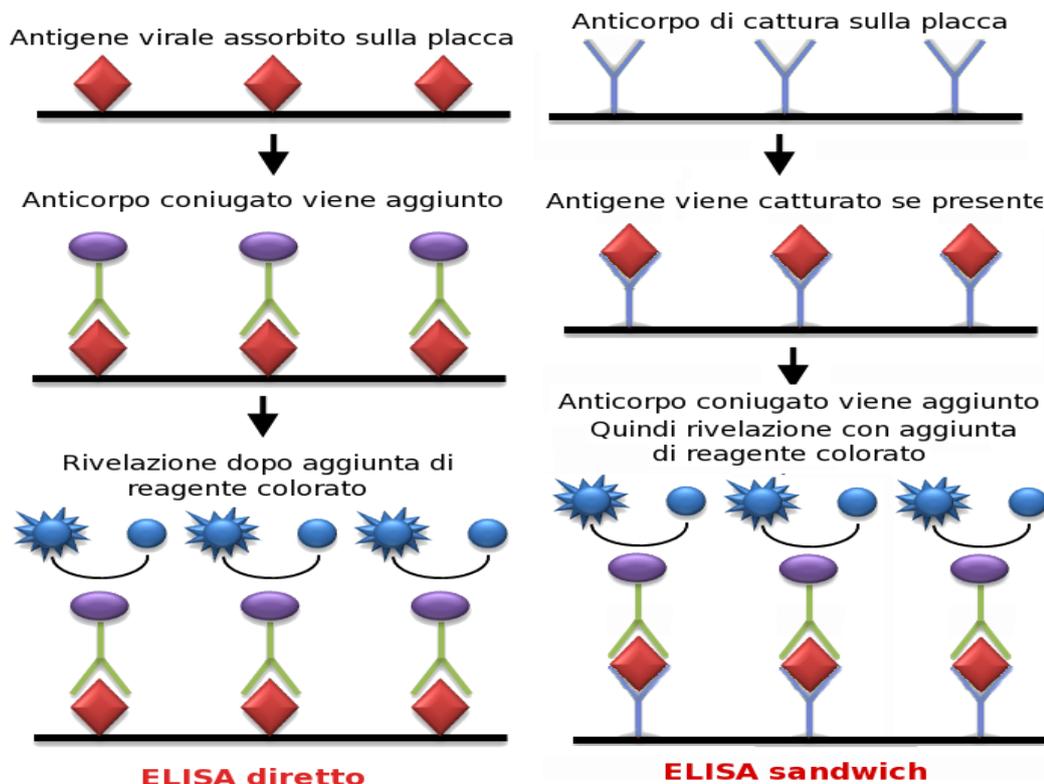


Fig. 3.8 Schema riassuntivo ELISA sandwich diretto (www.microbiologiaitalia.it).

Nel nostro caso sono stati utilizzati kit specifici contenenti sia i reagenti che tutti i materiali da utilizzare per le analisi che si vogliono effettuare.

Nell'ambito del controllo qualità viene impiegato per individuare la presenza di eventuali allergeni, come glutine, β -lattoglobuline, proteine di crostacei o soia, derivanti da altri prodotti aziendali.

I risultati ottenuti con i test ELISA possono essere espressi come alimento intero, come proteine totali, solubili o come proteina specifica. Ad esempio nel caso dell'arachide i risultati vengono solitamente espressi come arachide, come proteine totali o solubili, oppure come specifica proteina allergizzante (es. Ara h1); nel caso del latte, come latte in polvere scremato, come beta-lattoglobulina o caseina. Ovviamente il risultato espresso secondo una di queste basi differirà notevolmente dagli altri. Dal punto di vista della tutela della salute pubblica l'espressione dei risultati come mg di alimento allergizzante per kg di derrata alimentare è probabilmente il più appropriato, in quanto i valori soglia sono solitamente studiati come quantità di alimento tollerabile. La norma europea UNI EN 15633-1 dell'aprile 2009, relativa alla ricerca di allergeni alimentari mediante metodi immunologici, stabilisce che i risultati debbano essere espressi in termini di quantità totale di alimento allergenico (mg/kg) o in termini di proteina, con un idoneo fattore di conversione che ne consenta la trasformazione in peso totale di alimento allergenico (norma europea UNI EN 15633-1, 2009). Talvolta l'individuazione di un appropriato fattore di conversione è ragionevolmente semplice: è questo il caso di alimenti il cui contenuto proteico è sufficientemente definito e con una variabilità contenuta.

Glutine

Il glutine è un complesso proteico presente in alcuni cereali, quali frumento, segale, orzo, farro, spelta, grano Khorasan (spesso in commercio come KAMUT), triticale.

La prolamina è una delle frazioni proteiche che costituiscono il glutine ed è la responsabile dell'effetto tossico nel celiaco.

Si riporta qui di seguito la definizione di glutine e prolamina presente nello Standard del Codex Alimentarius sugli alimenti a fini dietetici speciali per persone intolleranti al glutine (Ministero della Salute, Codex Alimentarius, Recommended International Code of practice general principles of food hygiene, Rev 4-2003).

Il glutine è definito come la frazione proteica di frumento, segale, orzo, avena, kamut, spelta, triticale o i loro ceppi ibridati o da essi derivati, insolubile in acqua e 0,5M NaCl, alla quale i celiaci sono intolleranti.

Le prolamine sono definite come le frazioni del glutine che possono essere estratte da etanolo al 40-70%. La prolamina da frumento è la gliadina, da segale è la secalina, da orzo è l'ordeina e da avena è l'avenina.

Il contenuto di prolamina nel glutine è considerato generalmente del 50% circa. (fonte AIC, Associazione Italiana Celiachia).

L'anticorpo G12 rappresenta la prossima generazione di test del glutine, poiché prende di mira i peptidi tossici che innescano reazioni autoimmuni nelle persone affette da celiachia. Si tratta di un anticorpo monoclonale sviluppato contro il peptide immunotossico 33-meri della frazione di gliadina presente nel glutine.

I risultati ottenuti dai sistemi di test immunochimici basati sull'anticorpo G12 dovrebbero essere considerati più vicini all'ideale di un test di sicurezza alimentare, poiché stabiliscono l'importante legame tra la malattia celiaca e il rilevamento dei peptidi immunotossici.

Per soddisfare i requisiti di legge (Regolamento di esecuzione (UE) n. 828/2014), in base ai quali viene permesso alle aziende di riportare la dicitura "senza glutine" in etichetta qualora ci sia assenza di ingredienti contenenti glutine, a garanzia del processo produttivo entro limiti dei 20 ppm, il kit è in grado di rilevare livelli di glutine pari a 20 mg/kg.

β-lattoglobuline

L'allergia al latte bovino è una delle allergie più diffuse nel mondo. Circa il 3% del latte bovino è composto da proteine, delle quali circa il 18% sono proteine del siero del latte. La maggior parte di proteine contenute in questa frazione sono le β-lattoglobuline, il principale allergene; per questo motivo il rilevamento di loro tracce risulta fondamentale nella produzione di prodotti da ingerire.

AILI (www.associazioneaili.it), associazione che rappresenta la categoria degli intolleranti al lattosio in Italia e tutela questi soggetti, ritiene che un prodotto è:

- senza lattosio se contiene nella sua composizione:
< 0.01% = < 0.01 gr / 100 gr = < 10 mg/100 gr = < 100 ppm

- a basso/ridotto contenuto di lattosio se contiene nella sua composizione:
< 0.1% = < 0.1 gr/100 gr
- naturalmente privo di lattosio: se non contiene ingredienti lattei al suo interno, fatta eccezione per alcuni tipi di prodotti lattiero-caseari.

Crostacei

Le allergie ai crostacei possono svilupparsi a qualsiasi età ma spesso compaiono negli adulti. La principale proteina responsabile dell'allergia è la tropomiosina, una proteina muscolare.

La tropomiosina è stabile al calore e pertanto può determinare reazioni cliniche dopo il consumo di crostacei e molluschi, sia crudi che cotti. Fenomeni di cross-reattività sono stati osservati non solo tra i diversi crostacei (aragosta, granchio, ecc.) e molluschi (seppie, ecc), ma anche con aracnidi (acari della polvere) ed alcuni insetti (scarafaggi), (Besler M. *et al.*, 2001).

Soia

La soia è un legume composto per il 39% della massa totale di proteine nutritive.

Gli allergeni principali tipici della soia sono Gly m3, Gly m4, Glycinin e Trypsin-inhibitor. Relativamente alla stabilità ai trattamenti tecnologici, la soia mantiene il suo potenziale antigenico, ovvero la capacità di legare le IgE circolanti, anche dopo trattamenti termici a varie temperature e per tempi diversi. L'olio di soia, in cui la rettifica determina l'allontanamento della frazione proteica, risulta tollerato dalla maggioranza dei soggetti allergici (Pastorello E. e Ortolani C., 1997). Più a rischio di causare allergia, sia pur raramente, è la lecitina di soia.

Per quanto riguarda le preparazioni contenenti fitosteroli/stanoli ottenuti a partire dalla soia, l'EFSA ritiene che, in considerazione della natura della materia prima, che è un olio di soia raffinato, e dei successivi trattamenti produttivi impiegati per ottenere il prodotto finale, sia piuttosto improbabile che questi prodotti contengano residui di allergene in quantità tali da causare reazioni allergiche severe nei soggetti allergici alla soia (The EFSA Journal, 2007).

A) ELISA test kit per glutine

Contenuto del kit:

- 96 micropozzetti legati all'anticorpo;
- 5 fiale da 1,2 mL ciascuna di glutine standard del kit 0, 4, 20, 80 e 200 ppm (parti per milione);
- una bottiglia contenente una soluzione da 12 mL di enzima coniugato;
- una bottiglia contenente una soluzione da 15 mL di substrato;
- una bottiglia contenente una soluzione da 15 mL di stop solution;
- una bottiglia di 110 mL di extraction buffer;
- una bottiglia di 20 mL di dilution buffer concentrata 5X;
- una bottiglia di 60 mL di wash buffer concentrata 10X.

Preparazione Buffer

- Etanolo 80%: aggiungere 120 mL di etanolo in 30 mL di acqua distillata per ottenere 150 mL di etanolo all'80%.
- Dilution buffer: preparare 100 mL di una soluzione 1:5 della soluzione 5X presente nel kit aggiungendo 20 mL di soluzione 5X a 80 mL di acqua distillata.
- Wash buffer: preparare 100 mL di una soluzione 1:10 della soluzione 10X presente nel kit aggiungendo 10 mL di soluzione 10X al 90 mL di acqua distillata.

Preparazione del campione

Per i campioni solidi 5 g di prodotto da analizzare vengono ridotti in polvere con l'utilizzo del mortaio. Di questi 5 g ne vengono prelevati 0,25 g ed inseriti nel test tube, che deve avere una capacità minima di 10 mL; si aggiungono poi 2,5 mL di extraction buffer (il buffer deve essere aggiunto sotto cappa e si scioglie il campione utilizzando il Vortex).

Incubare a 50°C per 40 minuti vortexando regolarmente.

Trascorsi 40 minuti far raffreddare la soluzione fino a temperatura ambiente e successivamente aggiungere 7,5 mL di etanolo 8% preparato precedentemente.

Scuotere il campione per 60 minuti a temperatura ambiente, centrifugare poi a 2000 g per 10 minuti per ottenere il supernatante. Prelevare il supernatante e trasferirlo in una nuova provetta, diluirlo 1:10 con il dilution buffer preparato precedentemente.

Procedura dell'analisi

Predisporre un numero adeguato di micropozzetti in base al numero di campioni (l'analisi viene sempre svolta in doppio, quindi sia per ogni standard che per ogni campione vengono inseriti due pozzetti).

Inserire 100 μ L di standard e campioni nei pozzetti appropriati e incubare per 20 minuti. Lavare con il wash buffer riempiendo i pozzetti e poi scartando il buffer per 5 volte; ci si può aiutare dopo i 5 lavaggi con un panno di carta, tamponando per eliminare il buffer rimanente.

Aggiungere in ogni micropozzetto 100 μ L di enzima coniugato, incubare per 20 minuti e ripetere il lavaggio.

La procedura richiede poi di aggiungere 100 μ L di soluzione contenente il substrato e di incubare 20 minuti al riparo dalla luce.

Per l'ultimo passaggio, dopo i 20 minuti di incubazione, non bisogna procedere al lavaggio, ma aggiungere subito 100 μ L di stop solution, in modo da fermare l'attività enzimatica e non dare falsi positivi. Con la stop solution il colore della soluzione nei micropozzetti vira da blu a giallo.

Tramite lo spettrofotometro si può leggere ad una lunghezza d'onda di 450 nm l'assorbanza e la concentrazione della molecola in analisi (nel nostro caso il glutine), presente nei micropozzetti.

Il kit utilizzato ha un range di lettura tra 4 e 200 ppm.

B) ELISA test kit per β -lattoglobuline

Contenuto del kit:

- 48 micropozzetti legati all'anticorpo;
- 5 fiale da 4 mL ciascuna di glutine standard del kit 0, 10, 40, 100 e 400 ppb (parti per miliardo);
- una bottiglia contenente una soluzione da 7.5 mL di enzima coniugato;
- una bottiglia contenente una soluzione da 7.5 mL di substrato;
- una bottiglia contenente una soluzione da 7.5 mL di stop solution;
- una bottiglia di 120 mL di extraction buffer concentrata 10X;
- una bottiglia di 60 mL di wash buffer concentrata 10X.

Preparazione Buffer

- Extraction buffer: preparare 100 mL di una soluzione 1:10 della soluzione 10X presente nel kit aggiungendo 10 mL di soluzione 10X al 90 mL di acqua distillata.
- Wash buffer: preparare 100 mL di una soluzione 1:10 della soluzione 10X presente nel kit aggiungendo 10 mL di soluzione 10X al 90 mL di acqua distillata.

Preparazione del campione

Per i campioni solidi 5 g di prodotto da analizzare vengono ridotti in polvere con l'utilizzo del mortaio. Di questi 5 g ne viene prelevato 1 g ed inserito nel test tube; si aggiungono poi 20 mL di extraction buffer e si scioglie il campione utilizzando il Vortex. Incubare a 60°C per 15 minuti vortexando regolarmente ogni 2 minuti circa. Centrifugare poi a 2000 g per 10 minuti per ottenere il supernatante. Prelevare il supernatante e trasferirlo in una nuova provetta.

Procedura dell'analisi

Per la procedura analisi si agisce nella stessa modalità del test precedente e la lettura avviene a 450nm.

C) ELISA test kit per crostacei

Contenuto del kit:

- 48 micropozzetti legati all'anticorpo;
- 5 fiale da 4 mL ciascuna di glutine standard del kit 0, 10, 40, 100 e 400 ppb;
- una bottiglia contenente una soluzione da 7.5 mL di enzima coniugato;
- una bottiglia contenente una soluzione da 7.5 mL di substrato;
- una bottiglia contenente una soluzione da 7.5 mL di stop solution;
- una bottiglia di 120 mL di extraction buffer concentrata 10X;
- una bottiglia di 60 mL di wash buffer concentrata 10X.

Preparazione Buffer

- Extraction buffer: preparare 100 mL di una soluzione 1:10 della soluzione 10X presente nel kit aggiungendo 10 mL di soluzione 10X al 90 mL di acqua distillata.
- Wash buffer: preparare 100 mL di una soluzione 1:10 della soluzione 10X presente nel kit aggiungendo 10 mL di soluzione 10X al 90 mL di acqua distillata.

Preparazione del campione

Per i campioni solidi 5 g di prodotto da analizzare vengono ridotti in polvere con l'utilizzo del mortaio. Di questi 5 g ne viene prelevato 1 g ed inserito nel test tube; si aggiungono poi 20 mL di extraction buffer e si scioglie il campione utilizzando il Vortex. Incubare a 60°C per 15 minuti vortexando regolarmente ogni 2 minuti circa. Centrifugare poi a 2000 g per 10 minuti per ottenere il supernatante. Prelevare il supernatante e trasferirlo in una nuova provetta.

Procedura dell'analisi

Per la procedura analisi si agisce nella stessa modalità del test precedente e la lettura avviene a 450nm.

D) ELISA test kit per soia

Contenuto del kit:

- 48 micropozzetti legati all'anticorpo;
- 5 fiale da 4 mL ciascuna di glutine standard del kit 0, 40, 100, 400 e 1000 ppb;
- una bottiglia contenente una soluzione da 7.5 mL di enzima coniugato;
- una bottiglia contenente una soluzione da 7.5 mL di substrato;
- una bottiglia contenente una soluzione da 7.5 mL di stop solution;
- una bottiglia di 120 mL di extraction buffer concentrata 10X;
- una bottiglia di 60 mL di wash buffer concentrata 10X.

Preparazione Buffer

- Extraction buffer: preparare 100 mL di una soluzione 1:10 della soluzione 10X presente nel kit aggiungendo 10 mL di soluzione 10X al 90 mL di acqua distillata.
- Wash buffer: preparare 100 mL di una soluzione 1:10 della soluzione 10X presente nel kit aggiungendo 10 mL di soluzione 10X al 90 mL di acqua distillata.

Preparazione del campione

Per i campioni solidi 5 g di prodotto da analizzare vengono ridotti in polvere con l'utilizzo del mortaio. Di questi 5 g ne viene prelevato 1 g ed inserito nel test tube; si aggiungono poi 20 mL di extraction buffer e si scioglie il campione utilizzando il Vortex. Incubare a 60°C per 15 minuti vortexando regolarmente ogni 2 minuti circa. Centrifugare poi a 2000 g per 10 minuti per ottenere il supernatante. Prelevare il supernatante e trasferirlo in una nuova provetta.

Procedura dell'analisi

Per la procedura analisi si agisce nella stessa modalità del test precedente e la lettura avviene a 450nm.

3.8 Validazione metodo silimarina su nuovo HPLC

Ogni analisi chimica ha bisogno di una tecnica, un metodo, una procedura ed eventualmente un protocollo di analisi scelto in base alla necessità del committente, come tempo di analisi, qualità e costo.

La validazione di un test di analisi permette di verificare se effettivamente è adatto a soddisfare i requisiti per essere utilizzato in quel laboratorio in cui viene validato.

Per poter validare un metodo su di un nuovo strumento è necessario effettuare una serie di test in modo da verificare che il metodo di validazione soddisfi i requisiti per l'utilizzazione dello strumento, oppure debba essere modificato al fine di renderlo operativo per quelle analisi (UNI EN ISO 9000:2000).

Dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:

- la validazione è la conferma attraverso esame e l'apporto di evidenza oggettiva che i requisiti particolari per l'utilizzazione prevista siano soddisfatti;

- il laboratorio deve validare i metodi non normalizzati, i metodi sviluppati/progettati dal laboratorio, i metodi normalizzati utilizzati al di fuori del proprio scopo e campo di applicazione prefissato, come pure estensioni e modifiche di metodi normalizzati per confermare che i metodi siano adatti all'utilizzazione prevista; la validazione deve essere estesa in modo da soddisfare le esigenze di una data applicazione o di un campo di applicazione;
- il campo e l'accuratezza dei valori ottenibili da metodi validati (per esempio l'incertezza dei risultati, i limiti di rilevazione, la selettività del metodo, la linearità, la ripetibilità e/o la riproducibilità, la robustezza nei confronti di influenze esterne e/o la sensibilità incrociata nei confronti di interferenze provenienti dalla matrice del campione/oggetto da provare), così come valutati per l'utilizzo previsto, devono corrispondere alle esigenze del cliente.

Nel caso specifico di questo elaborato di tesi il motivo della validazione del metodo è la verifica del metodo su un nuovo strumento.

Le caratteristiche che andremo ad analizzare per confermare la validità del metodo sono Specificità, Precisione intermedia, Linearità e Accuratezza (Desimoni E. e Brunetti B., 2003). Per ognuna di esse si avrà una diversa modalità di verifica.

Materiali

- L'HPLC utilizzato è Thermo Scientific HPLC-UV Vanquish Core.
- Colonna: Zorbax Eclipse Plus RHTT C18 50*3.0 mm 1.8 µm.
- Pre-colonna: Phenomenex C18 4 * 3.0 mm.
- Materiali presenti nel metodo della silimarina nel paragrafo 3.5.

Per le analisi si è ricorso all'uso del metodo descritto nel paragrafo 3.5, in particolare la parte riguardante la materia prima.

Specificità

La specificità può essere definita come la capacità di misurare accuratamente l'analita in presenza di interferenti. Per questa tipologia di analisi è stato utilizzato uno standard della silimarina, una materia prima già analizzata e già in specifica, ed un placebo formato da tutte le sostanze presenti negli integratori che contengono silimarina, tranne la silimarina stessa.

Si agisce come da metodo descritto nel paragrafo 3.5, trattando anche il placebo come un campione di materia prima.

Precisione intermedia

La precisione intermedia è la concordanza tra risultati di prova indipendenti ottenuti con lo stesso metodo su materiali identici, nello stesso laboratorio, dallo stesso operatore, usando la stessa apparecchiatura e in intervalli di tempo lunghi (diverse serie analitiche con possibilità di cambiamento del lotto dei reattivi e dei materiali di consumo).

Per valutare questo parametro sono stati analizzati per tre giorni 6 campioni della stessa materia prima di silimarina, utilizzando il metodo descritto nel paragrafo 3.5.

Linearità

La linearità di un metodo analitico corrisponde alla sua capacità di produrre risultati direttamente proporzionali alla concentrazione degli analiti nei campioni, all'interno di un determinato campo di validità.

Deve essere verificata attraverso il calcolo del coefficiente di correlazione della curva di taratura eseguita, quando possibile, con aggiunte standard alla matrice da analizzare. Sono generalmente accettati coefficienti di correlazione r (secondo il metodo dei minimi quadrati) pari almeno a 0,99.

Sono stati pertanto pesati i campioni di materia prima utilizzata nelle analisi precedenti per la validazione, in modo da avere una concentrazione pari al 50%, 75%, 100%, 125% e 150% di materia prima nella soluzione.

Ogni campione è stato riprodotto in triplo e si è fatto uso del metodo descritto nel paragrafo 3.5 riguardante la materia prima, con le pesate rapportate alla concentrazione finale da ottenere.

Accuratezza

L'accuratezza è il grado di concordanza tra il valore medio ottenuto a partire da un grande insieme di risultati di prova e un valore di riferimento accettato. In generale corrisponde alla quantità misurata di analita rispetto alla quantità nota, aggiunta ad una matrice per valori di concentrazione che sono all'interno del campo di validità del metodo stesso. Per l'analisi di questo parametro si è simulato il prodotto finito, andando a pesare ogni componente della miscela del prodotto stesso, rigenerando quindi l'integratore. Come standard non si è considerato quello presente nel metodo, ma è stata utilizzata la materia prima analizzata nelle precedenti validazioni. La miscela ottenuta è trattata come se fosse un normale campione seguendo il metodo descritto per la materia prima nel paragrafo 3.5; sono stati analizzati 6 campioni indipendenti.

4. Analisi e risultati

4.1 Determinazione cromatografica della berberina cloruro nella materia prima

Utilizzando il metodo discusso nel paragrafo 3.3, ed in particolare la preparazione relativa alla materia prima, si è proceduto con l'analisi di un lotto per verificare se la titolazione della berberina cloruro fosse idonea per poi essere usata come componente di una miscela di prodotto finito.

Nella berberina, per essere in specifica, la percentuale della titolazione deve essere uguale o superiore all'85% per garantirne la conformità.

Come primo passaggio sono state inserite le vial di standard, di modo che lo strumento potesse creare una curva di calibrazione su cui basare successivamente l'analisi dei campioni di materia prima.

Lo standard è analizzato 8 volte dall'HPLC, ma le prime 4 misurazioni non vengono conteggiate, in quanto funzionali al condizionamento della macchina.

La percentuale del titolo viene calcolata dallo strumento ed è rappresentata dall'area posizionata sotto il grafico dei vari cromatogrammi; nello standard si valuta la risposta strumentale data dall'area.

Si passa poi ai campioni di materia prima; qui di seguito (Fig. da 4.1.5 a 4.1.8) sono stati inseriti come esempio i cromatogrammi di due campioni derivati dalla stessa materia prima. Per ogni campione si effettuano due misurazioni indipendenti per verificare che i risultati ottenuti non siano significativamente diversi; in caso contrario il campione potrebbe aver subito alterazioni durante la preparazione o il processo di analisi.

Per il primo campione sono stati individuati i titoli di 89,65 e 89,75, dai quali risulta che mediamente il titolo percentuale del primo campione è 89,70. Essendo la media compresa tra 85 e 90%, il primo campione è dunque da considerarsi conforme (Fig. 4.1.5 e 4.1.6).

Nel secondo campione le due titolazioni corrispondono a 89,46 e 89,52 con una media di 89,49, anch'essa compresa tra l'85 e il 90% (Fig. 4.1.7 e 4.1.8).

Sulla base dei risultati ottenuti la materia prima in oggetto potrà essere utilizzata nella miscela per prodotti finiti che contengono berberina cloruro, essendo la stessa risultata conforme.

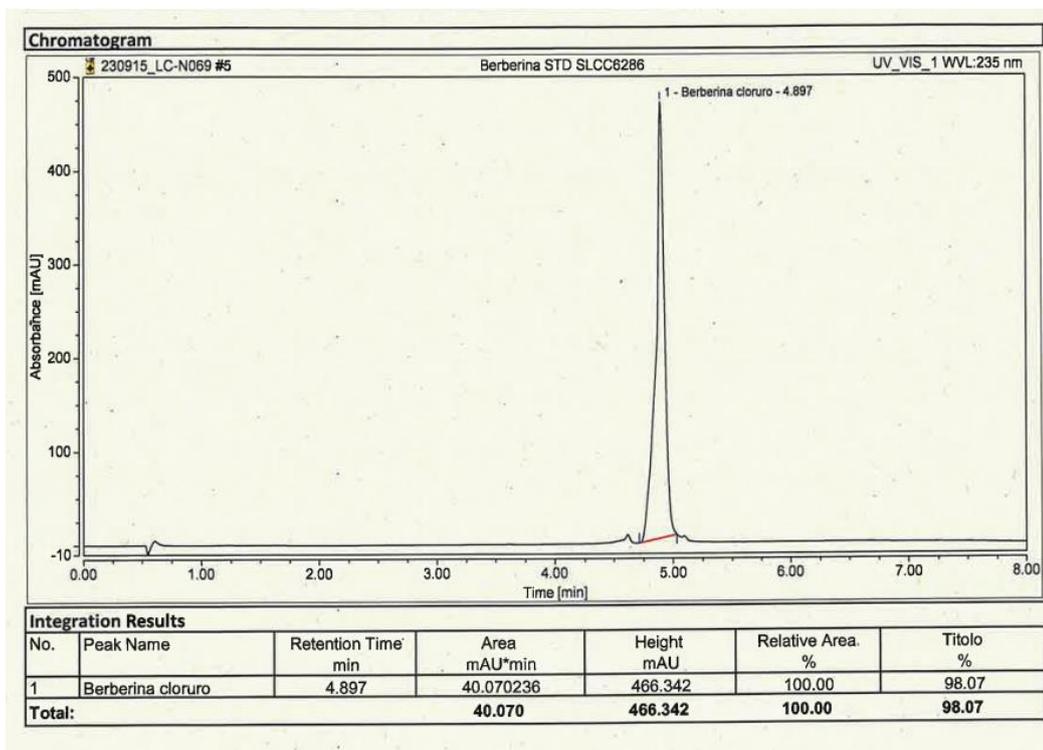


Fig. 4.1.1 Cromatogramma prima misurazione STD berberina cloruro.

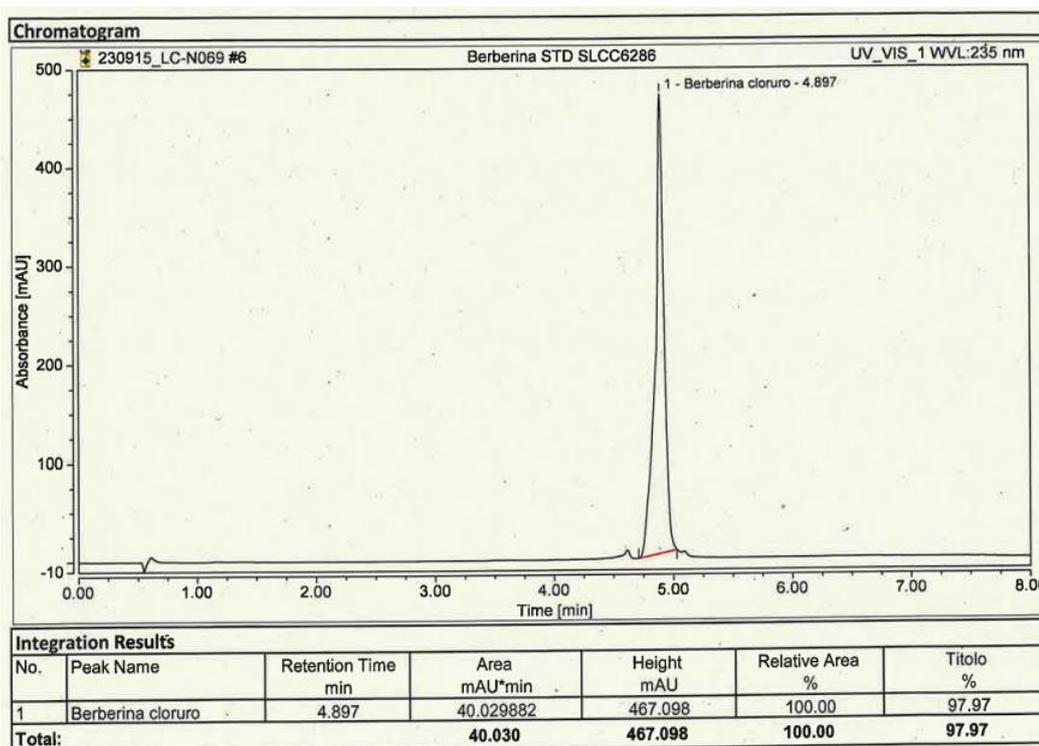


Fig. 4.1.2 Cromatogramma seconda misurazione STD berberina cloruro.

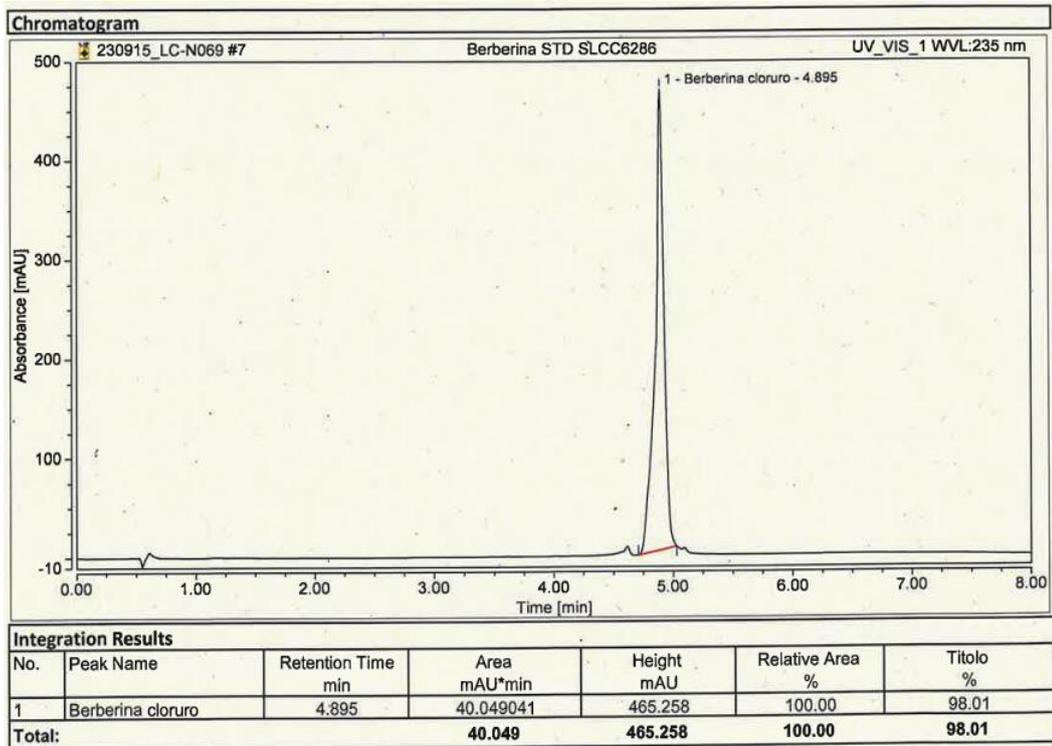


Fig. 4.1.3 Cromatogramma terza misurazione STD berberina cloruro.

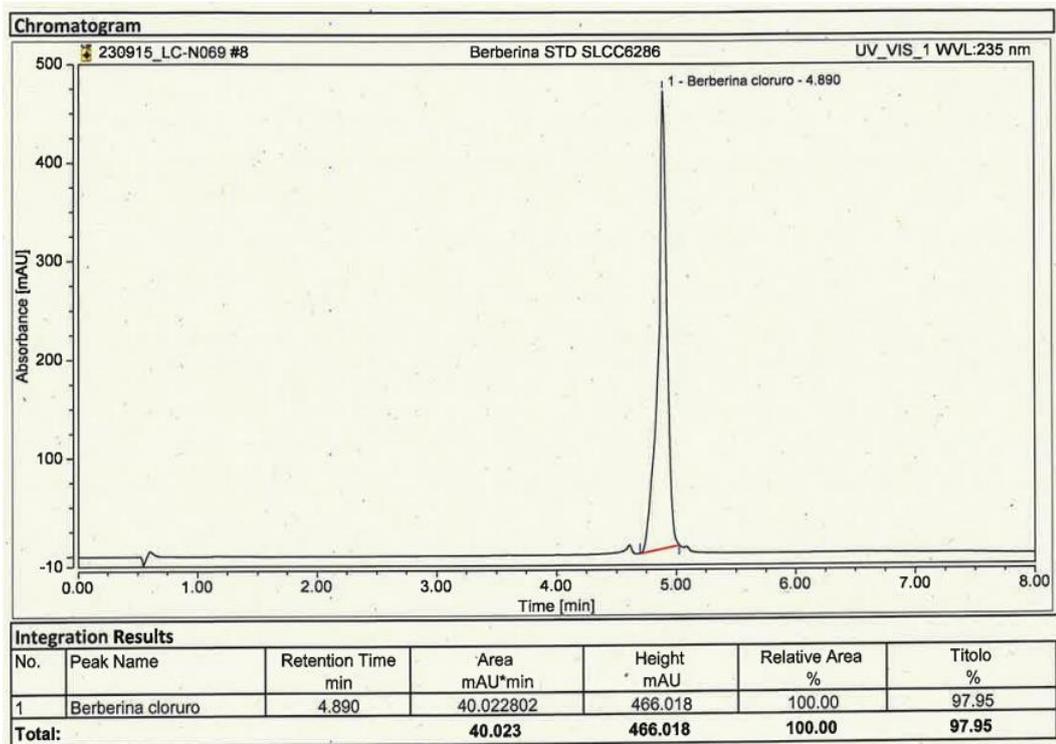


Fig. 4.1.4 Cromatogramma quarta misurazione STD berberina cloruro.

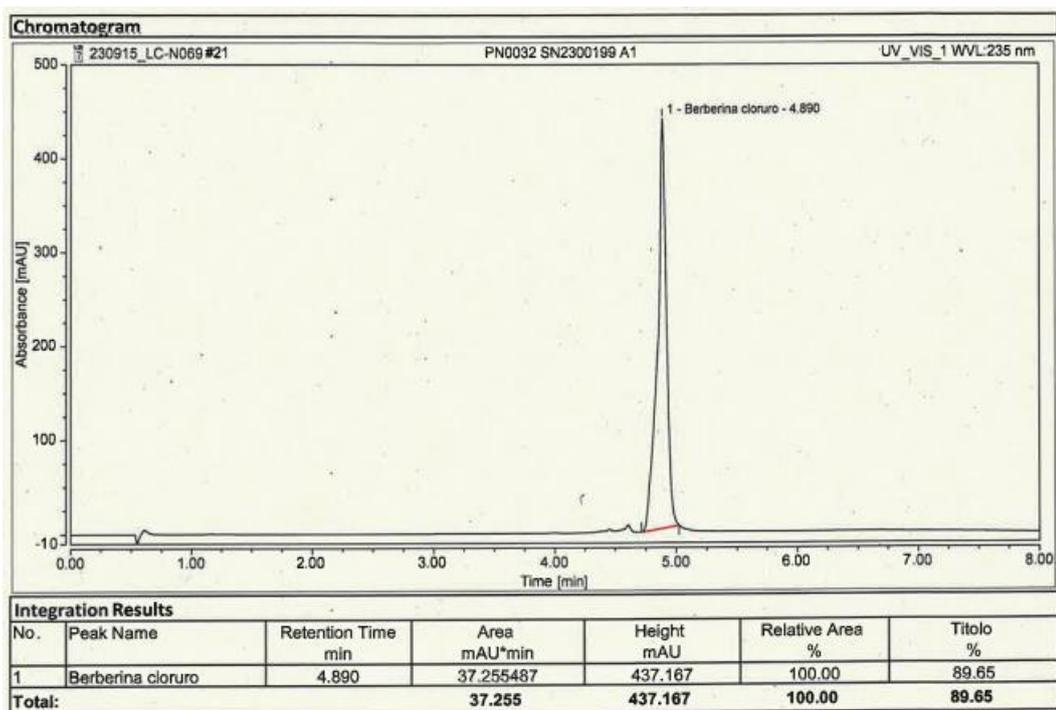


Fig. 4.1.5 Cromatogramma prima misurazione campione 1.

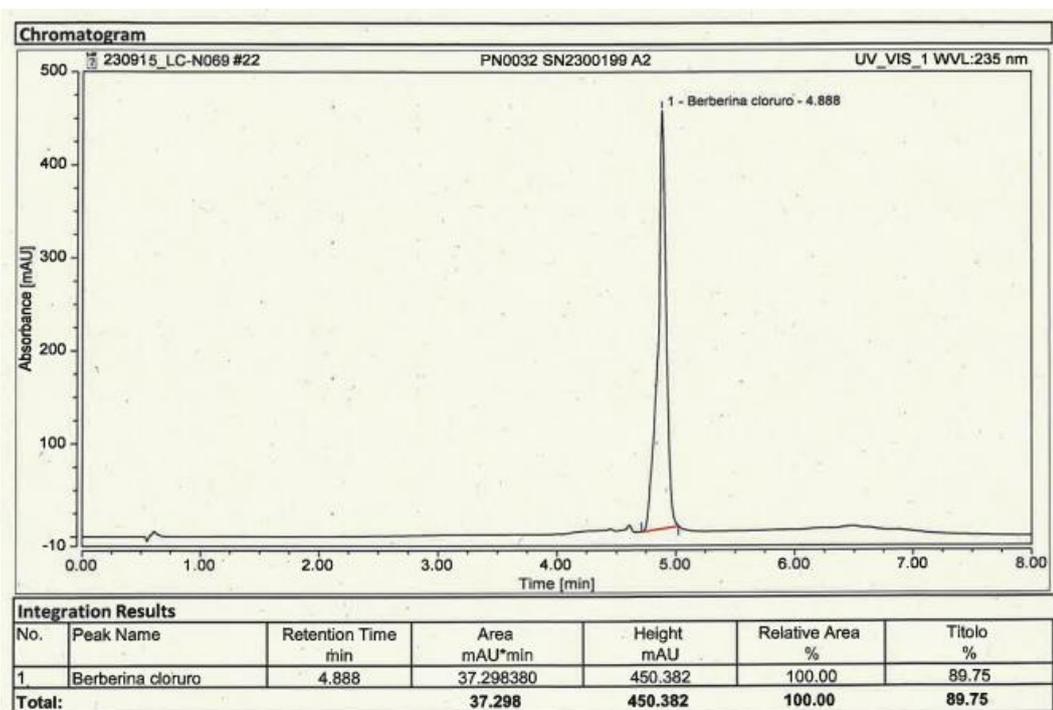


Fig. 4.1.6 Cromatogramma seconda misurazione campione 1.

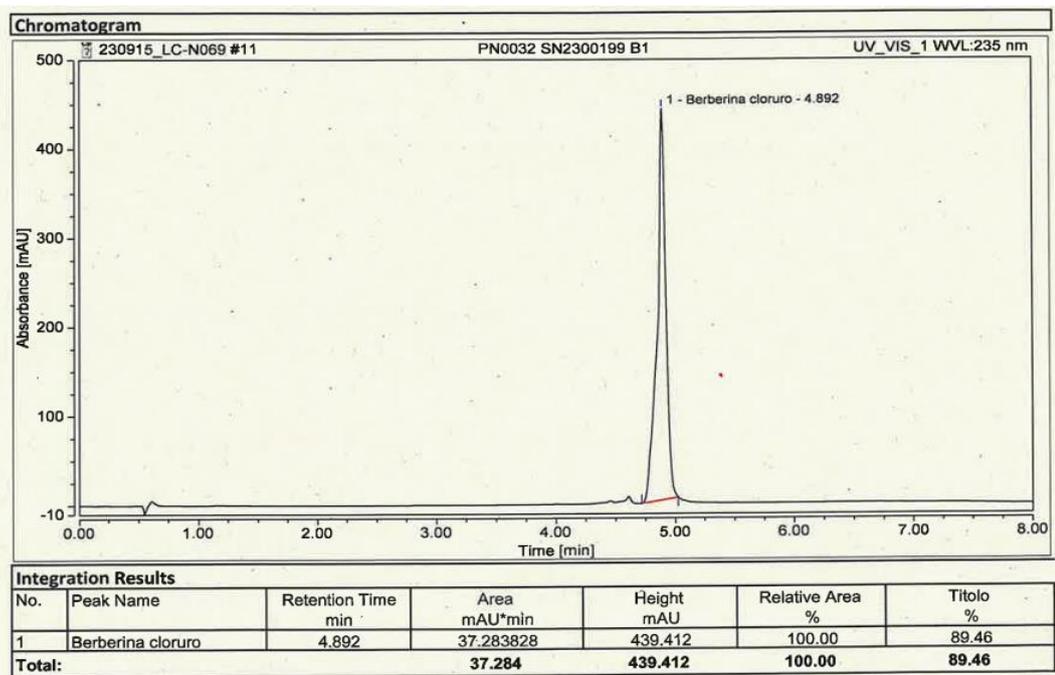


Fig. 4.1.7 Cromatogramma prima misurazione campione 2.

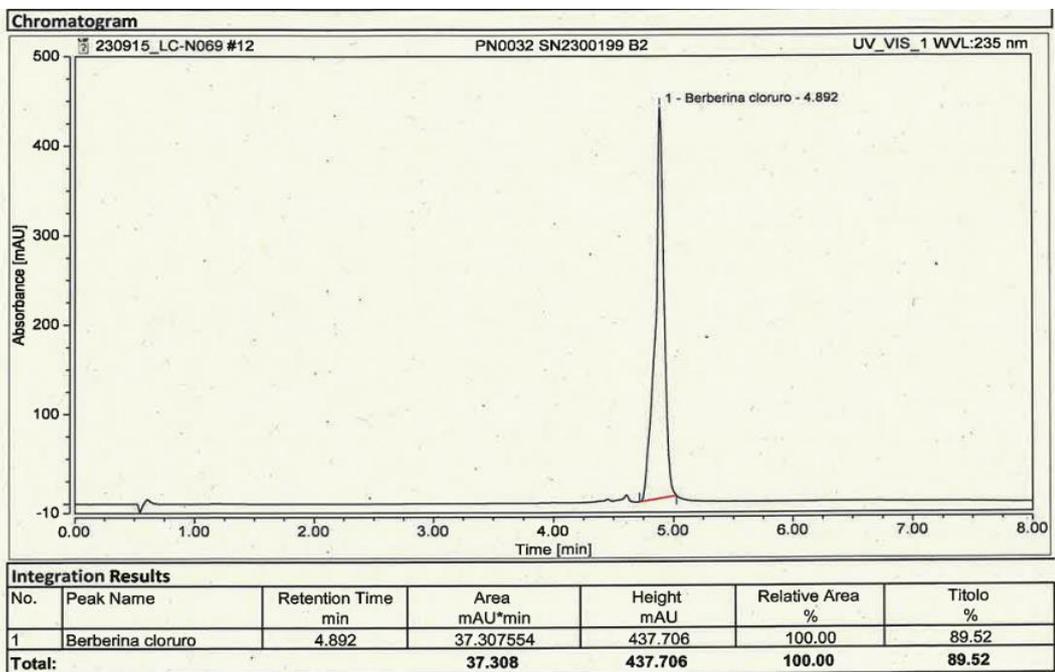


Fig. 4.1.8 Cromatogramma seconda misurazione campione 2.

4.2 Determinazione cromatografica della monacolina K nella materia prima

Utilizzando il metodo discusso nel paragrafo 3.4, ed in particolare la preparazione relativa alla materia prima, si è proceduto con l'analisi di un lotto di monacolina K per verificare se la titolazione fosse idonea ad essere impiegata come componente di una miscela di prodotto finito.

Nelle specifiche la percentuale della titolazione deve attestarsi tra l'1,7 e l'1,9% per garantirne la conformità.

Come primo passaggio sono state inserite le vial di standard, di modo che lo strumento potesse creare una curva di calibrazione su cui poi basare successivamente l'analisi dei campioni di materia prima.

Lo standard è analizzato 8 volte dall'HPLC, ma le prime 4 misurazioni non vengono conteggiate, in quanto funzionali al condizionamento della macchina.

Dopo aver analizzato gli standard per la retta di taratura del metodo si può passare alla titolazione dei campioni. Come nell'analisi precedente sono stati utilizzati come esempio i cromatogrammi di due campioni derivati dalla stessa materia prima e per ogni campione sono state effettuate due misurazioni indipendenti, per verificare che i risultati ottenuti non siano significativamente diversi; in caso contrario il campione potrebbe aver subito alterazioni durante la preparazione o il processo di analisi.

Nel primo e nel secondo campione il titolo medio è perfettamente nel range di conformità con un valore medio di 1,81% (Fig. da 4.2.5 a 4.2.8).

Non essendoci quindi irregolarità, la materia prima del lotto analizzato potrà essere utilizzata come componente nei prodotti finiti contenenti monacolina K.

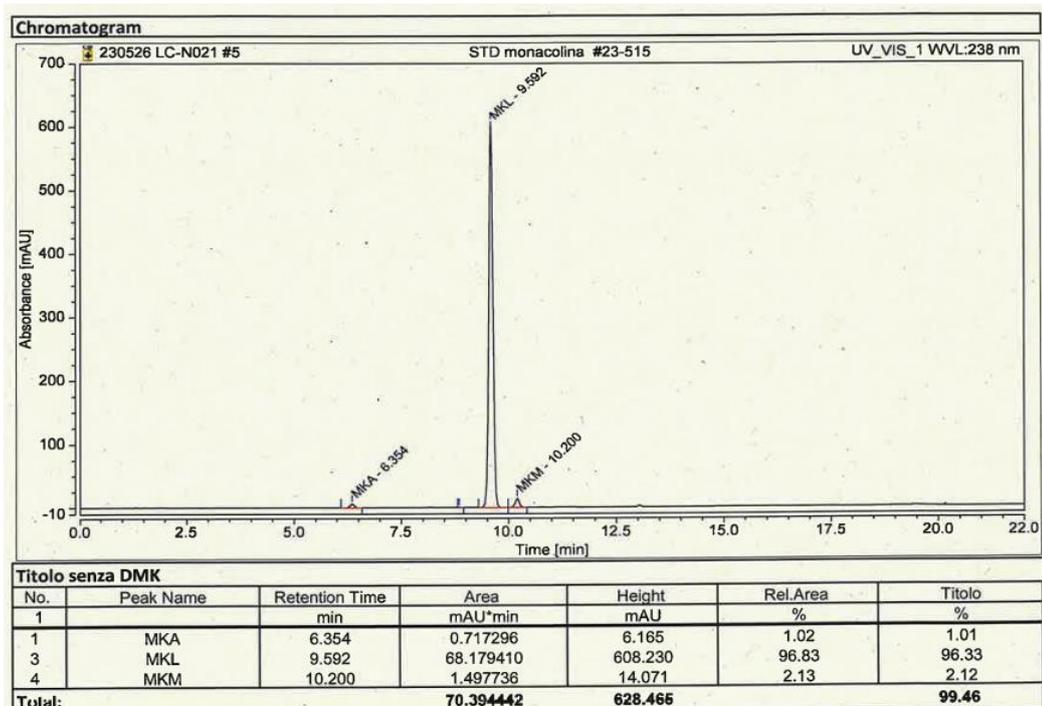


Fig. 4.2.1 Cromatogramma prima misurazione STD monacolina K.

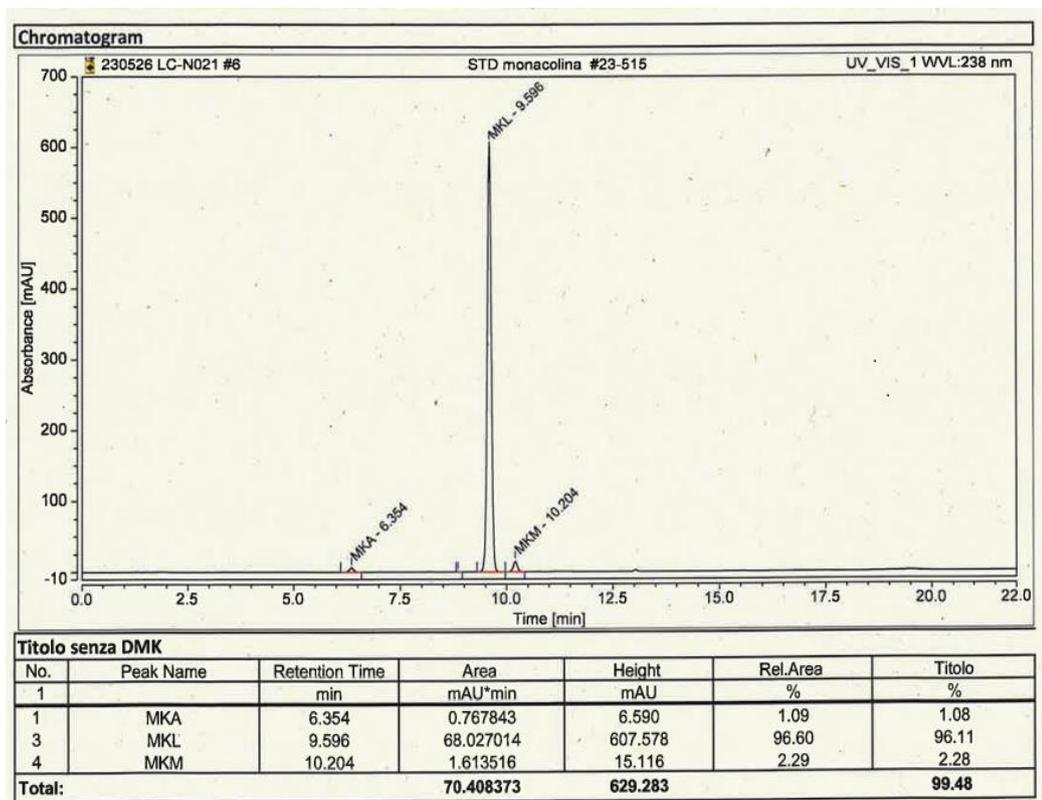


Fig. 4.2.2 Cromatogramma seconda misurazione STD monacolina K.

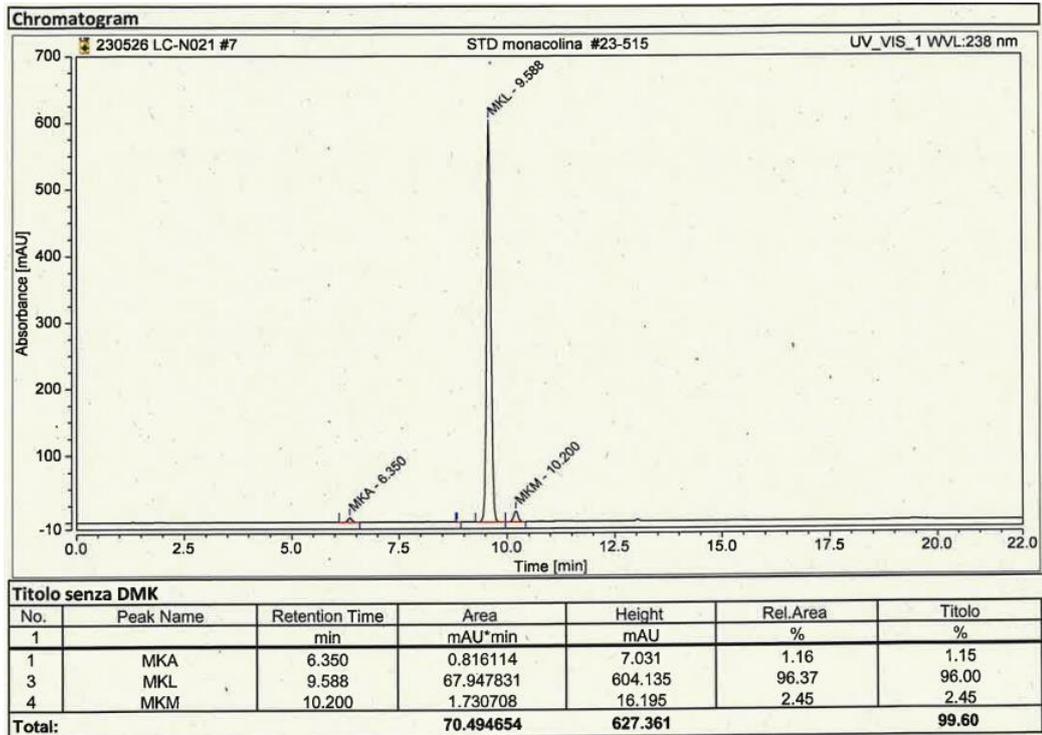


Fig. 4.2.3 Cromatogramma terza misurazione STD monocolina K.

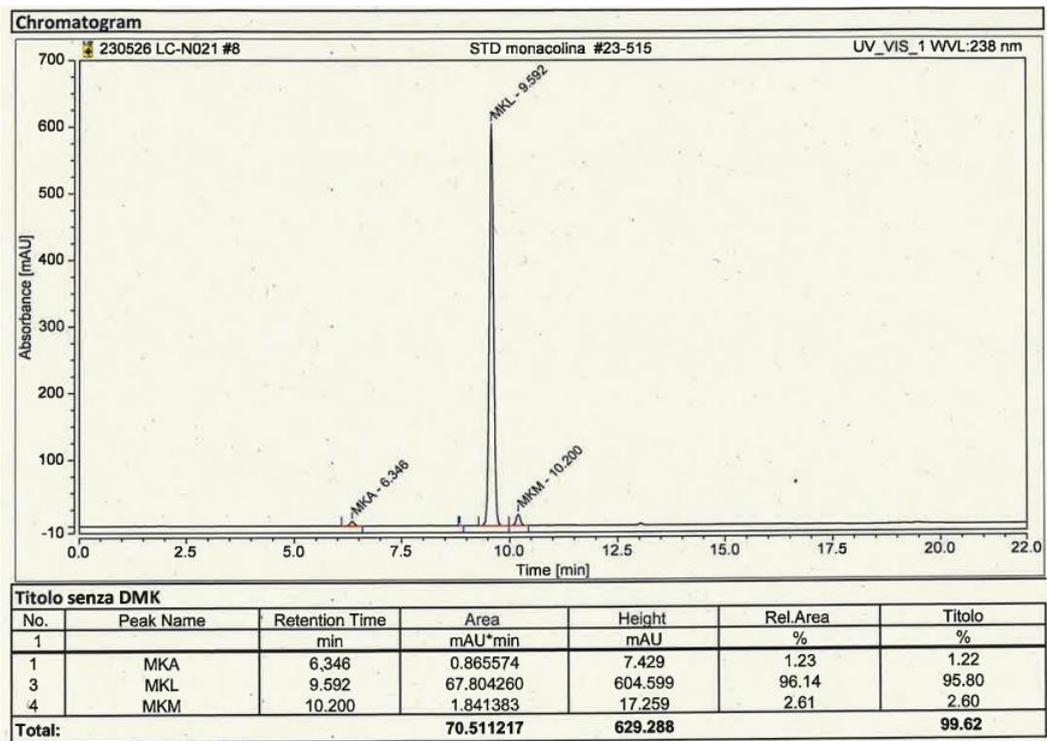


Fig. 4.2.4 Cromatogramma quarta misurazione STD monocolina K.

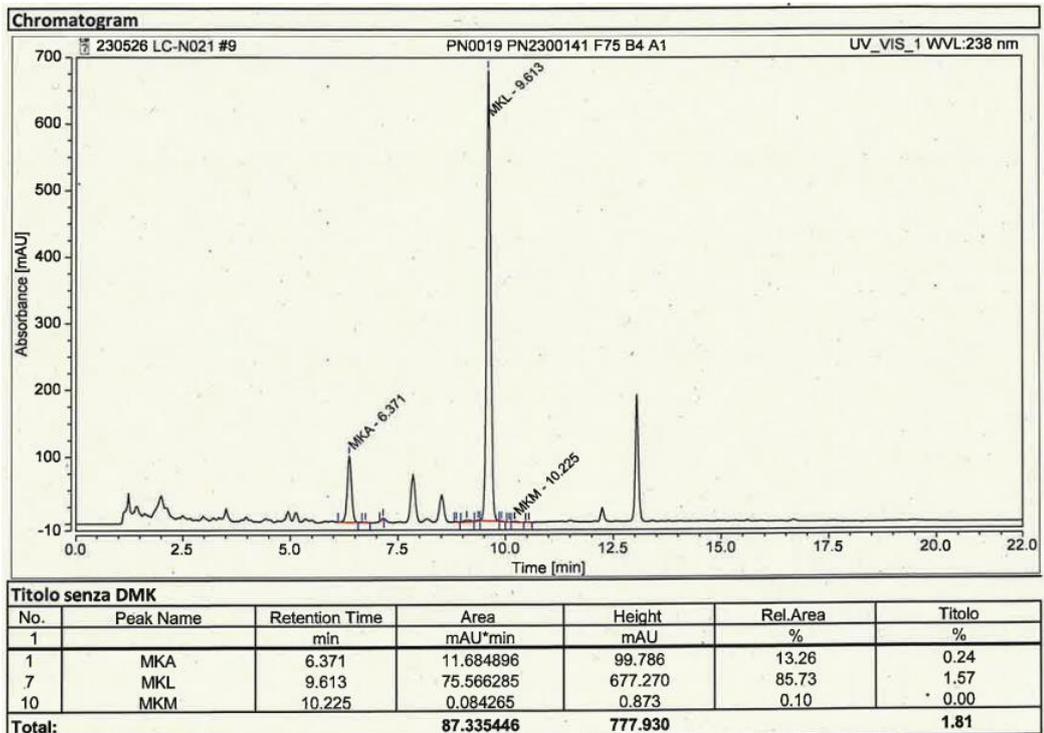


Fig. 4.2.5 Cromatogramma della prima misurazione del primo campione.

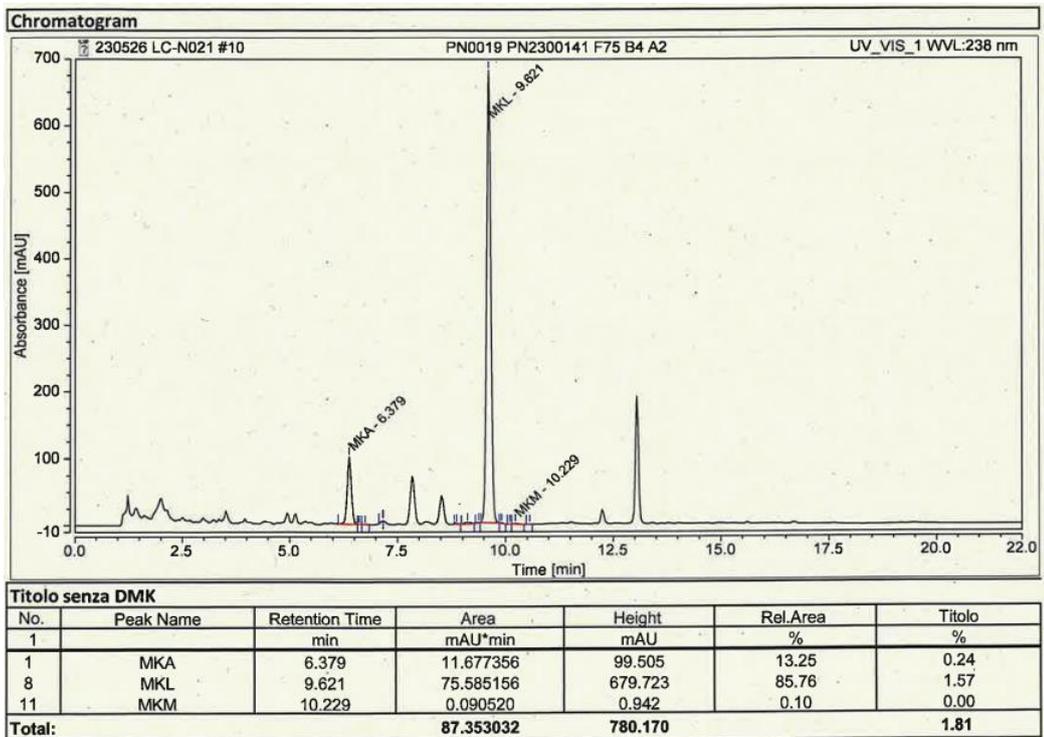


Fig. 4.2.6 Cromatogramma della seconda misurazione del primo campione.

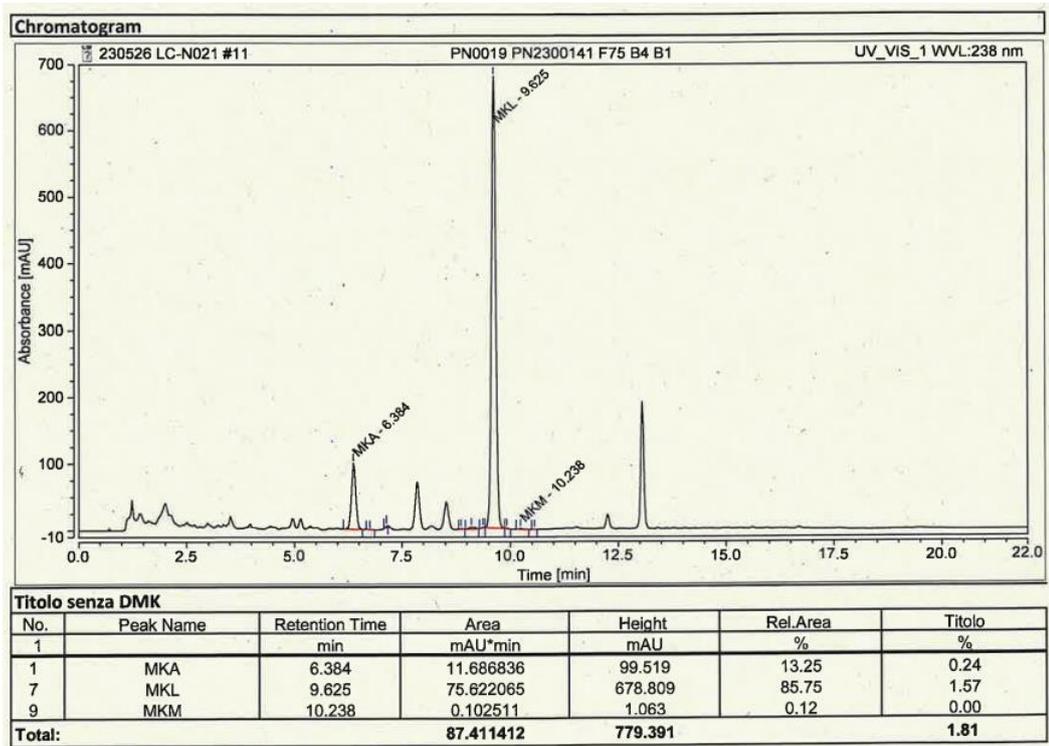


Fig. 4.2.7 Cromatogramma della prima misurazione del secondo campione.

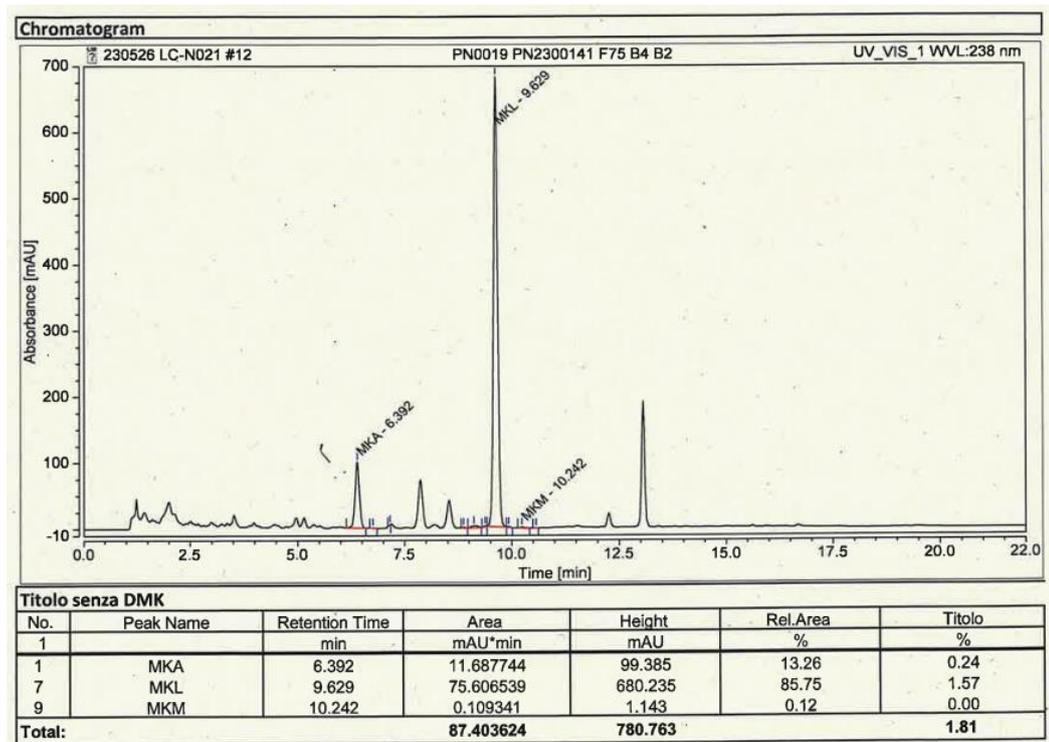


Fig. 4.2.8 Cromatogramma della seconda misurazione del secondo campione.

4.3 Determinazione cromatografica della silimarina nella materia prima

Facendo uso del metodo discusso nel paragrafo 3.5, ed in particolare la preparazione relativa alla materia prima, si è proceduto con l'analisi di un lotto di silimarina per verificare se fosse conforme alle specifiche della scheda della molecola.

A differenza della berberina cloruro e della monacolina K, il grafico della silimarina è più complesso e comprende molti più picchi.

Nello standard troveremo tre picchi, le cui aree corrispondono alla silibinina A, alla silibinina B e alla isosilibinina A, visibili nei grafici sottostanti (da Fig. 4.3.1 a 4.3.4).

Riguardo alla materia prima, invece, saranno individuati ulteriori picchi che rappresentano la silicristina, la silidianina e la isosilibinina B (da Fig. 4.3.5 a 4.3.8).

Per ognuna di queste 6 componenti è presente un range specifico di convalida; nel nostro caso la somma della silicristina e silidianina deve essere compresa tra il 20 e il 45%, la somma di silibinina A e B deve essere compresa tra il 40 e il 65% e la somma di isosilibinina A e B deve essere compresa tra il 10 e il 20%.

Il totale del titolo ottenuto dalla somma di tutte le componenti analizzate deve essere compreso tra 75 e 80,9%.

Come primo passaggio sono state inserite le vial di standard, di modo che lo strumento potesse creare una curva di calibrazione su cui poi basare l'analisi dei campioni di materia prima. Lo standard è analizzato 8 volte dall'HPLC, ma le prime 4 misurazioni non vengono conteggiate, in quanto funzionali al condizionamento della macchina.

Dopo aver analizzato lo standard, vengono inserite le vial dei due campioni derivati dalla stessa materia prima, che saranno analizzati con due iniezioni indipendenti ciascuno (per ogni campione si effettuano due misurazioni indipendenti per verificare che i risultati ottenuti non siano significativamente diversi; in caso contrario il campione potrebbe aver subito alterazioni durante la preparazione o il processo di analisi).

Sia la somma delle singole parti dei componenti che la somma totale media rientrano nel range di conformità per il primo campione analizzato, con una media del titolo pari a 79,37 (Fig. 4.3.5 e 4.3.6).

Anche nel secondo campione sia il titolo delle singole componenti che il titolo medio delle due iniezioni è da ritenersi conforme, avendo la percentuale pari all'80,14% (Fig. 4.3.7 e 4.3.8). Complessivamente il lotto di silimarina analizzato è dunque conforme e può essere utilizzato.

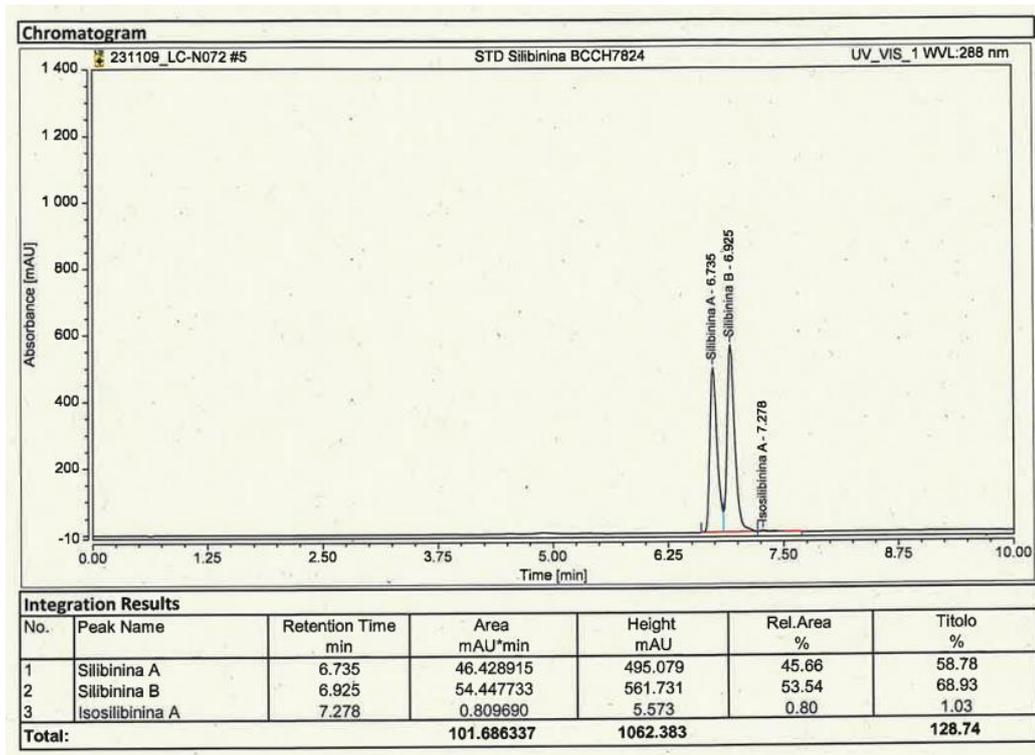


Fig. 4.3.1 Cromatogramma prima misurazione STD silimarina.

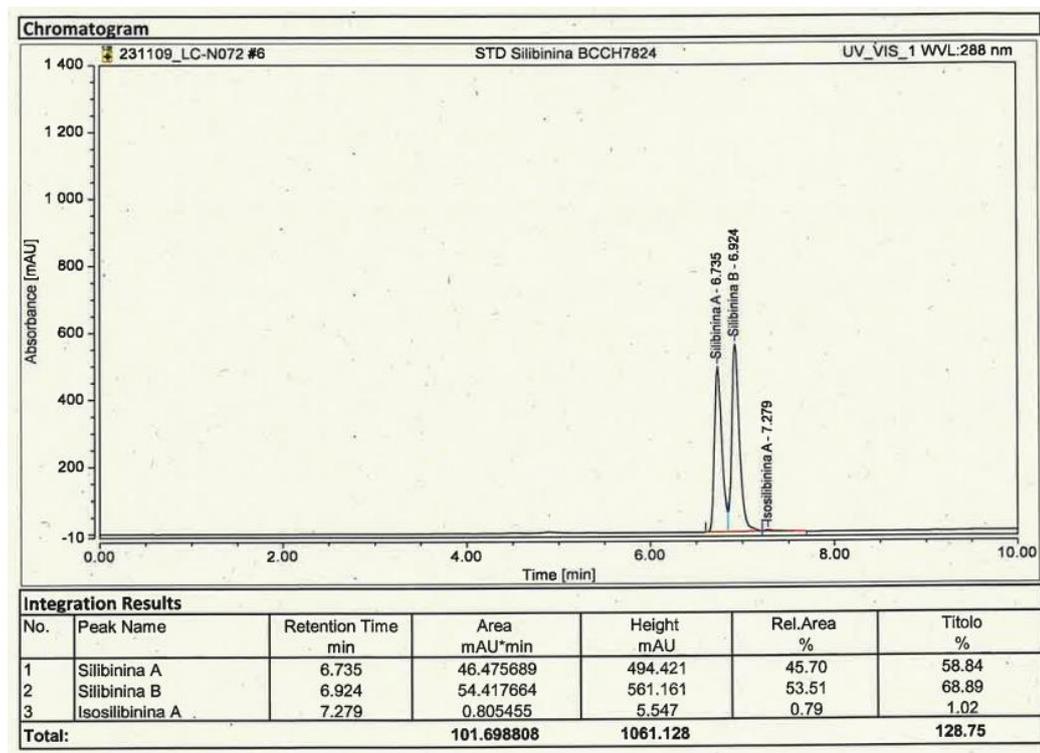


Fig. 4.3.2 Cromatogramma seconda misurazione STD silimarina.

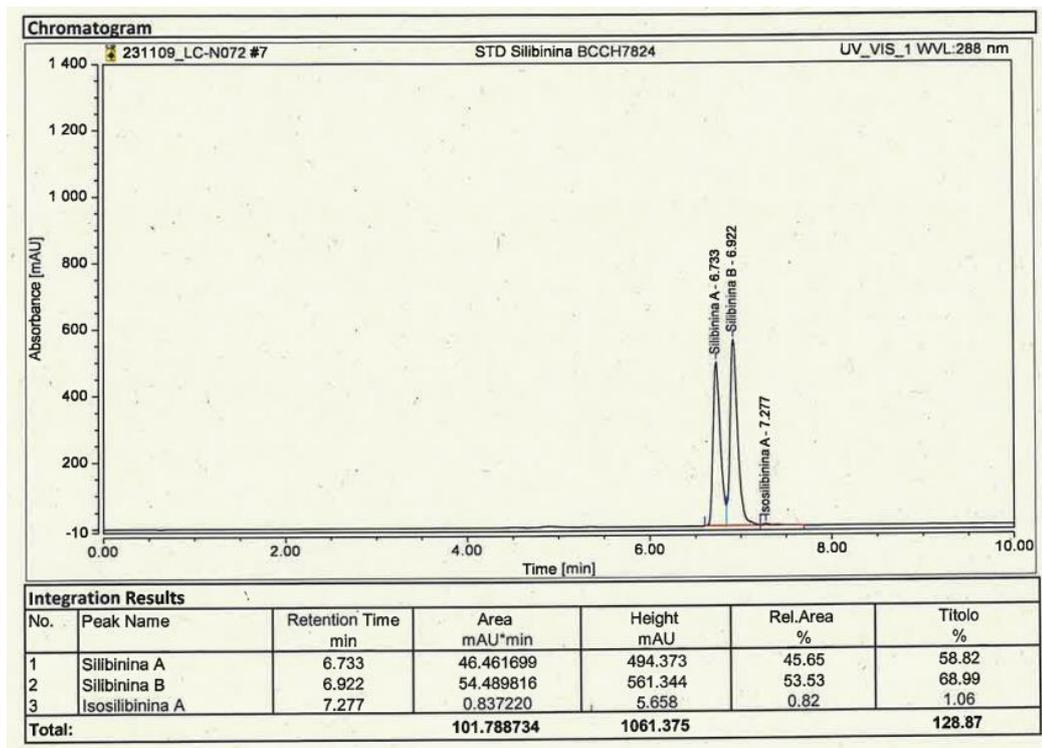


Fig. 4.3.3 Cromatogramma terza misurazione STD silimarina.

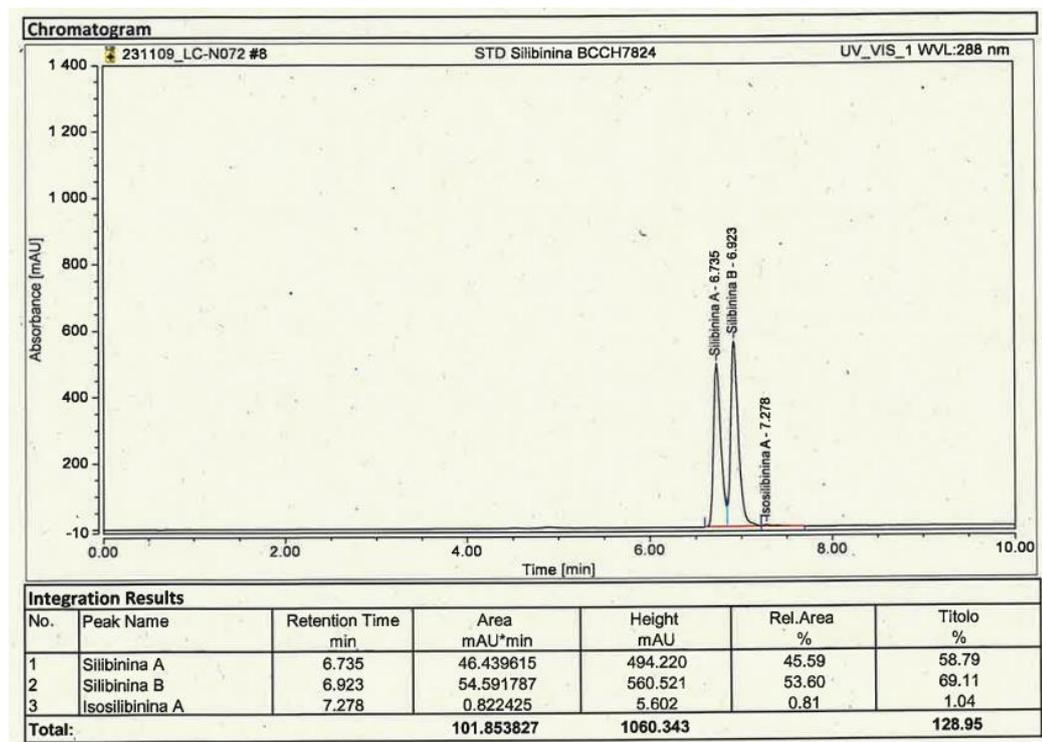


Fig. 4.3.4 Cromatogramma quarta misurazione STD silimarina.

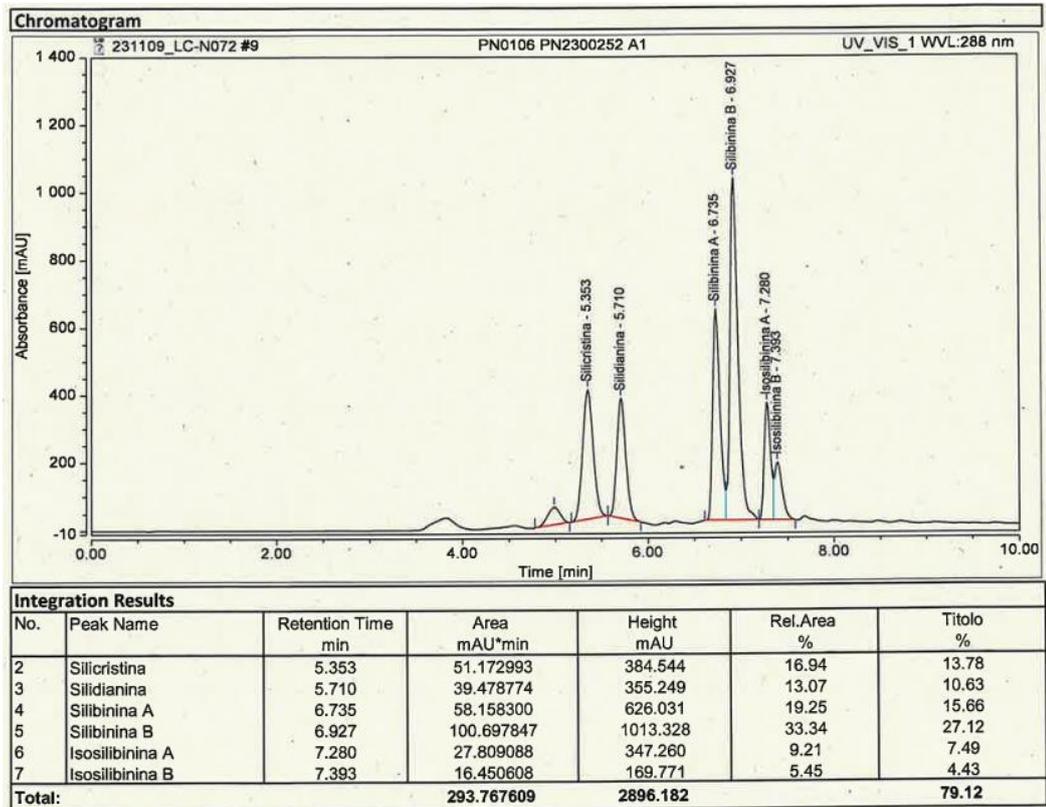


Fig. 4.3.5 Cromatogramma prima misurazione primo campione.

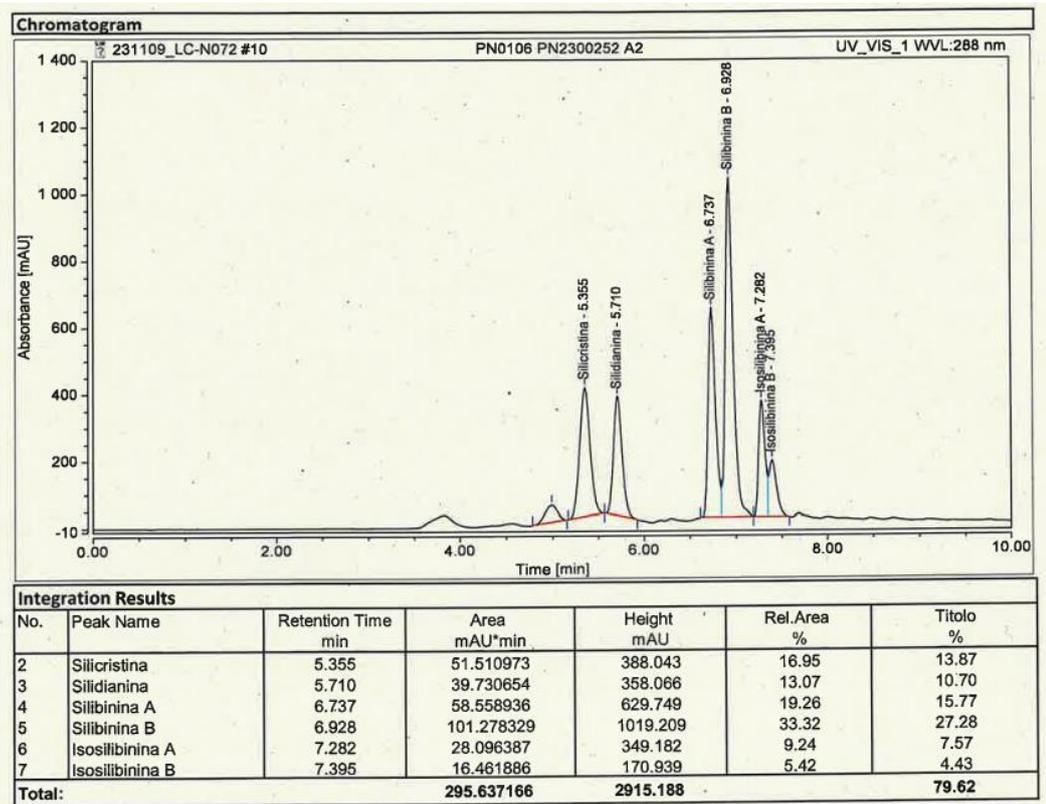


Fig. 4.3.6 Cromatogramma seconda misurazione primo campione.

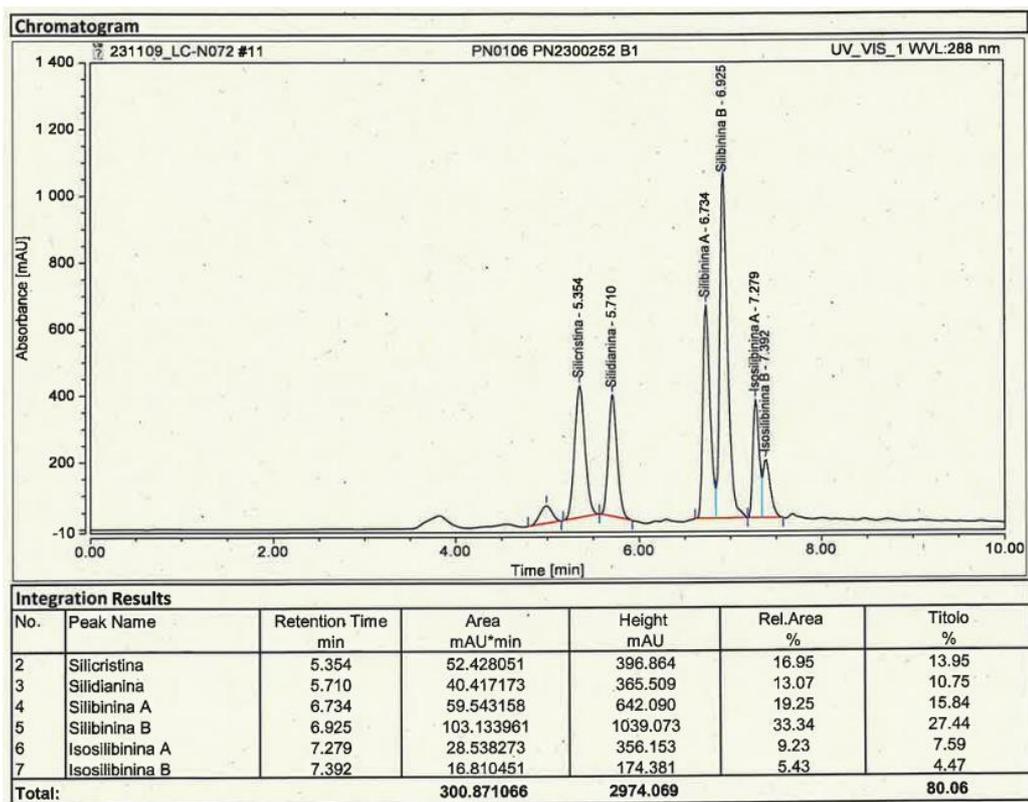


Fig. 4.3.7 Cromatogramma prima misurazione del secondo campione.

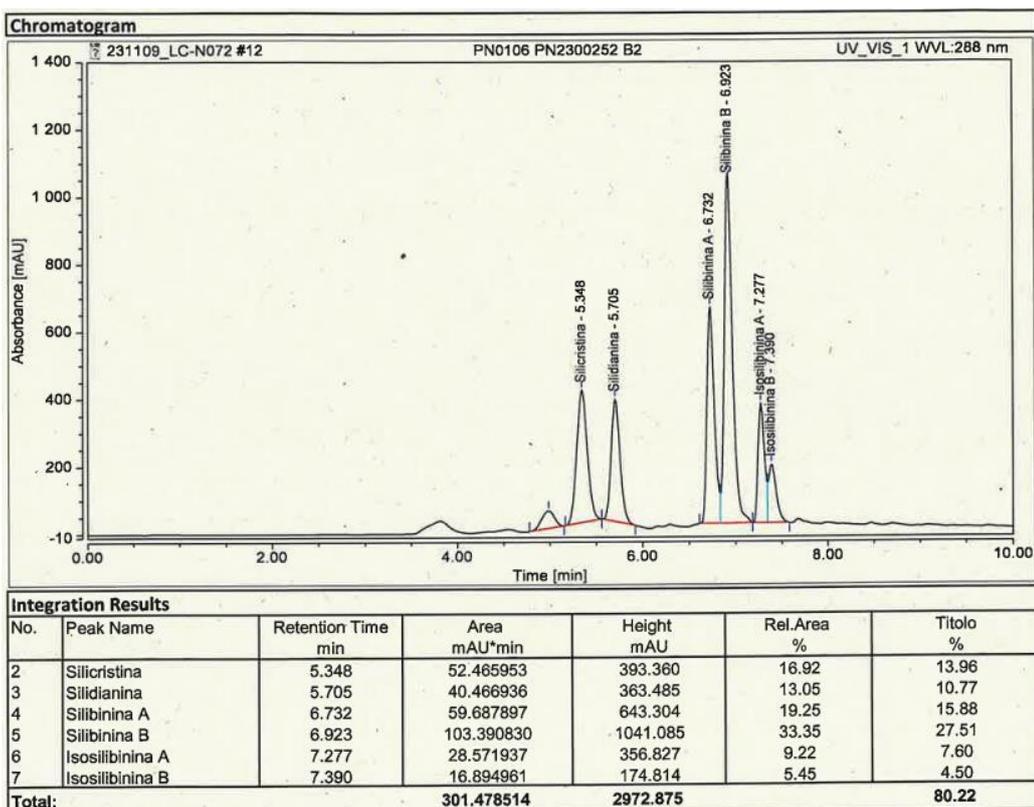


Fig. 4.3.8 Cromatogramma seconda misurazione del secondo campione.

4.4 Determinazione quantitativa dei metalli pesanti (Piombo, Cadmio e Nichel) su materia prima, semilavorato e prodotto finito mediante analisi in ICP-OES

Oltre alle analisi per la titolazione della materia prima, esistono altri test che devono essere effettuati sulla berberina per essere reputata conforme; uno di essi è la ricerca di metalli pesanti.

In questo caso sono stati analizzati due campioni derivanti da un lotto di materia prima di berberina cloruro e iniettati nello strumento per tre misurazioni.

Sono stati utilizzati un bianco e quattro standard per calibrare lo strumento e negli spazi successivi sono stati inseriti i due campioni da analizzare. Il bianco serve a fornire il punto 0 alla curva di calibrazione, avendo una concentrazione pari a 0 mg/L dell'analita in analisi.

Dopo aver processato il bianco e gli standard si è passati ai campioni preparati seguendo la metodologia descritta nel paragrafo 3.6 relativo ai campioni di materia prima.

Per essere conforme il campione deve avere una concentrazione di Pb, Cd e Ni inferiori rispettivamente a 2 mg/L, 1mg/L e 2 mg/L.

Dai risultati ottenuti sia il primo che il secondo campione sono conformi ai limiti massimi, visibili in Fig. 4.4.6 e 4.4.7; il lotto di berberina è perciò da ritenersi conforme e potrà essere utilizzato come componente della miscela dei prodotti finiti.

Replicate Data: Calib Blank 1						
Repl#	Analyte	Net Intensity	Corrected Intensity	Conc.	Calib. Units	Analysis Time
1	Pb 220.353	306,2	306,2	[0,00]	mg/L	15:00:19
1	Cd 228.802	958,1	958,1	[0,00]	mg/L	15:00:45
1	Ni 231.604	3588,6	3588,6	[0,00]	mg/L	15:01:13
2	Pb 220.353	301,6	301,6	[0,00]	mg/L	15:00:28
2	Cd 228.802	1006,2	1006,2	[0,00]	mg/L	15:00:54
2	Ni 231.604	3408,1	3408,1	[0,00]	mg/L	15:01:22
3	Pb 220.353	259,2	259,2	[0,00]	mg/L	15:00:36
3	Cd 228.802	942,4	942,4	[0,00]	mg/L	15:01:02
3	Ni 231.604	3575,9	3575,9	[0,00]	mg/L	15:01:30

Mean Data: Calib Blank 1					
Analyte	Mean Corrected Intensity	Std.Dev.	RSD	Conc.	Calib Units
Pb 220.353	289,0	25,90	8,96%	[0,00]	mg/L
Cd 228.802	968,9	33,23	3,43%	[0,00]	mg/L
Ni 231.604	3524,2	100,74	2,86%	[0,00]	mg/L

Fig. 4.4.1 Dati relativi al bianco.

Replicate Data: STD 1 0.001 ppm						
Repl#	Analyte	Net Intensity	Corrected Intensity	Conc.	Calib. Units	Analysis Time
1	Pb 220.353	379,2	90,1	[0,001]	mg/L	15:03:27
1	Cd 228.802	2261,9	1293,0	[0,001]	mg/L	15:03:58
1	Ni 231.604	4358,8	834,6	[0,001]	mg/L	15:04:23
2	Pb 220.353	373,1	84,0	[0,001]	mg/L	15:03:37
2	Cd 228.802	2294,6	1325,8	[0,001]	mg/L	15:04:05
2	Ni 231.604	4336,7	812,5	[0,001]	mg/L	15:04:32
3	Pb 220.353	286,5	-2,6	[0,001]	mg/L	15:03:46
3	Cd 228.802	2304,2	1335,3	[0,001]	mg/L	15:04:13
3	Ni 231.604	4375,2	851,0	[0,001]	mg/L	15:04:40

Mean Data: STD 1 0.001 ppm						
Analyte	Mean Corrected Intensity	Std.Dev.	RSD	Conc.	Calib. Units	
Pb 220.353	57,2	51,85	90,65%	[0,001]	mg/L	
Cd 228.802	1318,0	22,20	1,68%	[0,001]	mg/L	
Ni 231.604	832,7	19,36	2,32%	[0,001]	mg/L	

Fig. 4.4.2 Standard concentrazione 0.001 mg/L.

Replicate Data: STD 2 0.01 ppm						
Repl#	Analyte	Net Intensity	Corrected Intensity	Conc.	Calib. Units	Analysis Time
1	Pb 220.353	1398,1	1109,0	[0,01]	mg/L	15:06:37
1	Cd 228.802	14183,4	13214,6	[0,01]	mg/L	15:07:08
1	Ni 231.604	9638,2	6114,0	[0,01]	mg/L	15:07:34
2	Pb 220.353	1309,4	1020,4	[0,01]	mg/L	15:06:48
2	Cd 228.802	14060,0	13091,1	[0,01]	mg/L	15:07:16
2	Ni 231.604	9444,5	5920,2	[0,01]	mg/L	15:07:42
3	Pb 220.353	1312,1	1023,1	[0,01]	mg/L	15:06:57
3	Cd 228.802	14039,7	13070,8	[0,01]	mg/L	15:07:23
3	Ni 231.604	9604,0	6079,8	[0,01]	mg/L	15:07:49

Mean Data: STD 2 0.01 ppm						
Analyte	Mean Corrected Intensity	Std.Dev.	RSD	Conc.	Calib. Units	
Pb 220.353	1050,8	50,43	4,80%	[0,01]	mg/L	
Cd 228.802	13125,5	77,81	0,59%	[0,01]	mg/L	
Ni 231.604	6038,0	103,41	1,71%	[0,01]	mg/L	

Fig. 4.4.3 Standard concentrazione 0.01 mg/L.

Replicate Data: STD 3 0.1 ppm						
Repl#	Analyte	Net Intensity	Corrected Intensity	Conc.	Calib. Units	Analysis Time
1	Pb 220.353	10103,8	9814,8	[0,1]	mg/L	15:09:47
1	Cd 228.802	122025,9	121057,0	[0,1]	mg/L	15:10:14
1	Ni 231.604	56798,6	53274,4	[0,1]	mg/L	15:10:37
2	Pb 220.353	10427,8	10138,8	[0,1]	mg/L	15:09:56
2	Cd 228.802	123305,5	122336,7	[0,1]	mg/L	15:10:21
2	Ni 231.604	59640,2	56116,0	[0,1]	mg/L	15:10:45
3	Pb 220.353	10428,8	10139,8	[0,1]	mg/L	15:10:04
3	Cd 228.802	125643,2	124674,4	[0,1]	mg/L	15:10:28
3	Ni 231.604	59269,1	55744,8	[0,1]	mg/L	15:10:53

Mean Data: STD 3 0.1 ppm						
Analyte	Mean Corrected Intensity	Std.Dev.	RSD	Conc.	Calib. Units	
Pb 220.353	10031,1	187,37	1,87%	[0,1]	mg/L	
Cd 228.802	122689,3	1834,30	1,50%	[0,1]	mg/L	
Ni 231.604	55045,1	1544,67	2,81%	[0,1]	mg/L	

Fig. 4.4.4 Standard concentrazione 0.1 mg/L.

Replicate Data: STD 4 0.5 ppm						
Repl#	Analyte	Net Intensity	Corrected Intensity	Conc.	Calib. Units	Analysis Time
1	Pb 220.353	55115,8	54826,7	[0,5]	mg/L	15:12:51
1	Cd 228.802	704502,6	703533,7	[0,5]	mg/L	15:13:16
1	Ni 231.604	291941,9	288417,7	[0,5]	mg/L	15:13:27
2	Pb 220.353	55859,6	55570,5	[0,5]	mg/L	15:12:59
2	Cd 228.802	671443,1	670474,3	[0,5]	mg/L	15:13:19
2	Ni 231.604	300272,2	296747,9	[0,5]	mg/L	15:13:31
3	Pb 220.353	55170,2	54881,2	[0,5]	mg/L	15:13:06
3	Cd 228.802	687239,5	686270,6	[0,5]	mg/L	15:13:22
3	Ni 231.604	292004,5	288480,3	[0,5]	mg/L	15:13:35

Mean Data: STD 4 0.5 ppm						
Analyte	Mean Corrected Intensity	Std.Dev.	RSD	Conc.	Units	Calib
Pb 220.353	55092,8	414,61	0,75%	[0,5]	mg/L	
Cd 228.802	686759,5	16535,16	2,41%	[0,5]	mg/L	
Ni 231.604	291215,3	4791,49	1,65%	[0,5]	mg/L	

Fig. 4.4.5 Standard concentrazione 0.5 mg/L.

Replicate Data: PN0032 PN2300134 A								
Repl#	Analyte	Net Intensity	Corrected Intensity	Conc.	Calib. Units	Conc.	Sample Units	Analysis Time
1	Pb 220.353	611,0	322,0	0,005	mg/L	0,511	mg/kg	15:18:35
1	Cd 228.802	2828,5	1859,6	0,004	mg/L	0,378	mg/kg	15:19:05
1	Ni 231.604	11044,9	7520,7	0,014	mg/L	1,391	mg/kg	15:19:33
2	Pb 220.353	516,5	227,5	0,004	mg/L	0,426	mg/kg	15:18:45
2	Cd 228.802	2741,1	1772,2	0,004	mg/L	0,372	mg/kg	15:19:14
2	Ni 231.604	11104,1	7579,9	0,014	mg/L	1,401	mg/kg	15:19:41
3	Pb 220.353	525,5	236,5	0,004	mg/L	0,434	mg/kg	15:18:55
3	Cd 228.802	2786,5	1817,6	0,004	mg/L	0,375	mg/kg	15:19:22
3	Ni 231.604	11223,4	7699,2	0,014	mg/L	1,422	mg/kg	15:19:49

Mean Data: PN0032 PN2300134 A							
Analyte	Mean Corrected Intensity	Conc. Units	Std.Dev.	Conc. Units	Sample Units	Std.Dev.	RSD
Pb 220.353	262,0	0,005 mg/L	0,0005	0,457 mg/kg		0,0474	10,37%
Cd 228.802	1816,5	0,004 mg/L	0,0000	0,375 mg/kg		0,0032	0,85%
Ni 231.604	7599,9	0,014 mg/L	0,0002	1,405 mg/kg		0,0157	1,11%

Fig. 4.4.6 Analisi primo campione.

Replicate Data: PN0032 PN2300134 B								
Repl#	Analyte	Net Intensity	Corrected Intensity	Conc.	Calib. Units	Conc.	Sample Units	Analysis Time
1	Pb 220.353	671,5	382,5	0,006	mg/L	0,562	mg/kg	15:21:47
1	Cd 228.802	3420,5	2451,6	0,004	mg/L	0,418	mg/kg	15:22:13
1	Ni 231.604	14553,1	11028,9	0,020	mg/L	1,978	mg/kg	15:22:38
2	Pb 220.353	703,9	414,9	0,006	mg/L	0,591	mg/kg	15:21:56
2	Cd 228.802	3471,3	2502,5	0,004	mg/L	0,422	mg/kg	15:22:21
2	Ni 231.604	14484,0	10959,8	0,020	mg/L	1,967	mg/kg	15:22:47
3	Pb 220.353	740,9	451,8	0,006	mg/L	0,624	mg/kg	15:22:03
3	Cd 228.802	3399,7	2430,8	0,004	mg/L	0,416	mg/kg	15:22:28
3	Ni 231.604	14004,7	10480,5	0,019	mg/L	1,885	mg/kg	15:22:54

Mean Data: PN0032 PN2300134 B							
Analyte	Mean Corrected Intensity	Conc. Units	Std.Dev.	Conc. Units	Sample Units	Std.Dev.	RSD
Pb 220.353	416,4	0,006 mg/L	0,0003	0,592 mg/kg		0,0313	5,28%
Cd 228.802	2461,6	0,004 mg/L	0,0000	0,419 mg/kg		0,0027	0,64%
Ni 231.604	10823,1	0,020 mg/L	0,0005	1,943 mg/kg		0,0510	2,62%

Fig. 4.4.7 Analisi secondo campione.

4.5 Test ELISA per ricerca glutine

Una tipologia di analisi molto importante effettuata durante il tirocinio è stato il test ELISA, condotto in particolare per andare a ricercare la presenza di glutine nelle materie prime e nei semilavorati.

Per la preparazione dei campioni e lo svolgimento delle analisi si utilizza il metodo descritto nel paragrafo 3.7.4, riferendosi al procedimento A specifico per il glutine.

Sono state analizzate tre materie prime e tre semilavorati in doppio, pertanto nella tabella sottostante (Fig. 4.5.1) sarà possibile individuare due valori per ogni campione prelevato.

1 ID campione 1						
2 Dati di differenza						
3 Dati di differenza - Media						
4 Conc. singola. (ppm)						
5 Conc. media. (ppm)						
6 Risultati valore soglia						
	1	2	3	4	5	6
A1	0-1	0.0220000	0.0225000	0.0003383	0.0004324	
B1	0-2	0.0230000		0.0005358		
C1	4-1	0.6200000	0.5970000	4.0078207	3.6776493	
D1	4-2	0.5740000		3.3662524		
E1	20-1	1.2220000	1.2005000	23.9060394	22.5988533	
F1	20-2	1.1790000		21.3589294		
G1	80-1	1.6730000	1.6300000	78.3989151	69.6820768	
H1	80-2	1.5870000		62.0425702		
A2	200-1	1.9790000	2.0055000	197.3704333	>Max	
B2	200-2	2.0320000		>Max		
C2	PN2300241-1	0.0590000	0.0620000	0.0257745	0.0292092	Conforme
D2	PN2300241-2	0.0650000		0.0328293		Conforme
E2	PN2300238-1	0.0220000	0.0225000	0.0003383	0.0004324	Conforme
F2	PN2300238-2	0.0230000		0.0005358		Conforme
G2	PN2300243-1	0.0360000	0.0375000	0.0059489	0.0068687	Conforme
H2	PN2300243-2	0.0390000		0.0078441		Conforme
A3	SN230544-1	0.0310000	0.0260000	0.0032995	0.0013396	Conforme
B3	SN230544-2	0.0210000		0.0001802		Conforme
C3	SN230504-1	0.0160000	0.0160000	<Min	<Min	Conforme
D3	SN230504-2	0.0160000		<Min		Conforme
E3	SN230435-1	0.0230000	0.0225000	0.0005358	0.0004324	Conforme
F3	SN230435-2	0.0220000		0.0003383		Conforme

Fig. 4.5.1 Risultati analisi Test ELISA glutine.

Il primo passaggio consiste nel valutare se la curva di calibrazione degli standard è valida, ossia il suo r deve essere $\geq 0,99$.

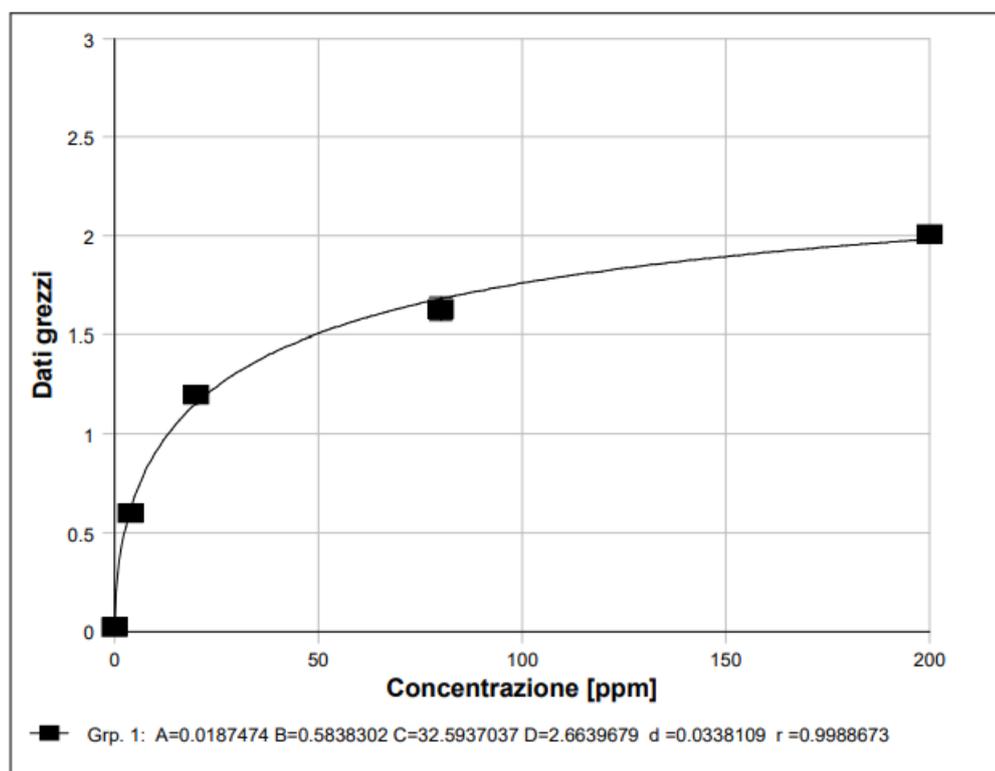


Fig. 4.5.2 Curva di calibrazione Test ELISA.

Come è possibile osservare nella Fig. 4.5.2, $r=0,9988673$, quindi la curva di calibrazione è da reputarsi valida e lo strumento può utilizzarla come riferimento su cui basare i risultati dei campioni.

Da come specificato precedentemente, per poter utilizzare in un prodotto la dicitura “senza glutine”, si deve avere una concentrazione inferiore a 20 ppm.

Nella colonna 5, in Fig. 4.5.1, sono inseriti i dati della concentrazione media di ogni campione analizzato in doppio e, come è possibile rilevare, la concentrazione individuata è inferiore a 20 ppm, sia per i lotti di materia prima che per i lotti di semilavorato. Ciò significa che la procedura di lavaggio dei macchinari utilizzati per la produzione degli integratori in esame è avvenuta correttamente, essendo la contaminazione da glutine inferiore al limite di accettabilità.

4.6 Analisi di stabilità

Per ogni lotto di integratori che viene immesso sul mercato si preleva un campione da utilizzare nelle analisi di stabilità, ossia test condotti per valutare se le caratteristiche descritte in etichetta si mantengono tali fino alla data di scadenza dell'integratore. Per simulare ciò i campioni adibiti a questo tipo di analisi sono conservati ad una temperatura e ad una percentuale di umidità specifiche per il tempo utile a raggiungere la data di scadenza del prodotto. A time points predefiniti, in accordo con le linee guida ICH (International Council for Harmonisation), vengono poi analizzati per valutare se le caratteristiche dell'integratore siano o meno rimaste immutate.

Di norma i time points sono:

- 25°C 60%RH T0, T3, T6, T9, T12, T15, T18, T21, T24;
- 40°C 70%RH T0, T3 e T9.

4.6.1 Stabilità berberina

Nel caso della berberina è stato analizzato un campione conservato a 25°C e umidità pari al 60%RH per 24 mesi. Per la preparazione del campione si sono seguite le indicazioni contenute nel paragrafo 3.3 inerente il prodotto finito.

Come nella parte riguardante la materia prima vengono in primo luogo analizzati gli standard per creare la curva di calibrazione, su cui si basano i risultati ottenuti dalle stabilità.

Dai risultati delle analisi eseguite sul campione contenente berberina cloruro si può notare come, conservato a 25°C 60%RH, la percentuale a 24 mesi mantiene un titolo conforme (da Fig. 4.6.5 a 4.6.8); si può dunque affermare che il prodotto non ha subito modificazioni durante la conservazione.

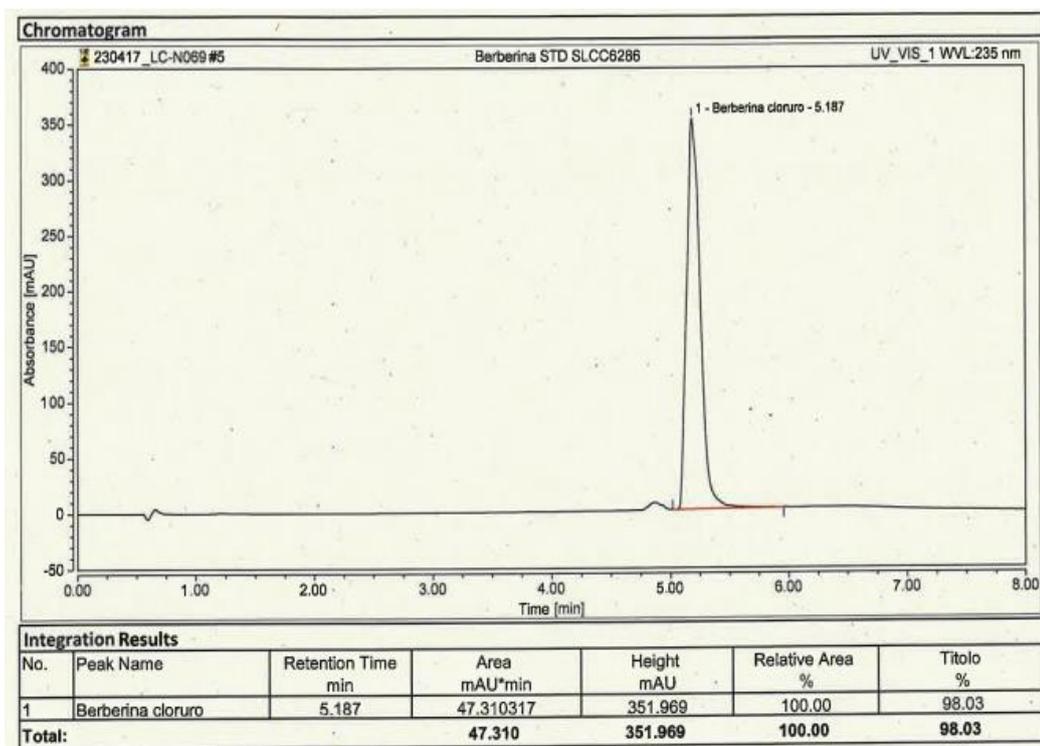


Fig. 4.6.1 Cromatogramma prima misurazione STD stabilità berberina.

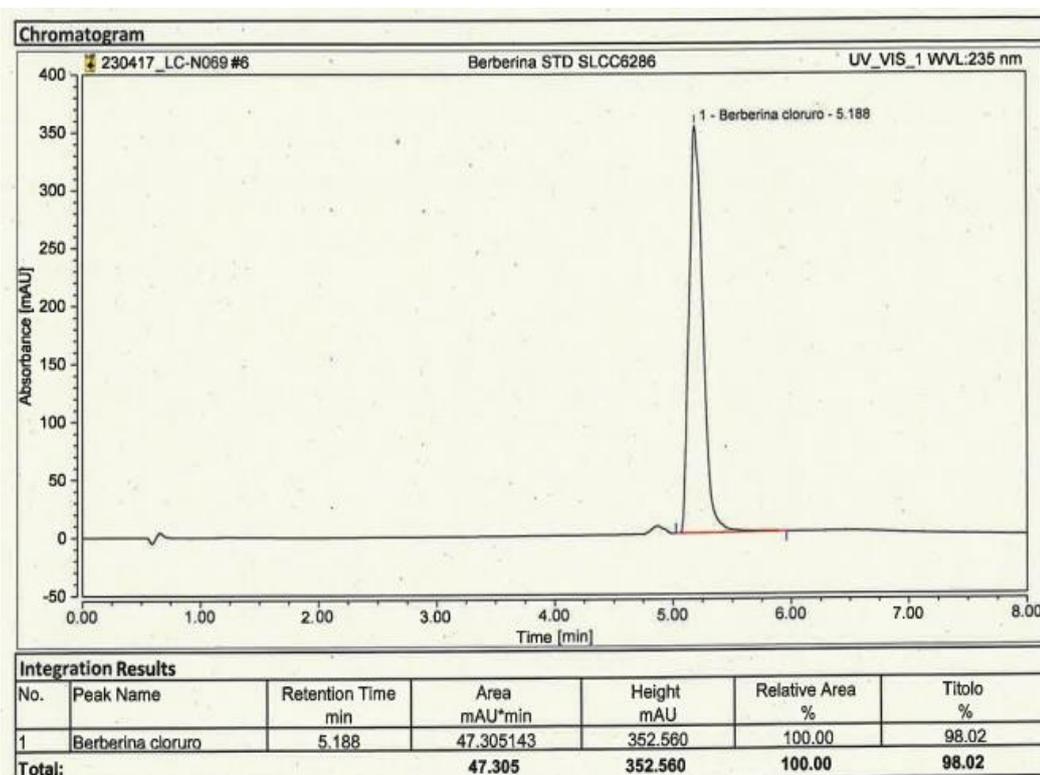


Fig. 4.6.2 Cromatogramma seconda misurazione STD stabilità berberina.

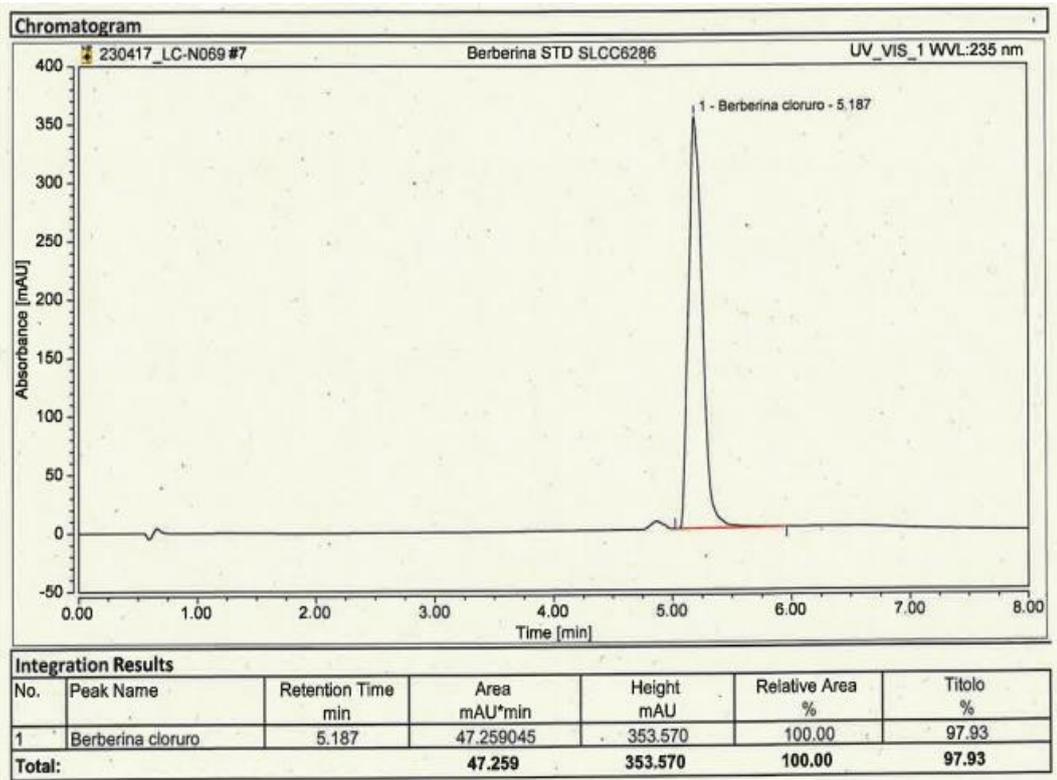


Fig. 4.6.3 Cromatogramma terza misurazione STD stabilità berberina.

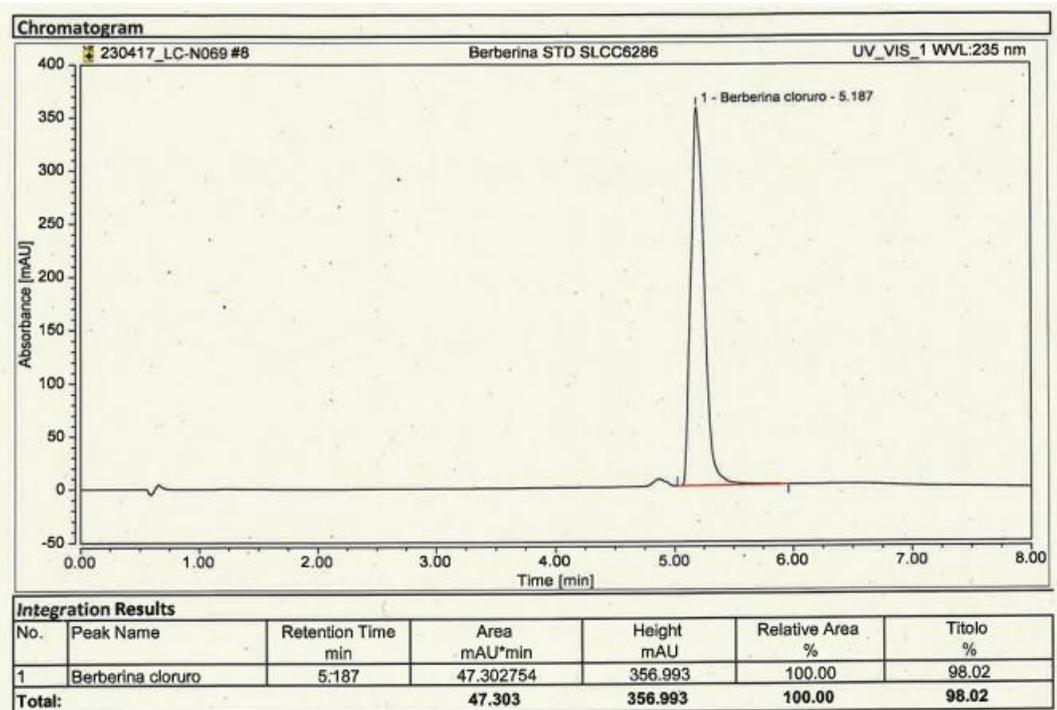


Fig. 4.6.4 Cromatogramma quarta misurazione STD stabilità berberina.

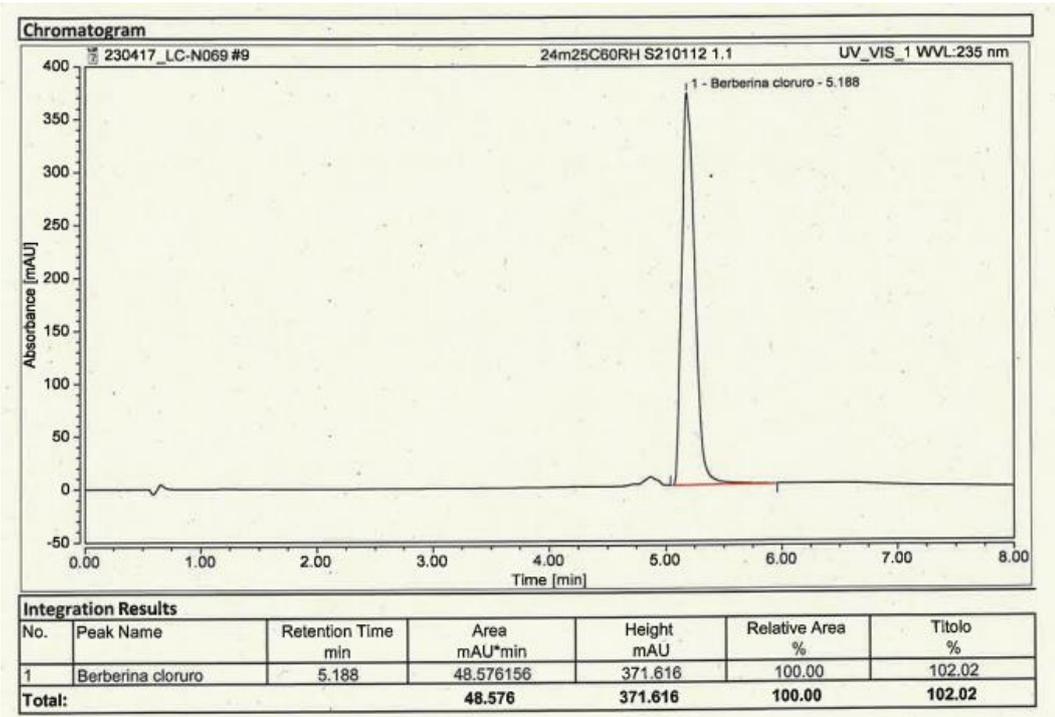


Fig. 4.6.5 Cromatogramma prima misurazione primo campione 25°C 60%RH.

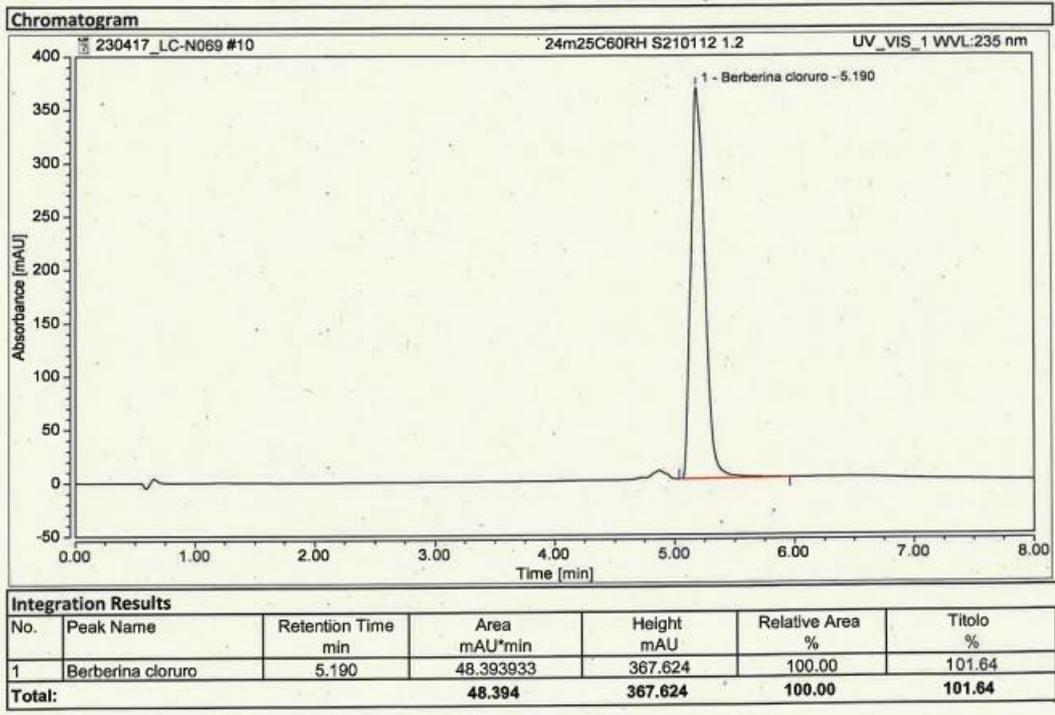


Fig. 4.6.6 Cromatogramma seconda misurazione primo campione 25°C 60%RH.

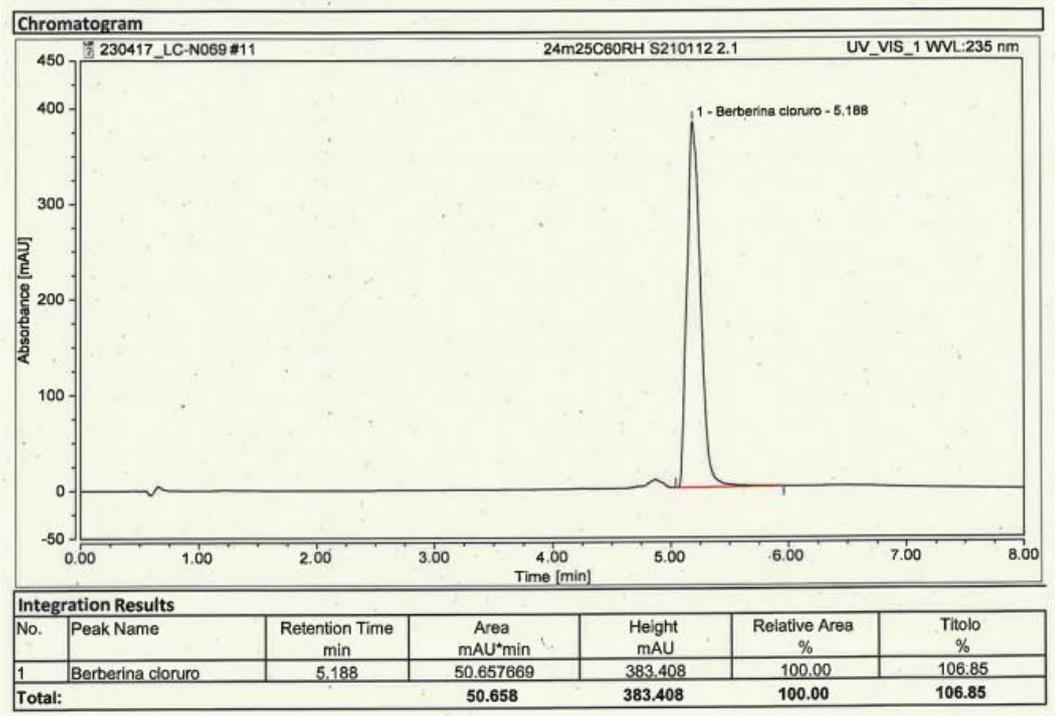


Fig. 4.6.7 Cromatogramma prima misurazione secondo campione 25°C 60%RH.

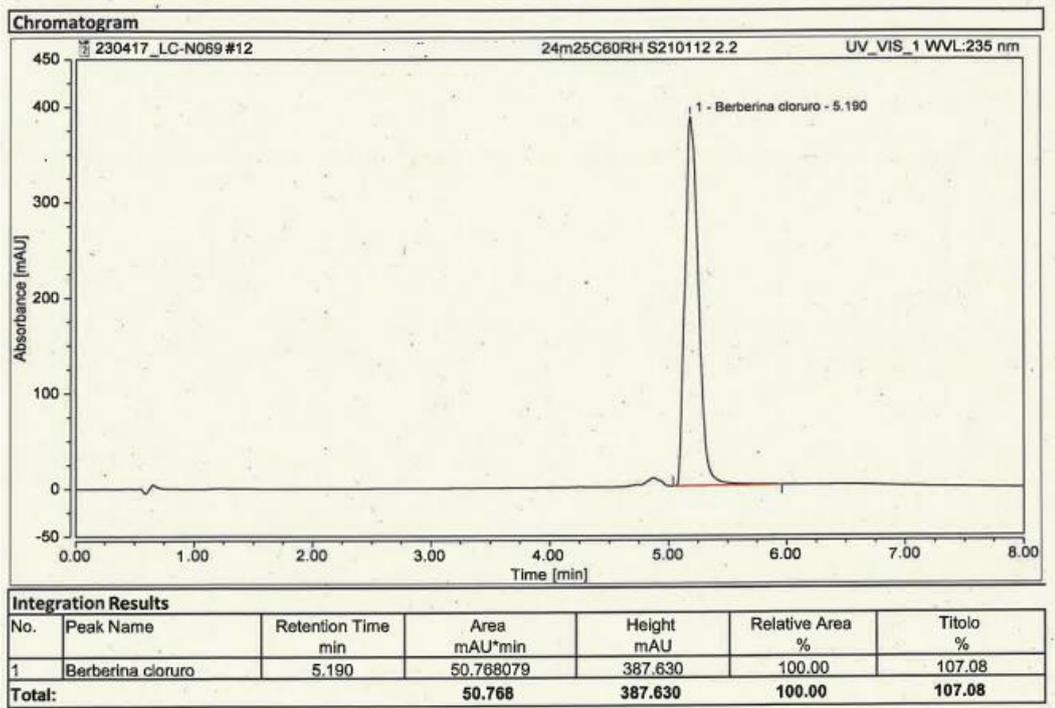


Fig. 4.6.8 Cromatogramma seconda misurazione secondo campione 25°C 60%RH.

4.6.2 Stabilità monacolina K

Nel caso della monacolina K è stato analizzato un campione conservato a 25°C e umidità pari al 60%RH per 18 mesi. Per la preparazione del campione si segue quanto indicato nel paragrafo 3.4 riguardo il prodotto finito.

Come nella procedura relativa alla materia prima vengono analizzati gli standard, al fine di creare la curva di calibrazione su cui si basano i risultati ottenuti dalle stabilità. Dai risultati delle analisi effettuate sul campione contenente monacolina K si può notare come a 18 mesi, conservato a 25°C 60%RH, mantiene un titolo conforme (da Fig. 4.6.13 a Fig. 4.6.16), per cui si può affermare che il prodotto non ha subito modificazioni durante la conservazione.

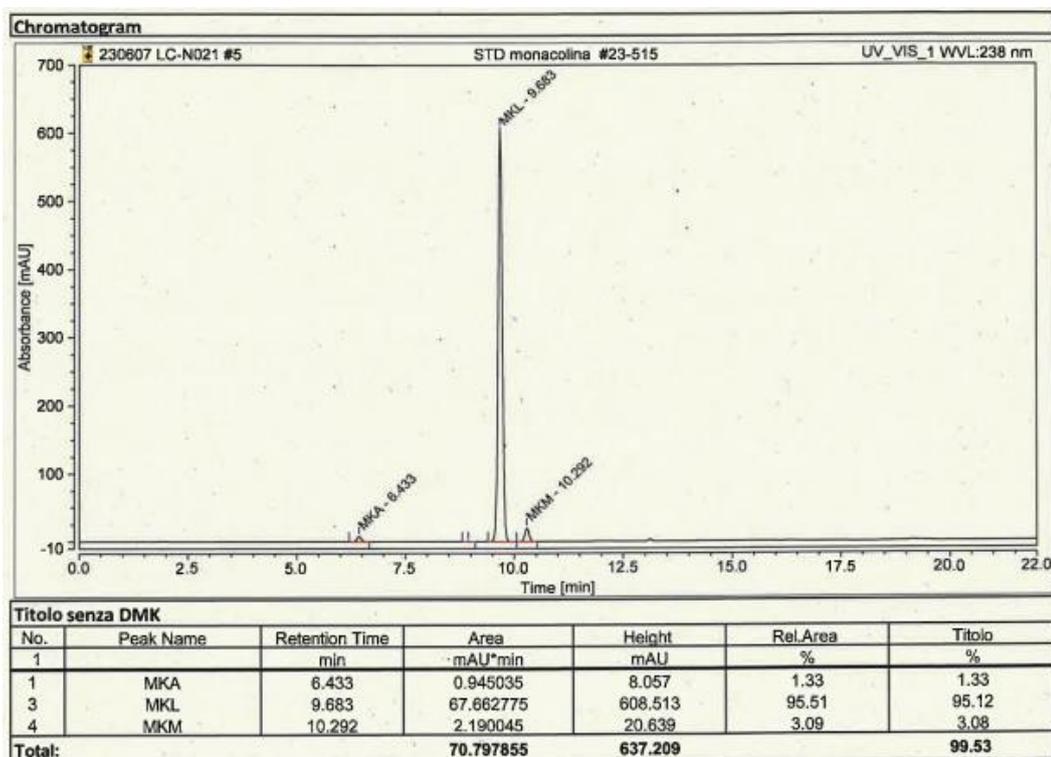


Fig. 4.6.9 Cromatogramma prima misurazione STD stabilità monacolina K.

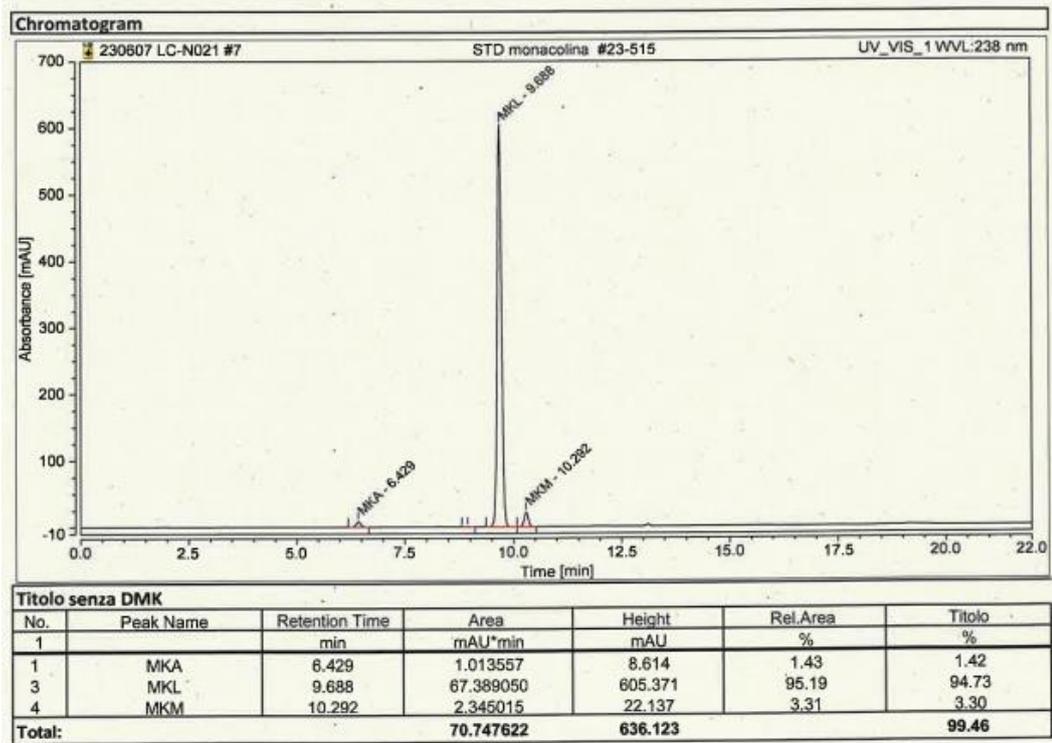


Fig. 4.6.10 Cromatogramma seconda misurazione STD stabilità monocolina K.

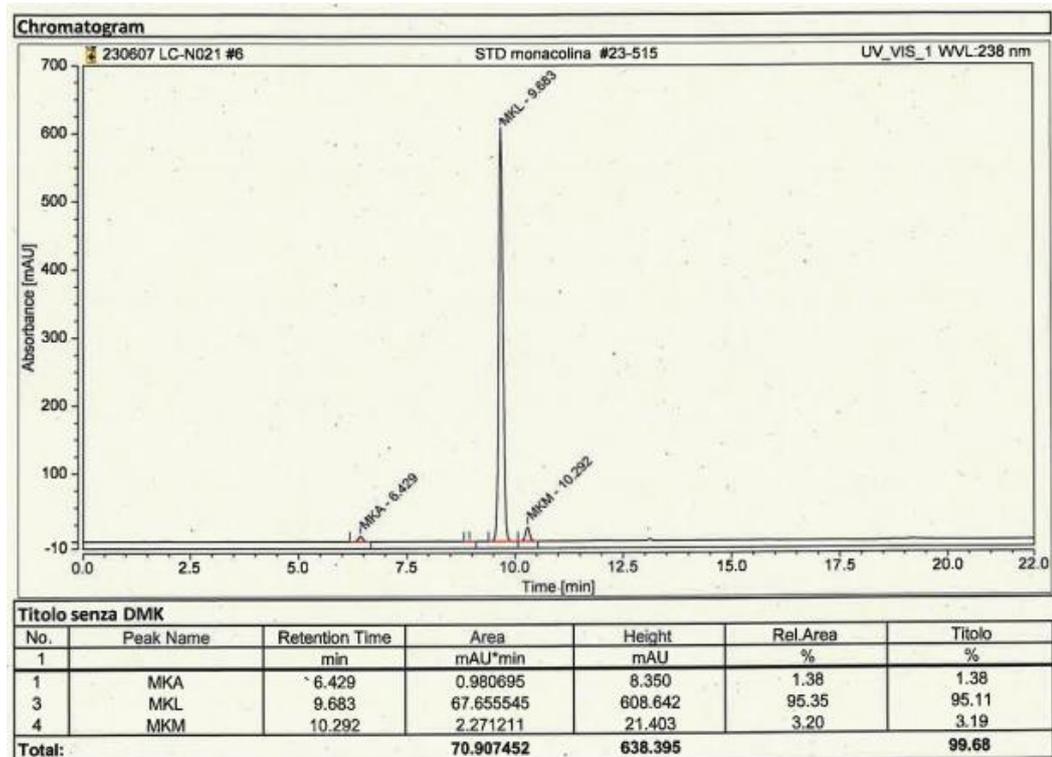


Fig. 4.6.11 Cromatogramma terza misurazione STD stabilità monocolina K.

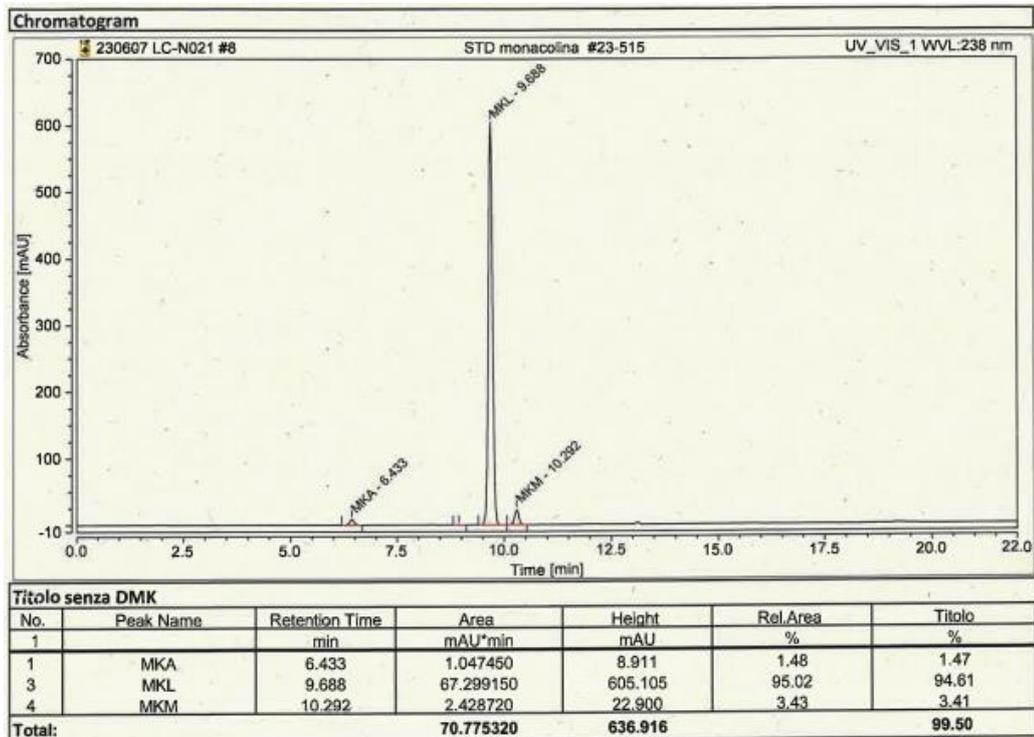


Fig. 4.6.12 Cromatogramma quarta misurazione STD stabilità monocolina K.

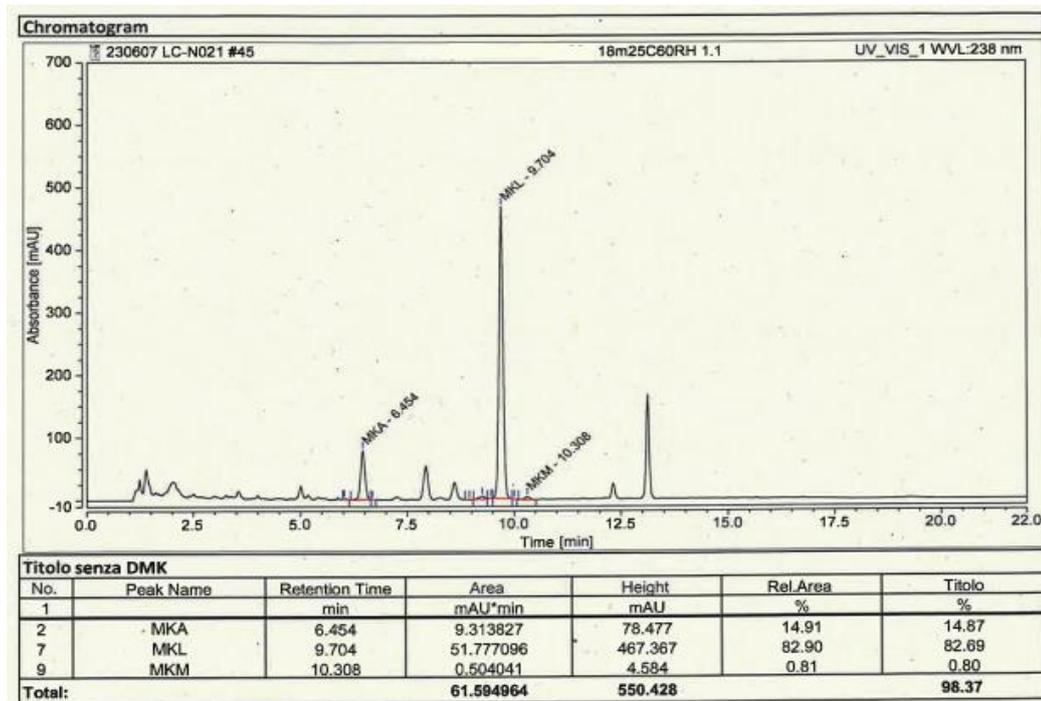


Fig. 4.6.13 Cromatogramma prima misurazione primo campione 25°C 60RH%.

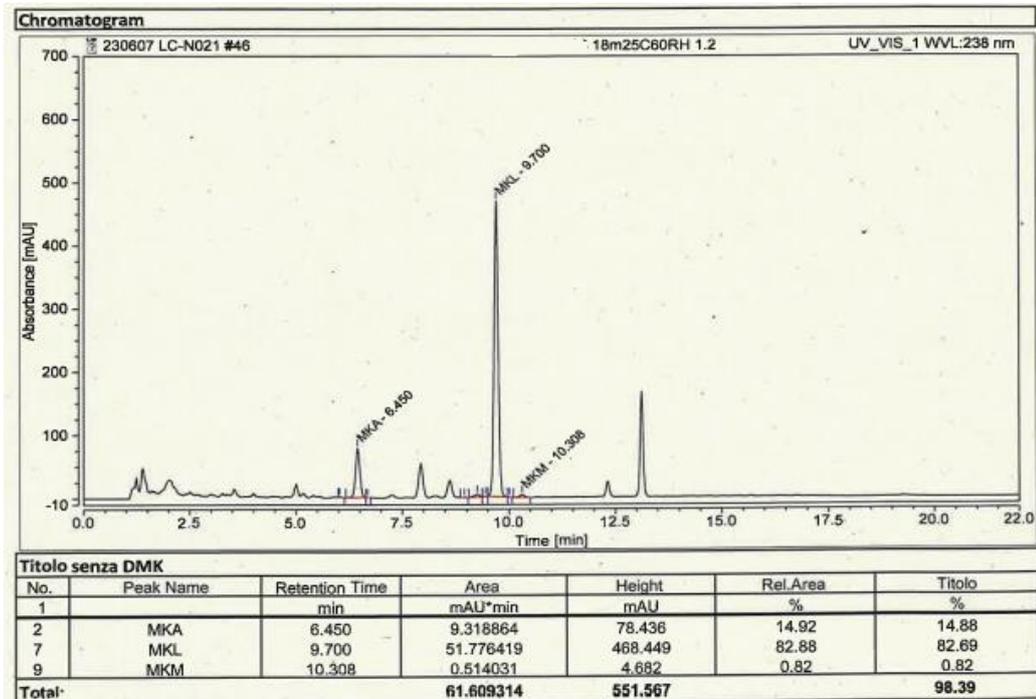


Fig. 4.6.14 Cromatogramma seconda misurazione primo campione 25°C 60%RH.

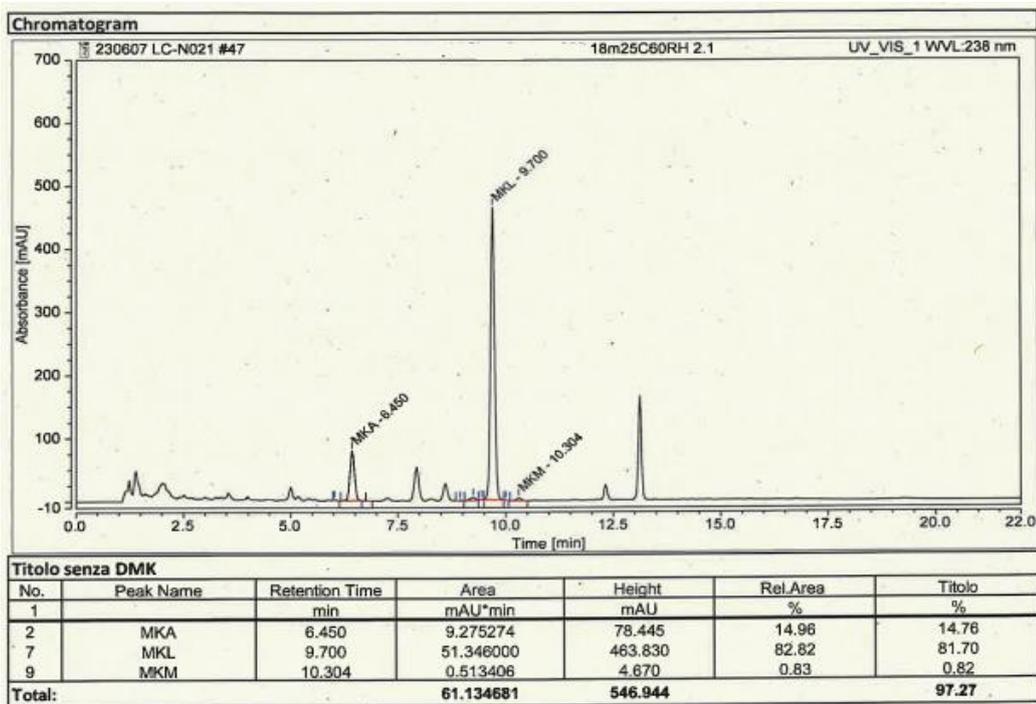


Fig. 4.6.15 Cromatogramma prima misurazione secondo campione 25°C 60%RH.

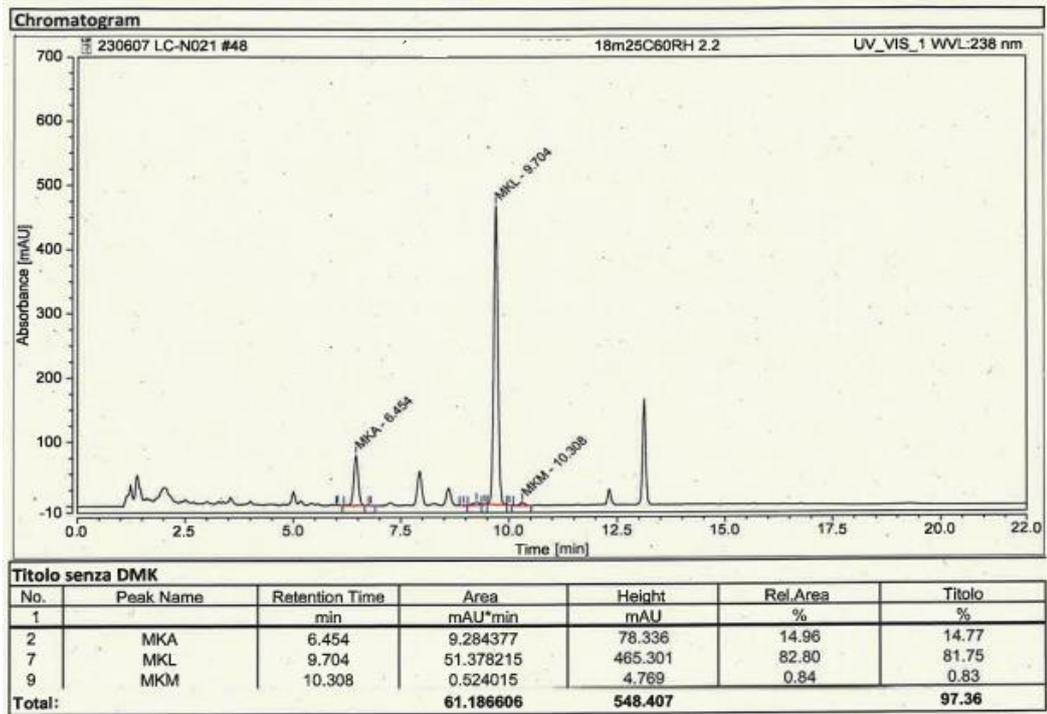


Fig. 4.6.16 Cromatogramma seconda misurazione secondo campione 25°C 60%RH.

4.6.3 Stabilità silimarina

Per quanto riguarda la silimarina è stato possibile analizzare un campione più vasto di prodotti conservati a differenti temperature e umidità per vari mesi.

Come già specificato nei precedenti paragrafi, in primo luogo viene sempre esaminato lo standard.

I primi due prodotti finiti analizzati derivano dallo stesso lotto e sono stati conservati in modalità diverse, per poterne valutare la stabilità in differenti condizioni ambientali. Anche le restanti analisi di stabilità si riferiscono ad uno stesso lotto, i cui campioni sono stati conservati in quattro diverse condizioni.

Il primo campione è un prodotto finito mantenuto alla temperatura di 25°C 60%RH per 24 mesi.

Come visto precedentemente, dal prodotto principale vengono prelevati due campioni e per ogni campione lo strumento effettua due iniezioni.

Nel caso del prodotto finito la percentuale del titolo di silimarina deve essere compresa tra il 70 e il 130%, per cui dall'analisi di stabilità risulta che il prodotto rientra nel range di conformità (da Fig. 4.6.21 a 4.6.24).

Il secondo campione, invece, è stato conservato ad una temperatura di 30°C 75%RH ed anche questo è risultato essere conforme, come da dati rilevati nei cromatogrammi (da Fig. 4.6.25 a Fig. 4.6.28).

Il primo campione del secondo lotto in analisi deriva da un prodotto contenente silimarina che è stato conservato a 25° 60%RH per 6 mesi.

Il valore risultante dai grafici (da Fig. 4.6.29 a Fig. 4.6.32) è compreso nei range di conformità, pertanto il prodotto è risultato stabile.

Il secondo campione del secondo lotto è stato conservato a 30°C, 65%RH, per un periodo di 6 mesi; pur modificando la temperatura e la percentuale di umidità i valori ottenuti sono risultati conformi ai range descritti precedentemente (da Fig. 4.6.33 a Fig. 4.6.36).

Il campione successivo, derivato dallo stesso lotto di produzione, è stato conservato a 30°C, 75%RH, per 6 mesi. Andando ad aumentare ancora la percentuale di umidità non si sono comunque rilevati risultati anomali; anche in questo ambiente il campione è rientrato nei range di conformità (da Fig. 4.6.37 a Fig. 4.6.40).

L'ultima prova effettuata è avvenuta in uno stato di conservazione a 40°C 70%RH per 6 mesi.

Come negli altri casi, dal cromatogramma non risultano alterazioni significative nei titoli della molecola ricercata (da Fig. 4.6.41 a Fig. 4.6.44).

La miscela presa in esame risulta quindi stabile, anche dopo essere stata sottoposta a diverse condizioni di temperatura e umidità in vari time points.

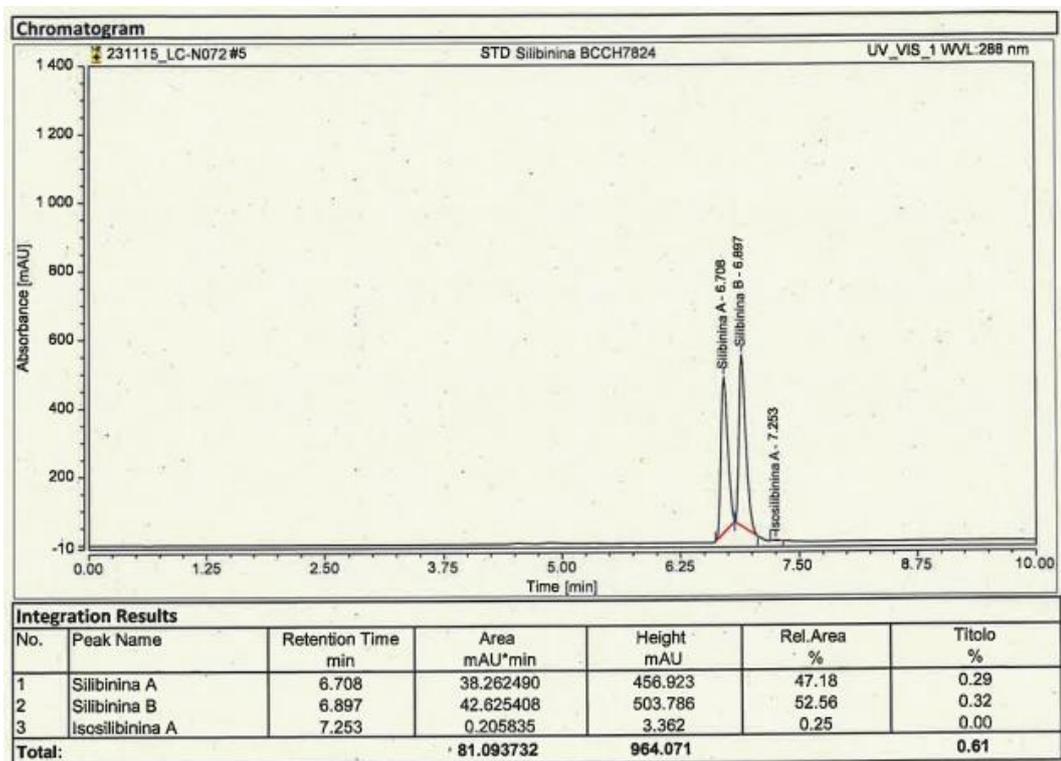


Fig. 4.6.17 Cromatogramma prima misurazione STD stabilità silimarina.

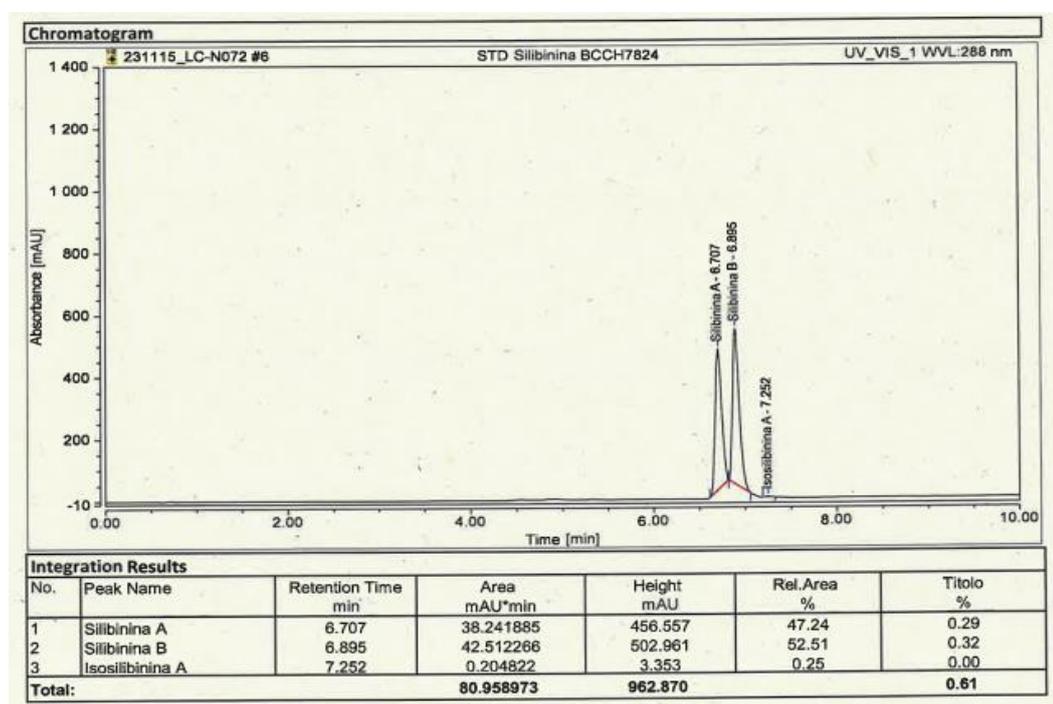


Fig. 4.6.18 Cromatogramma seconda misurazione STD stabilità silimarina.

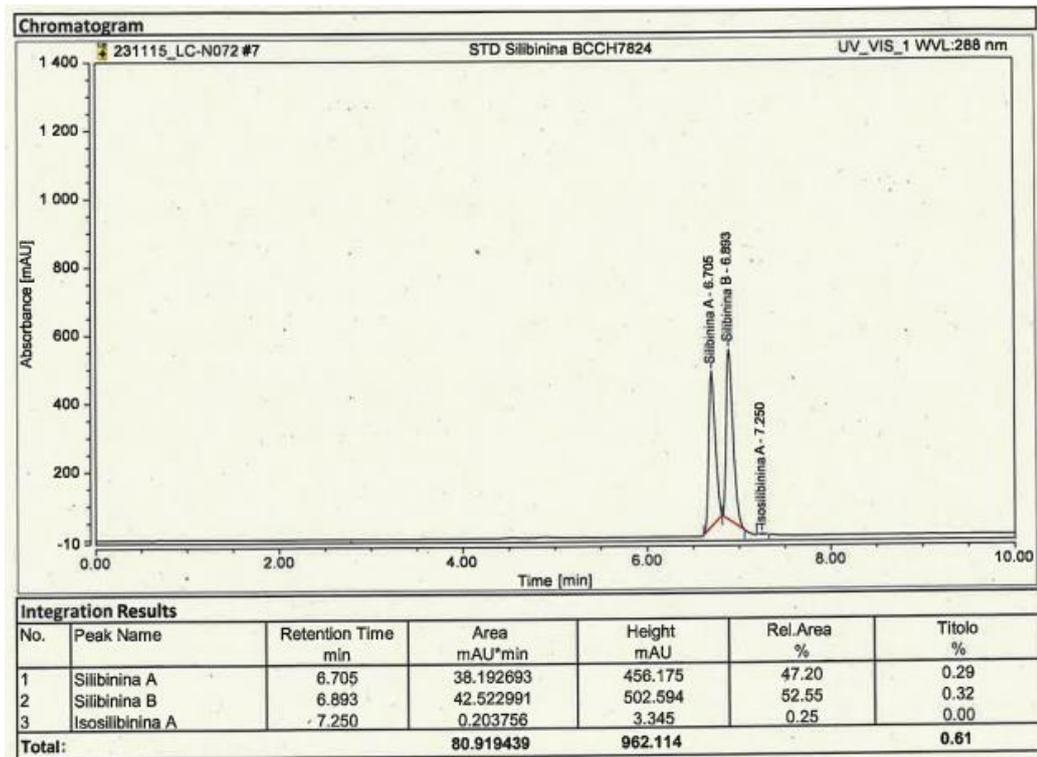


Fig. 4.6.19 Cromatogramma terza misurazione STD stabilit  silimarina.

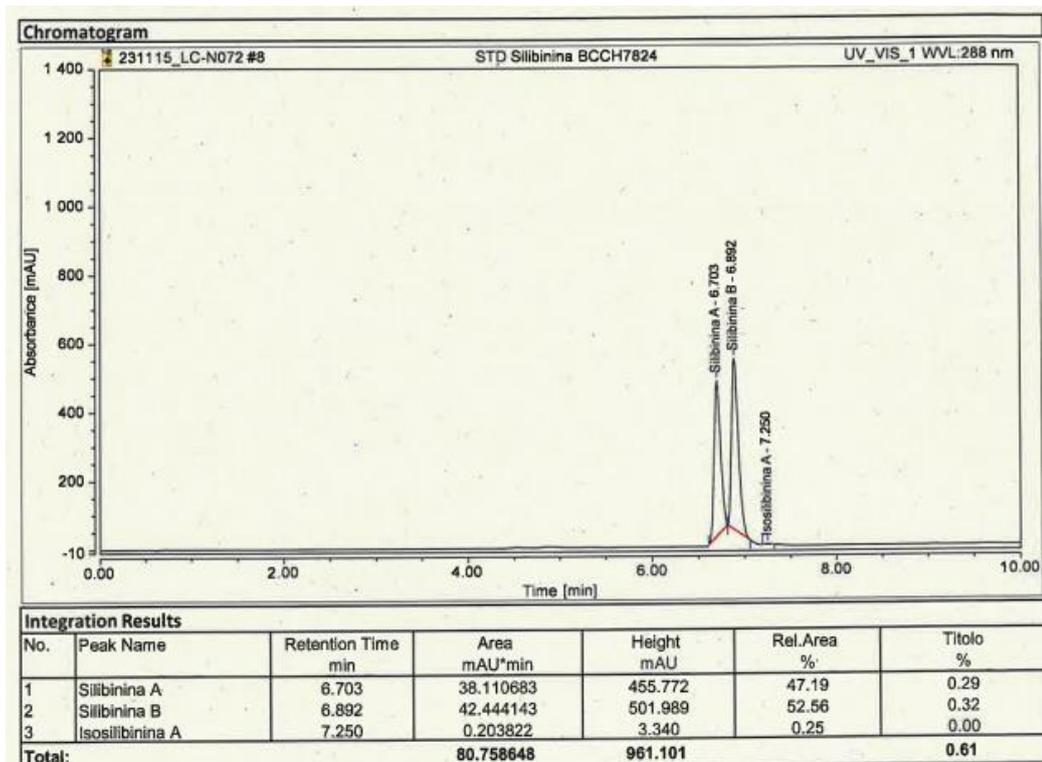


Fig. 4.6.20 Cromatogramma quarta misurazione STD stabilit  silimarina.

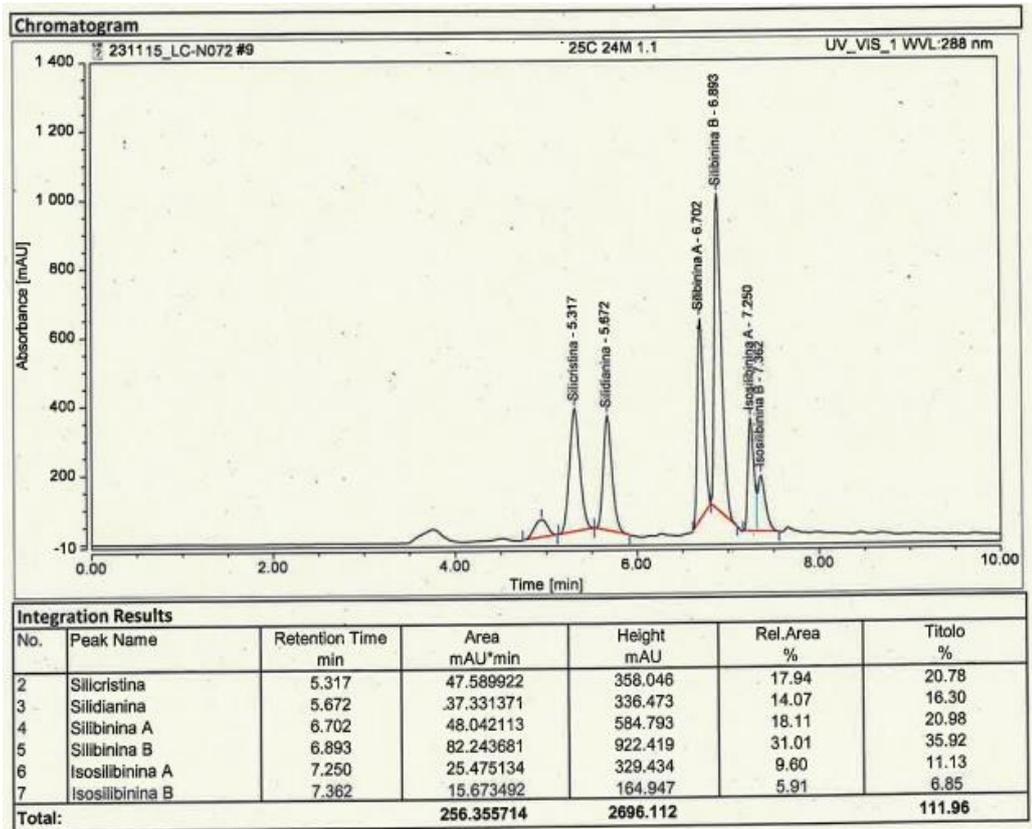


Fig. 4.6.21 Cromatogramma prima misurazione primo campione 25°C 60%RH.

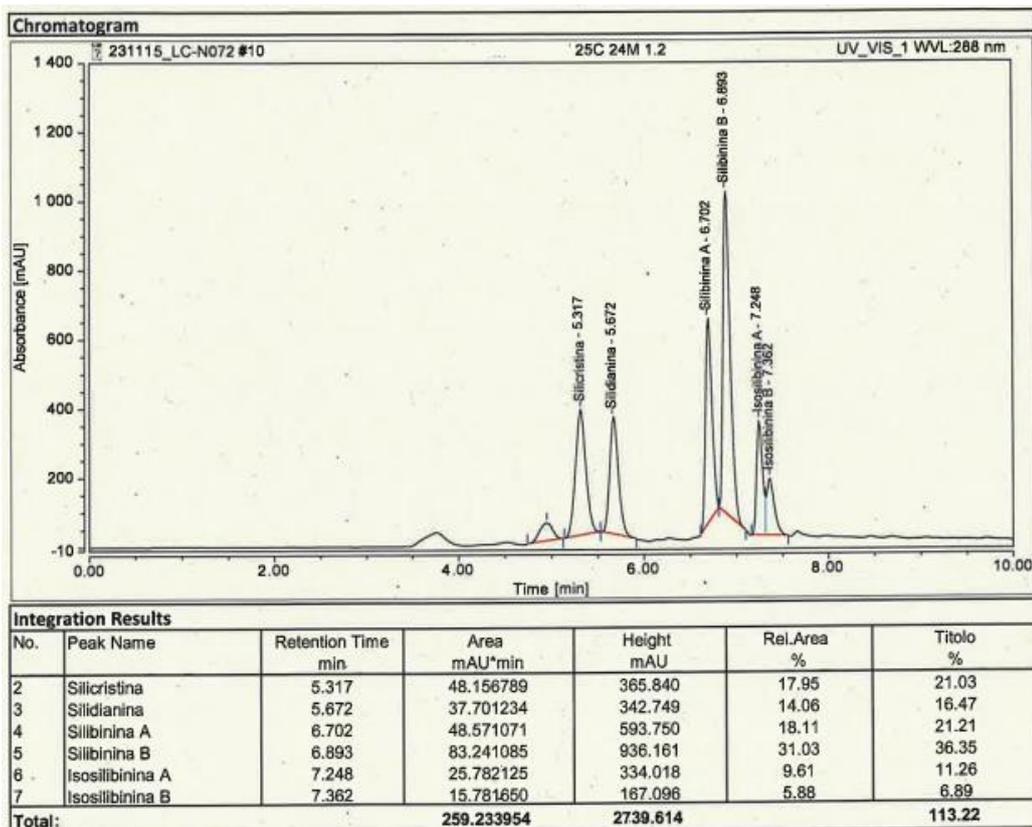


Fig. 4.6.22 Cromatogramma seconda misurazione primo campione 25°C 60%RH.

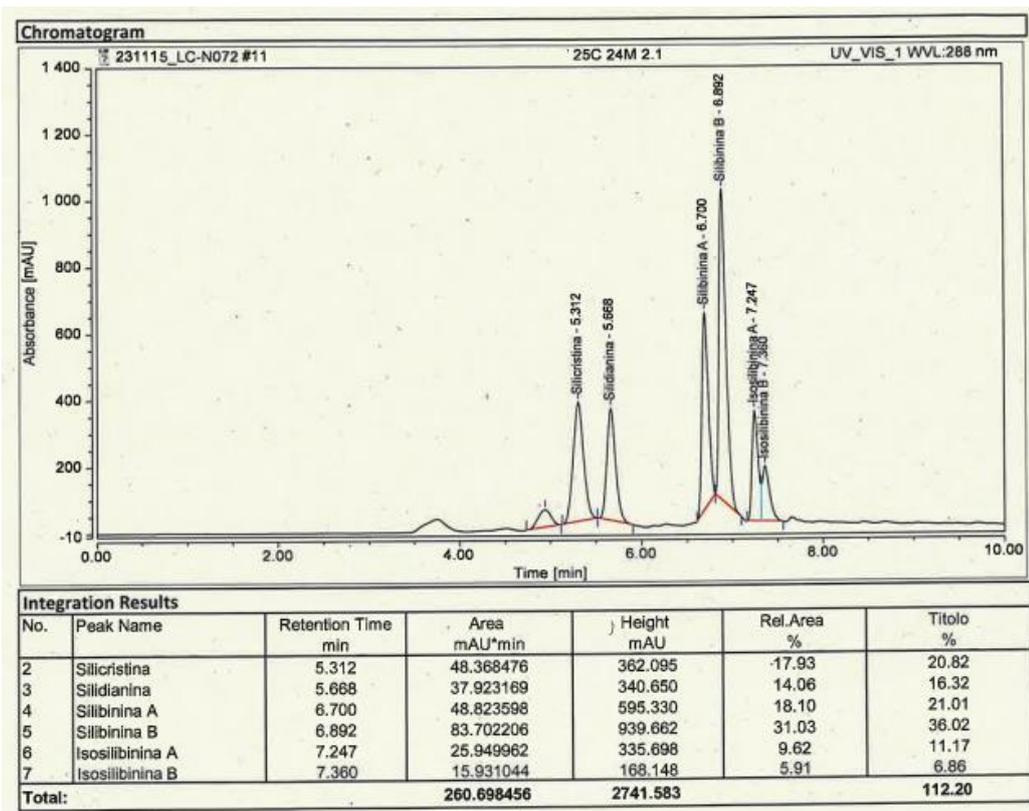


Fig. 4.6.23 Cromatogramma prima misurazione secondo campione 25°C 60%RH.

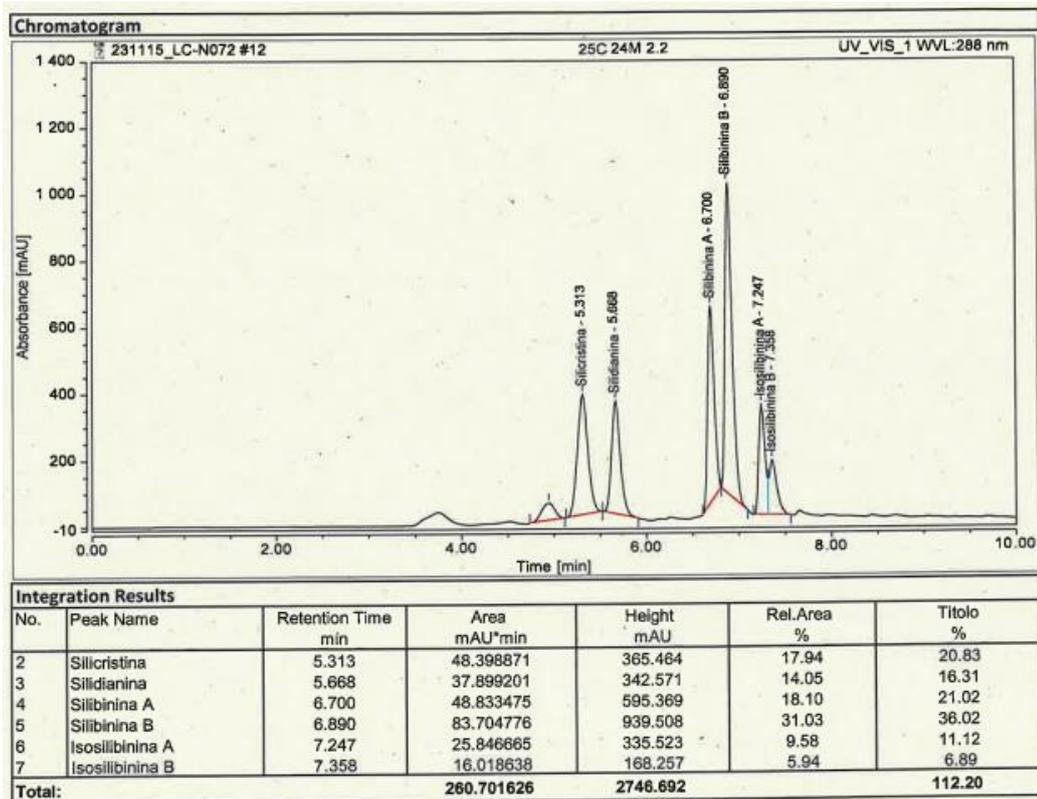


Fig. 4.6.24 Cromatogramma seconda misurazione secondo campione 25°C 60%RH.

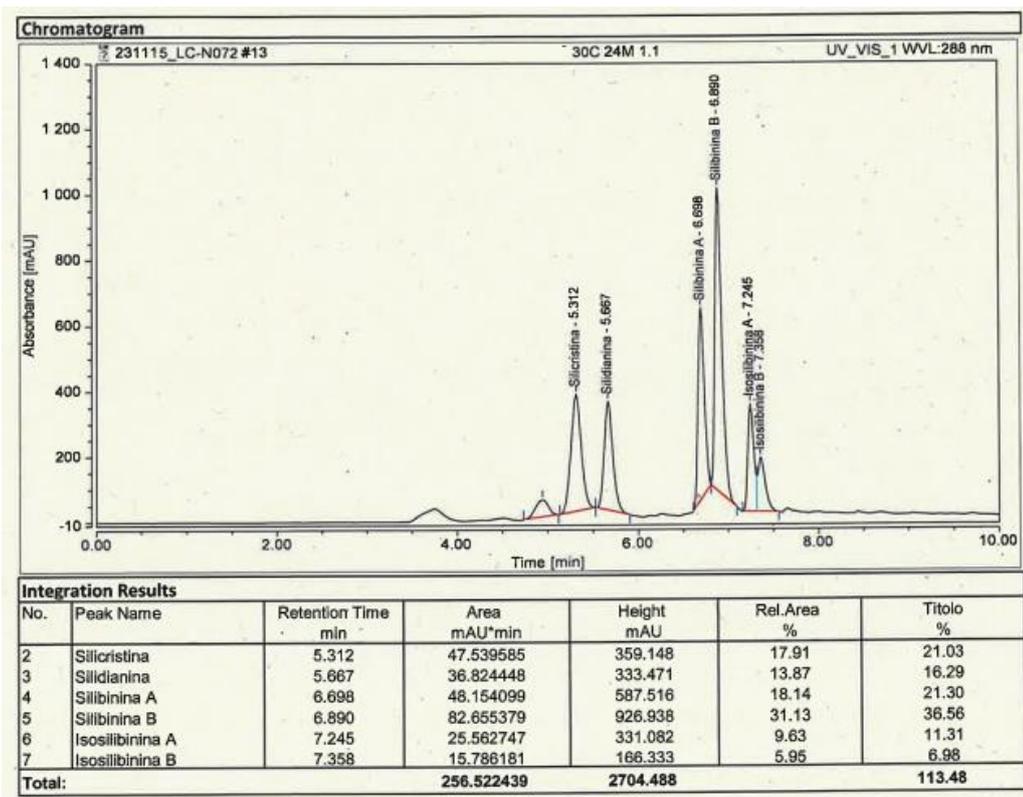


Fig. 4.6.25 Cromatogramma prima misurazione primo campione 30°C 75%RH.

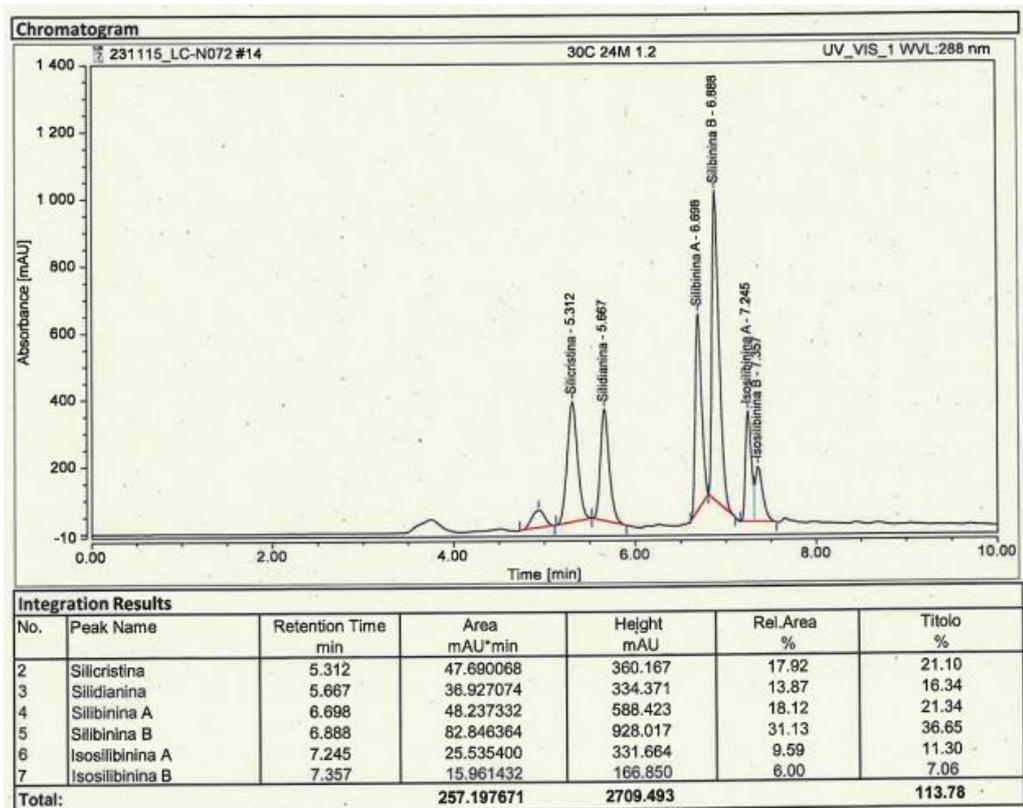


Fig. 4.6.26 Cromatogramma seconda misurazione primo campione 30°C 75%RH.

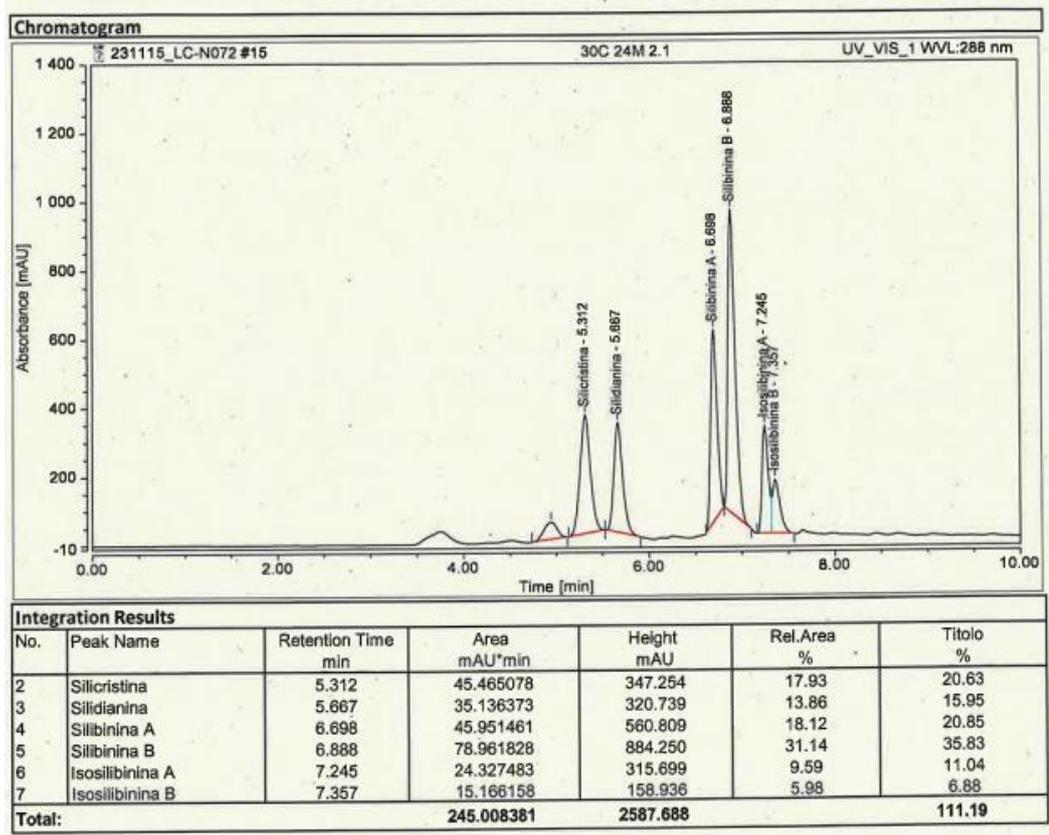


Fig. 4.6.27 Cromatogramma prima misurazione secondo campione 30°C 75%RH.

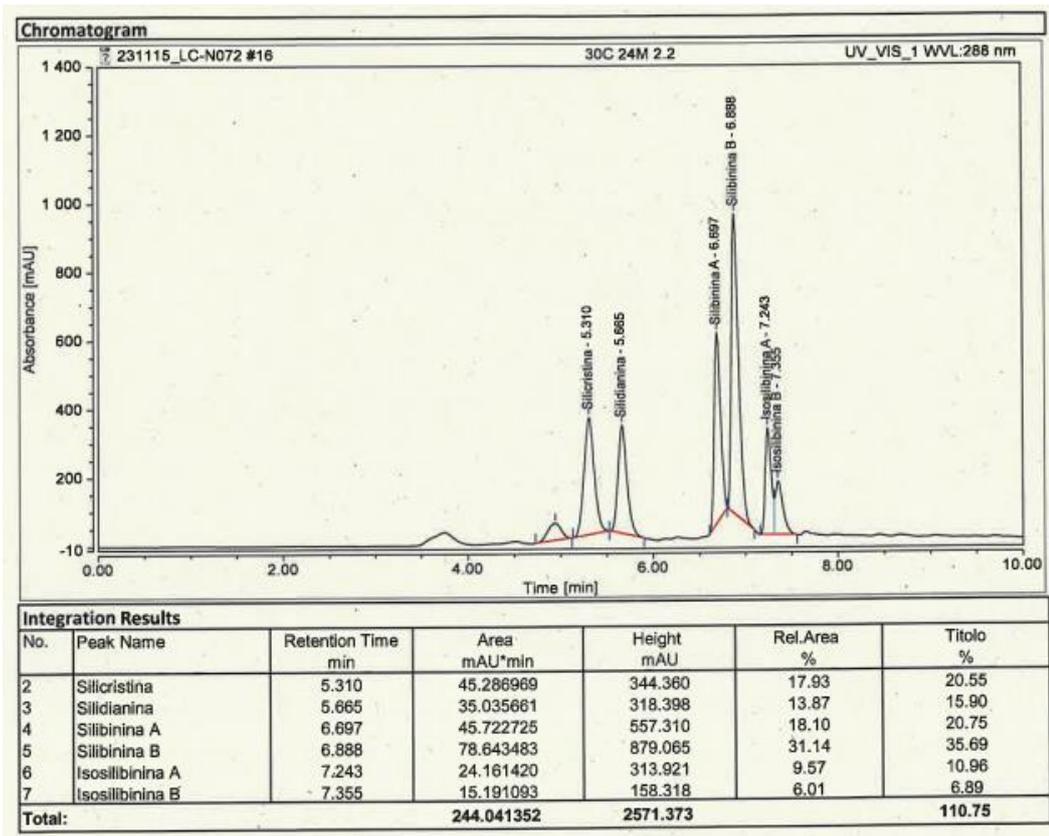


Fig. 4.6.28 Cromatogramma seconda misurazione secondo campione 30°C 75%RH.

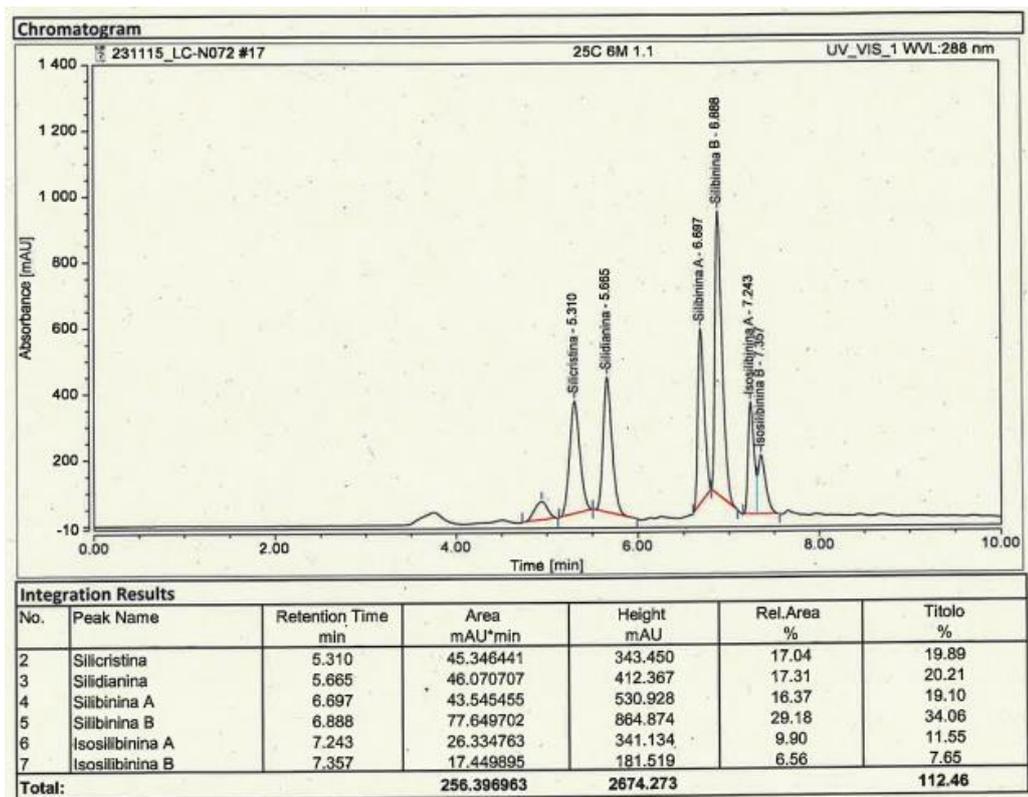


Fig. 4.6.29 Cromatogramma prima misurazione primo campione 25°C 60%RH.

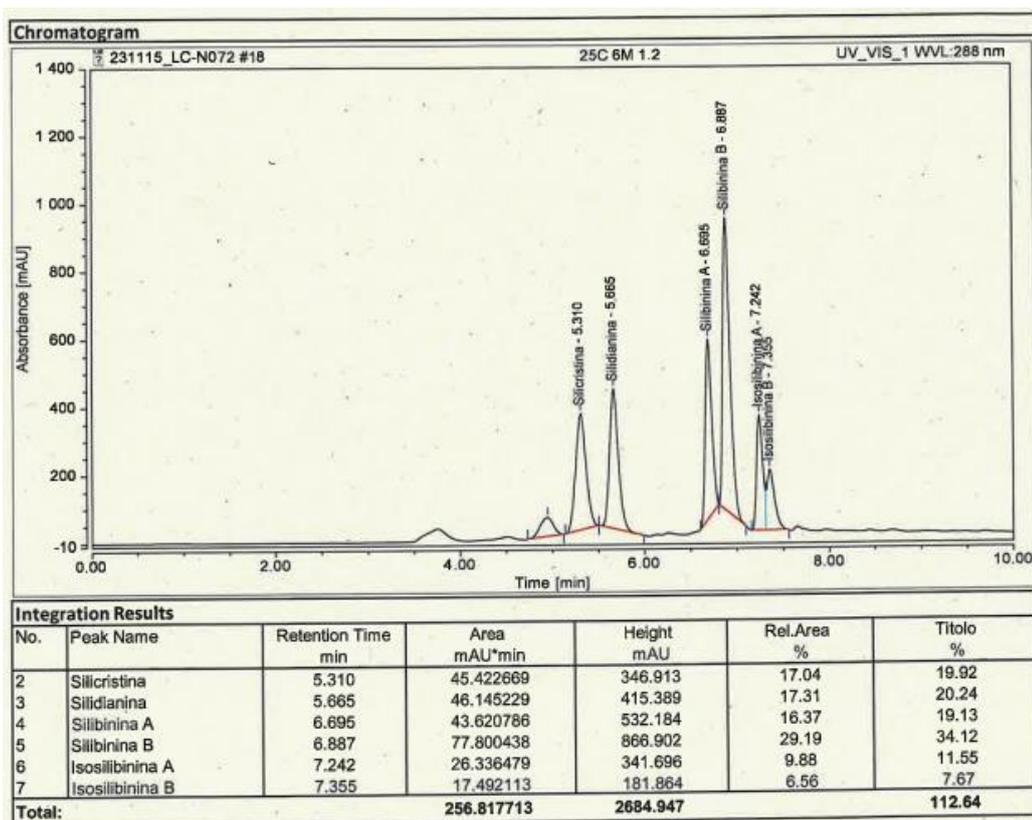


Fig. 4.6.30 Cromatogramma seconda misurazione primo campione 25°C 60%RH.

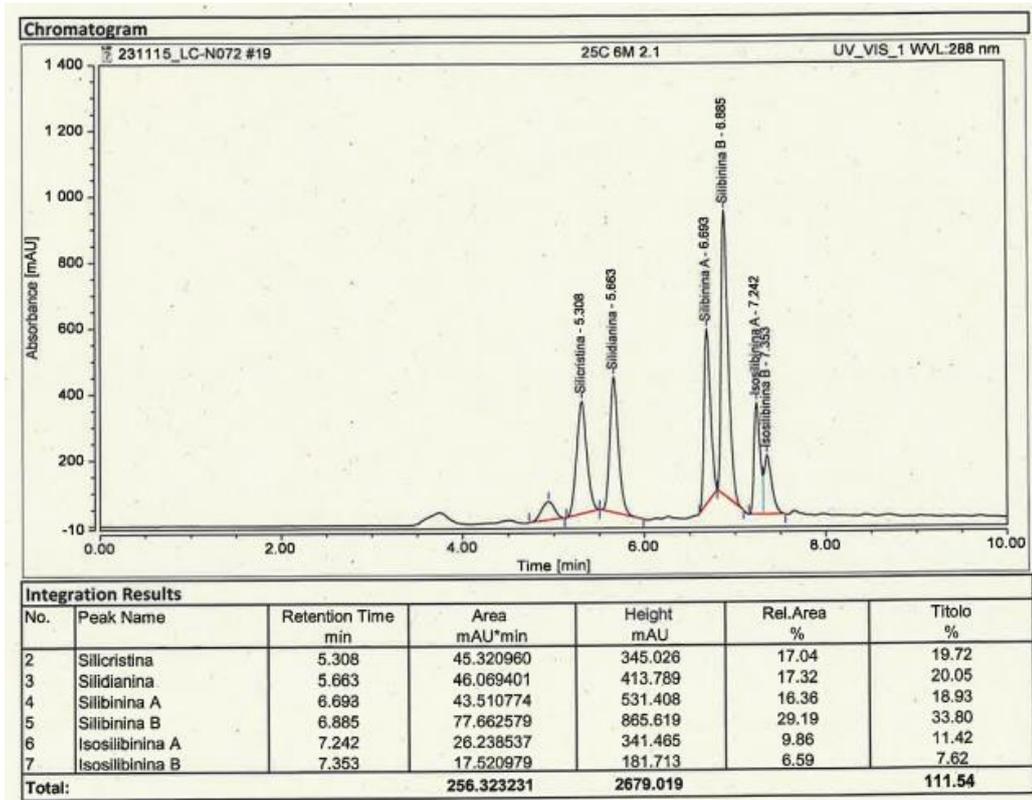


Fig. 4.6.31 Cromatogramma prima misurazione secondo campione 25°C 60%RH.

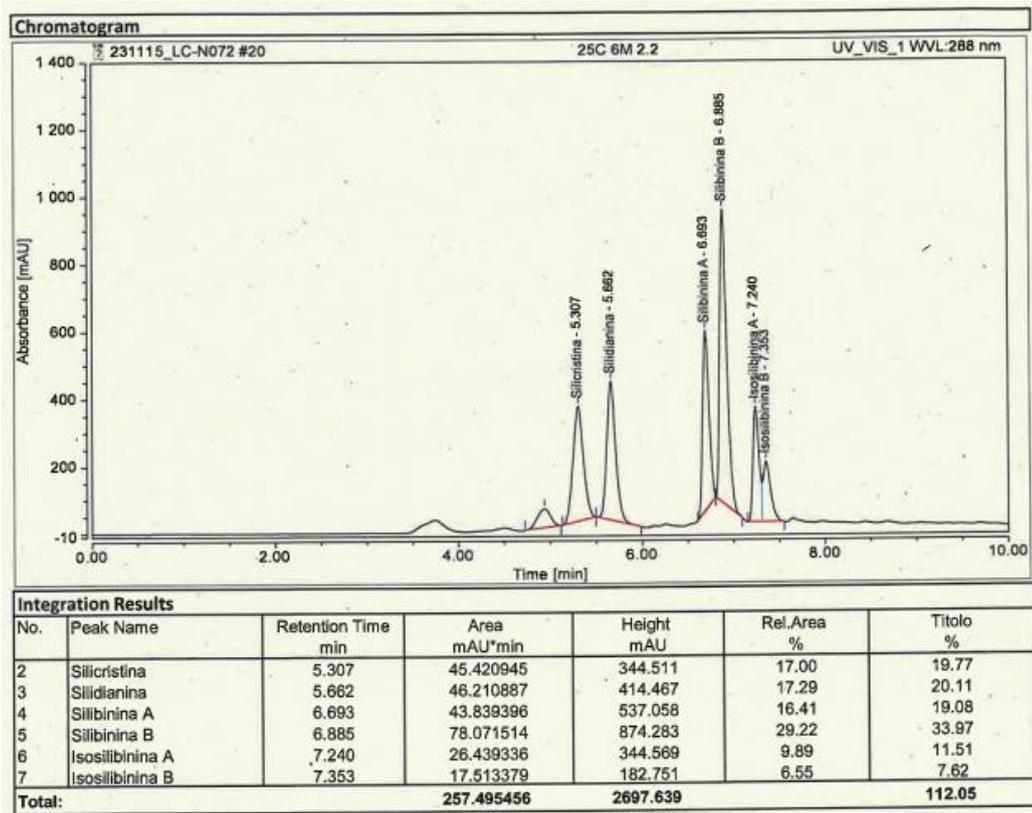


Fig. 4.6.32 Cromatogramma seconda misurazione secondo campione 25°C 60%RH.

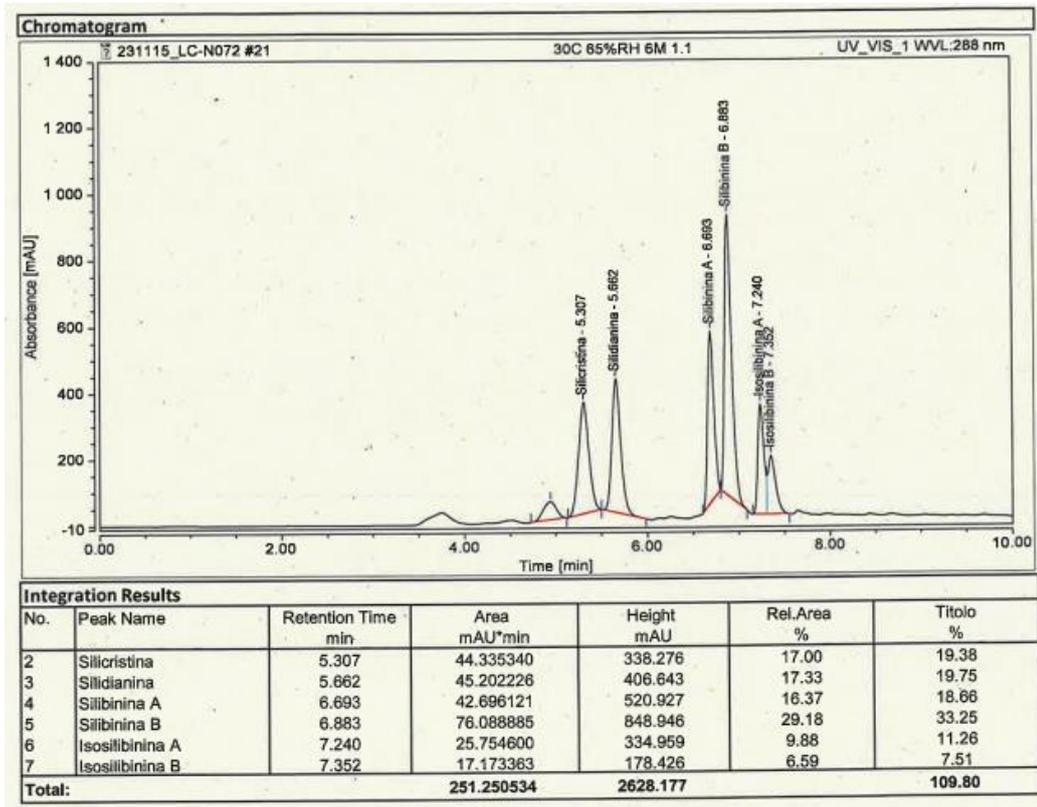


Fig. 4.6.33 Cromatogramma prima misurazione primo campione 30°C 65%RH.

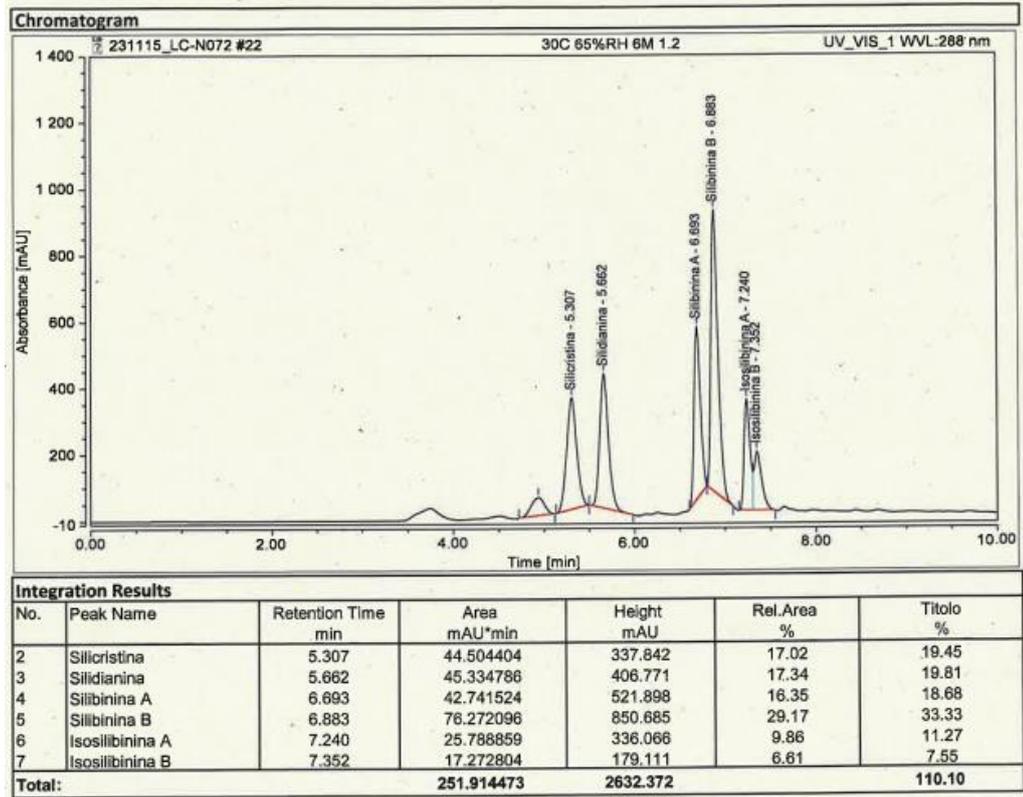


Fig. 4.6.34 Cromatogramma seconda misurazione primo campione 30°C 65%RH.

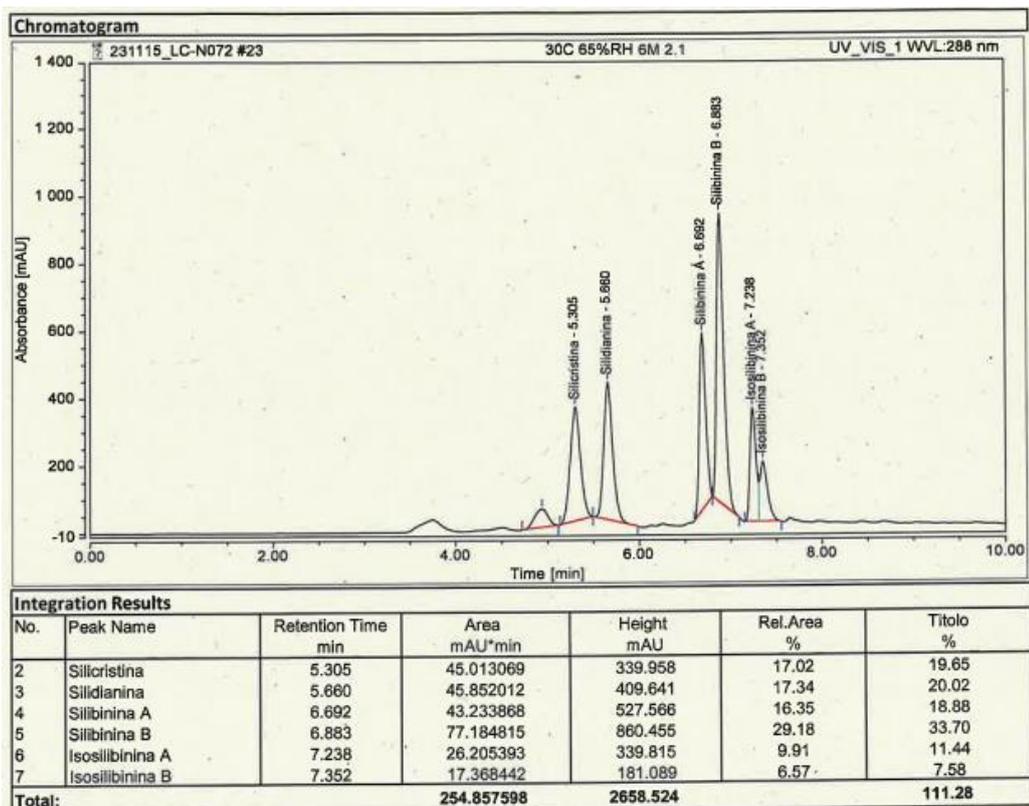


Fig. 4.6.35 Cromatogramma prima misurazione secondo campione 30°C 65%RH.

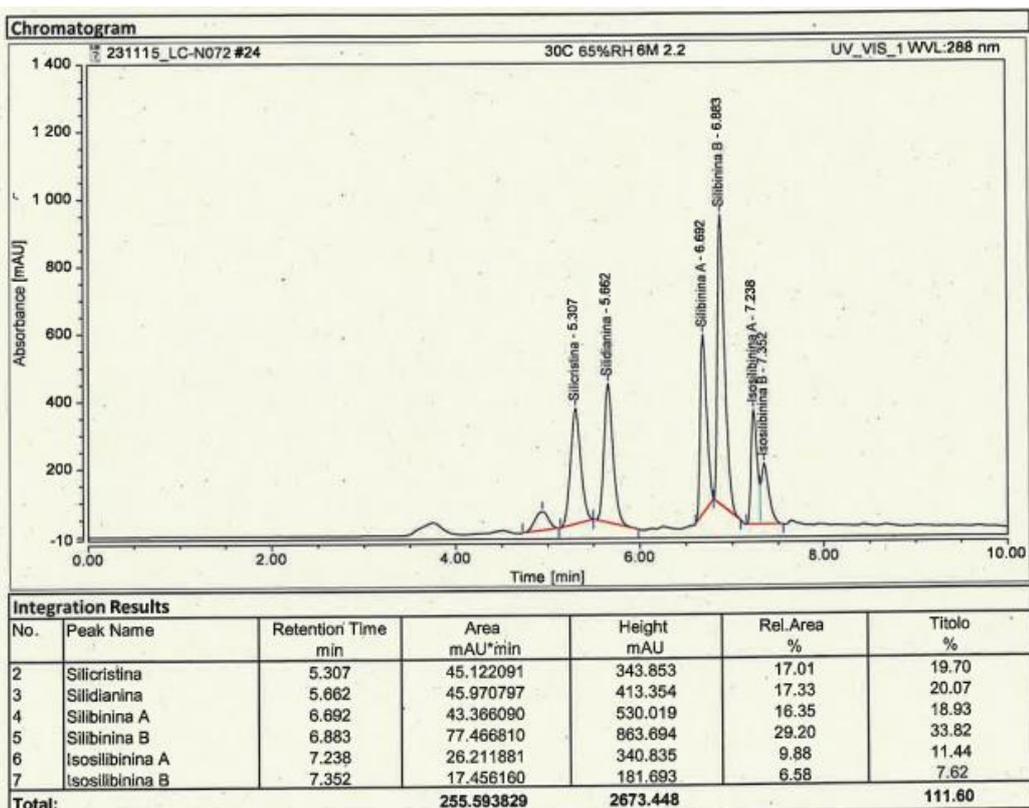


Fig. 4.6.36 Cromatogramma seconda misurazione secondo campione 30°C 65%RH.

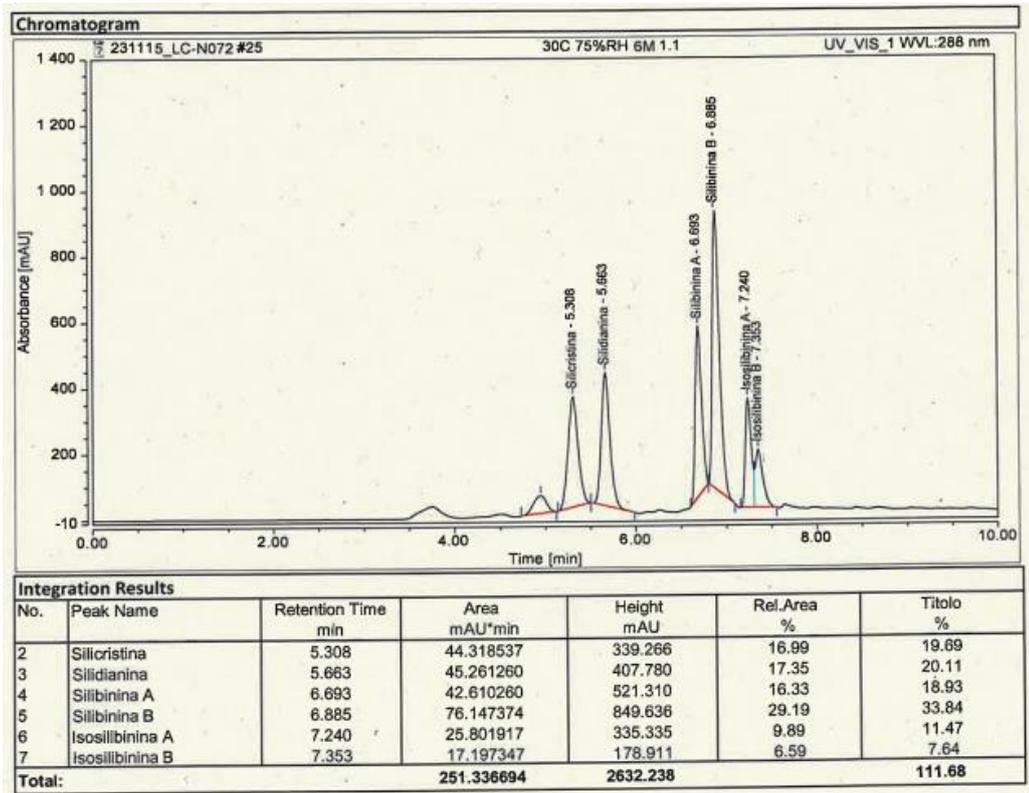


Fig. 4.6.37 Cromatogramma prima misurazione primo campione 30°C 75%RH.

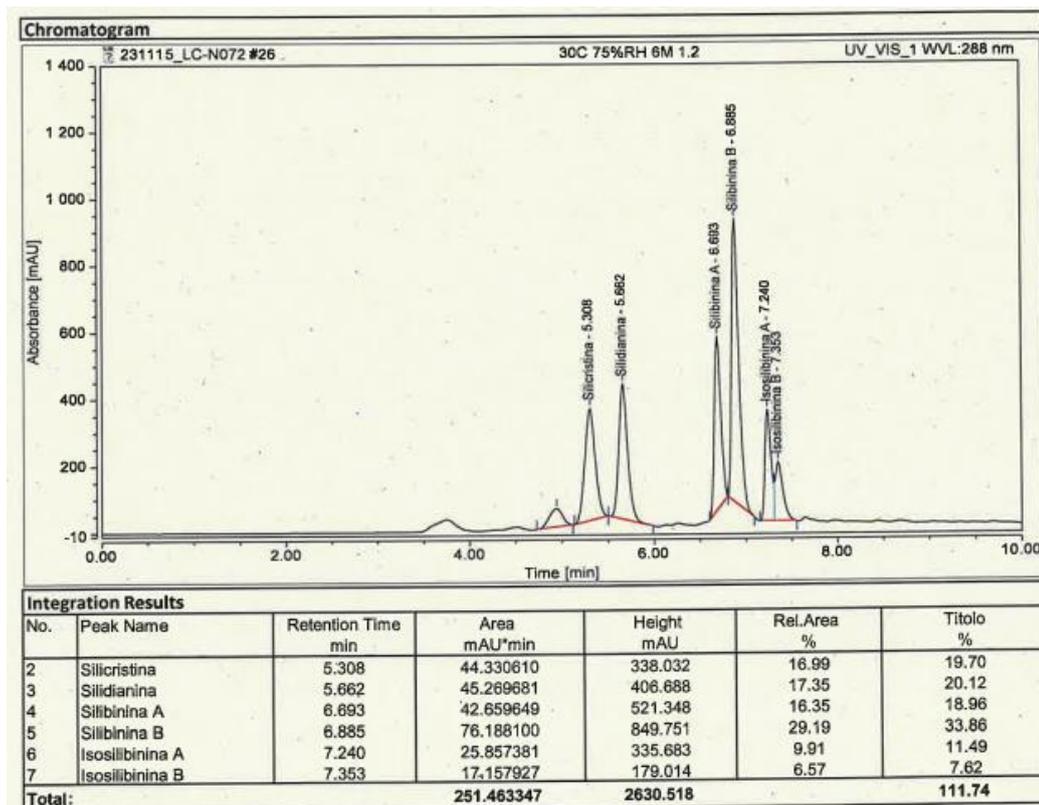


Fig. 4.6.38 Cromatogramma seconda misurazione primo campione 30°C 75%RH.

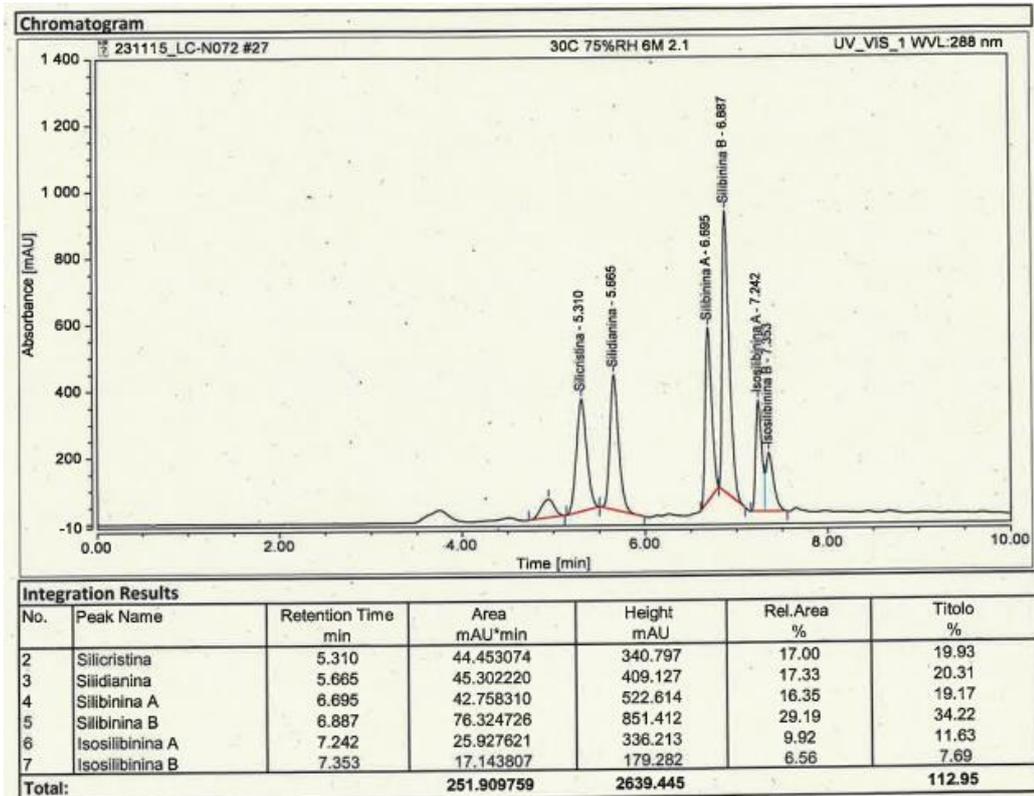


Fig. 4.6.39 Cromatogramma prima misurazione secondo campione 30°C 75%RH

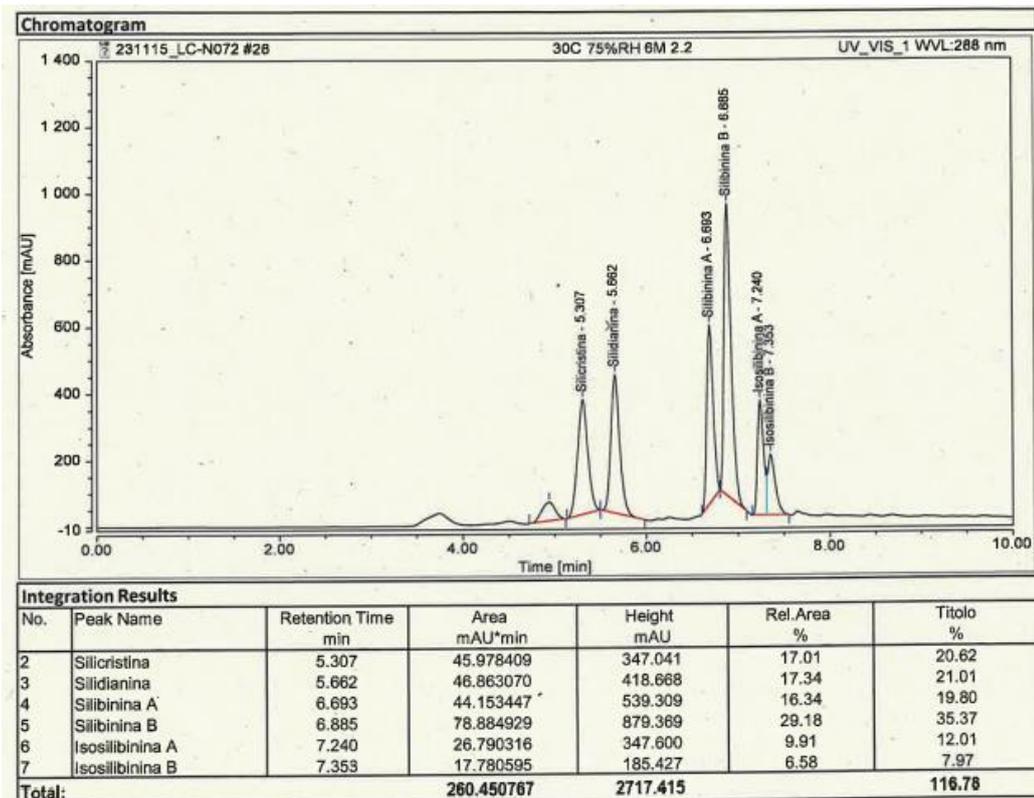


Fig. 4.6.40 Cromatogramma seconda misurazione secondo campione 30°C 75%RH.

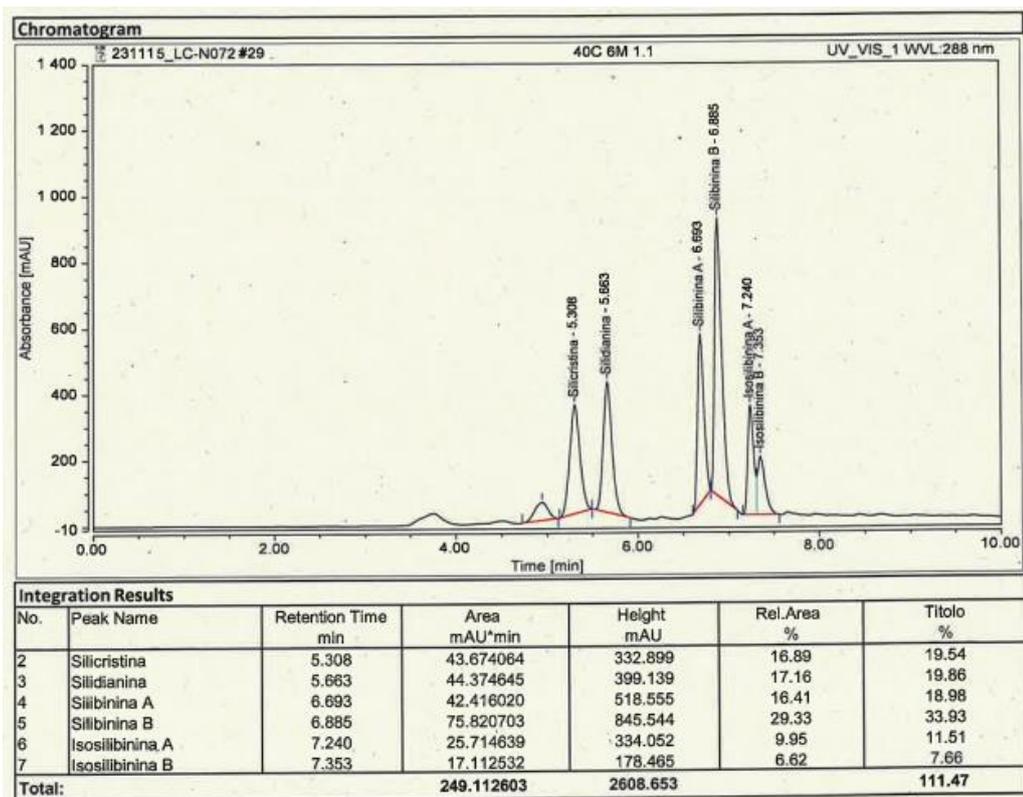


Fig. 4.6.41 Cromatogramma prima misurazione primo campione 40°C 70%RH.

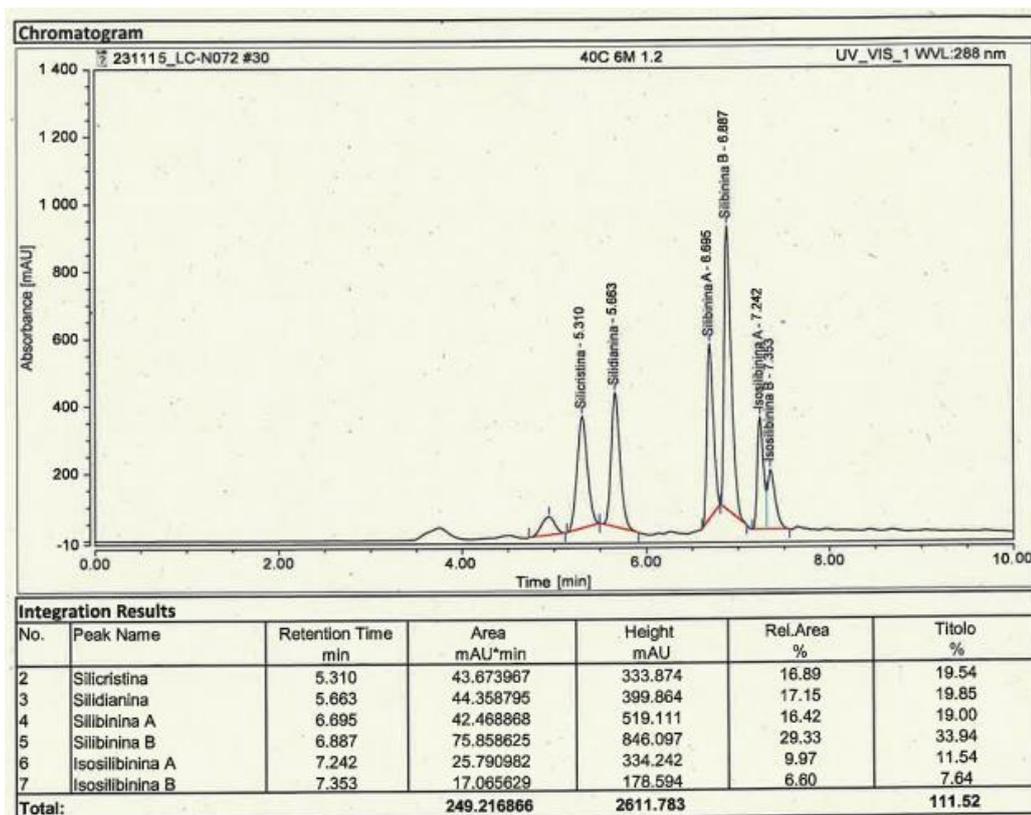


Fig. 4.6.42 Cromatogramma seconda misurazione primo campione 40°C 70%RH.

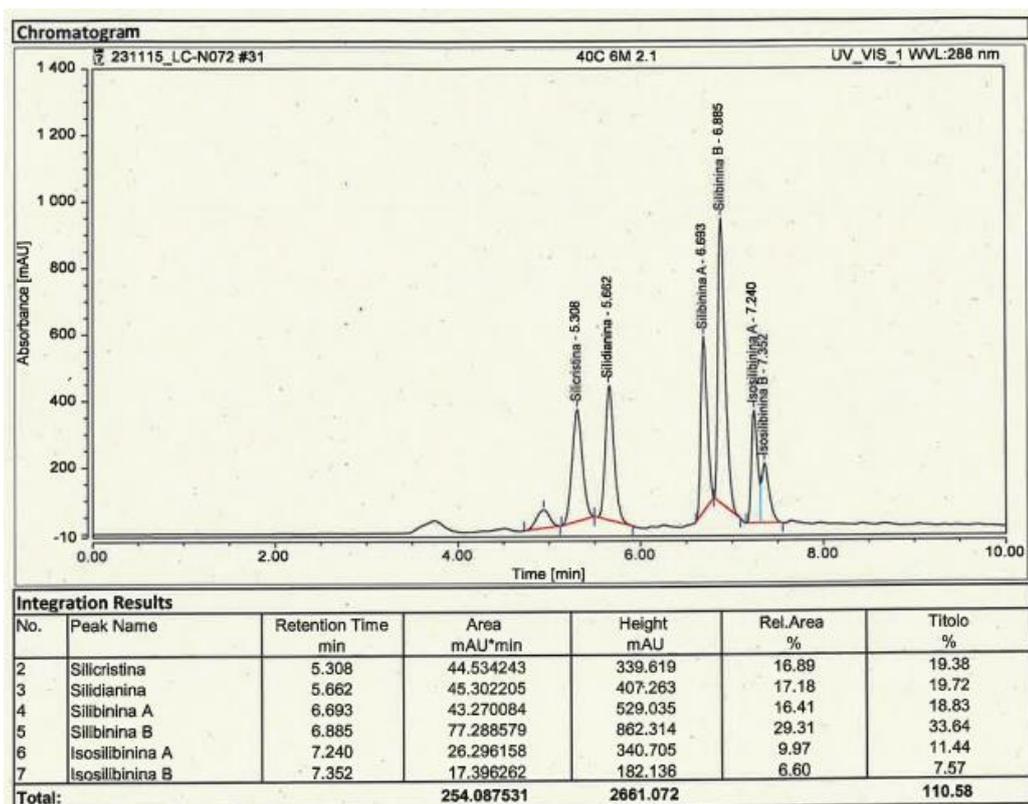


Fig. 4.6.43 Cromatogramma prima misurazione secondo campione 40°C 70%RH.

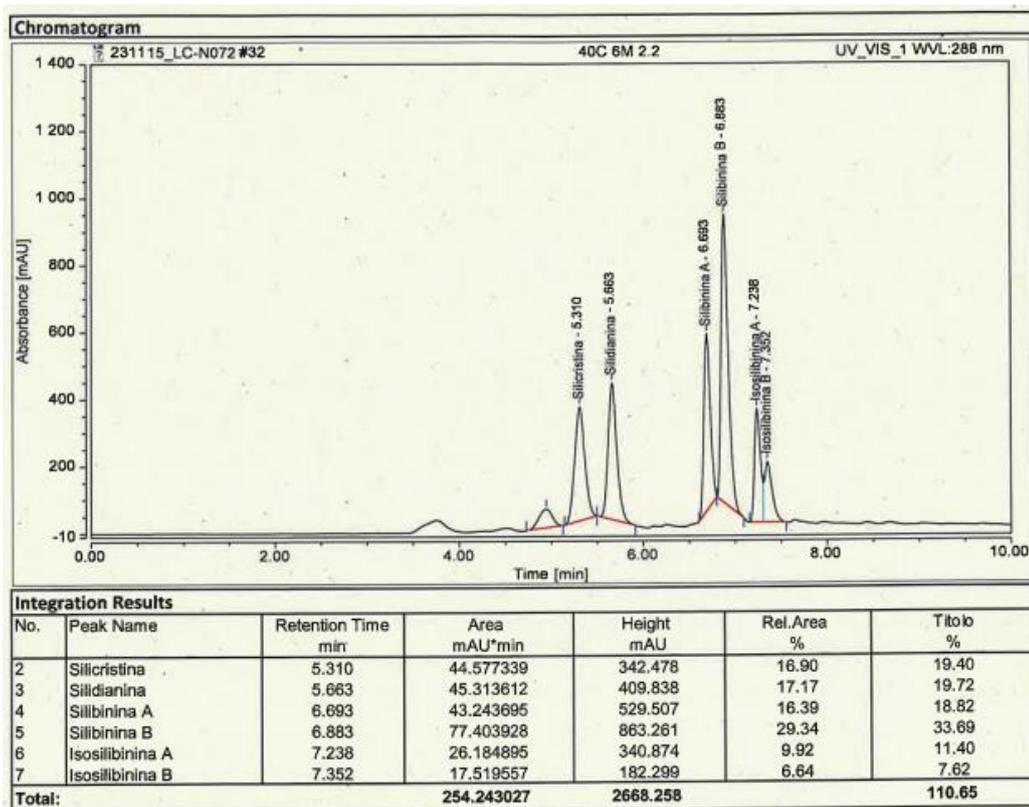


Fig. 4.6.44 Cromatogramma seconda misurazione secondo campione 40°C 70%RH.

4.7 Validazione metodo su un nuovo strumento

Oggetto dello studio è la verifica che il metodo utilizzato sullo strumento precedente possa essere applicato nelle titolazioni sul nuovo strumento, il quale possiede le stesse caratteristiche del rilevatore UV, ma è in grado di lavorare anche con livelli di pressione inferiore.

Il nuovo strumento copre sia il campo UPLC (15000 psi) che il campo HPLC (6000 psi) per il rilascio dei lotti prodotti e per gli studi di stabilità di integratori contenenti silimarina.

A tal scopo si sono eseguiti alcuni test specifici per verificare se fosse possibile applicare il metodo già in uso o se si rendesse necessario apportare modifiche per adattarlo alle nuove specifiche dello strumento.

4.7.1 Specificità

La prima analisi effettuata è la più rapida; viene preparato il campione, lo standard e un placebo formato da tutte le componenti dell'integratore finito, tranne la silimarina, come descritto nel paragrafo 3.8.

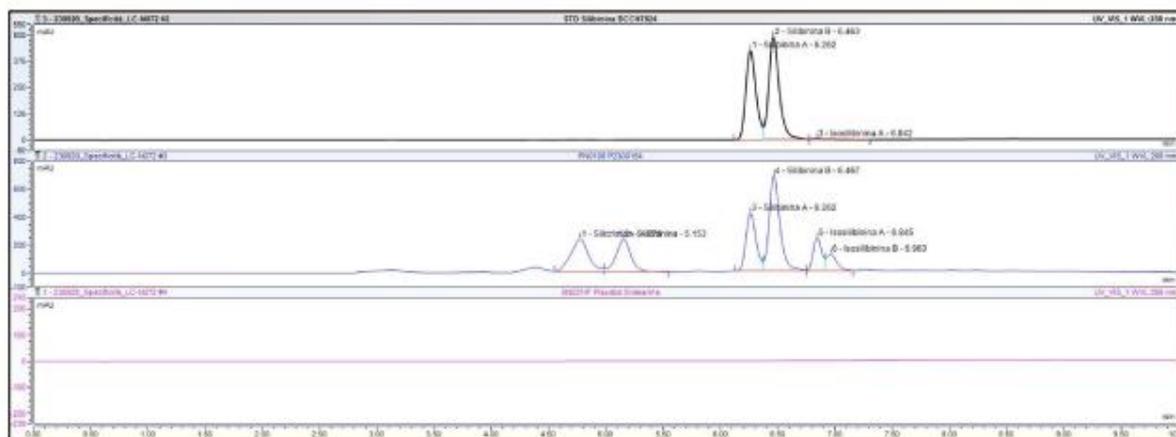


Fig. 4.7.1 Cromatogrammi dello standard di silimarina (primo grafico), campione di materia prima (secondo grafico) e bianco.

Nei grafici riportati in Fig. 4.7.1 la prima curva rappresenta lo standard di silimarina, la seconda curva si riferisce ai picchi di una materia prima di un lotto di silimarina già analizzato precedentemente ed infine nell'ultimo grafico è presente il placebo, che non dovrebbe generare alcun segnale. Come si evince dall'analisi degli spettri non sono presenti anomalie o interferenze di segnale e per questo motivo il metodo ha superato il test di specificità.

4.7.2 Precisione

Il secondo esame si distribuisce su più giorni con specifiche sia intragiorno che intergiorno.

Nell'effettuare questo test si sono presentate criticità, in quanto in alcuni campioni risultavano esserci interferenze tali da influire sul parametro di precisione. Si sono pertanto ipotizzate diverse soluzioni; si è provato ad esempio ad aumentare il tempo di lavaggio dell'ago tra un'iniezione e la successiva, ma ciò non ha portato ad un risultato significativamente migliore. Per riuscire ad ottenere un cromatogramma preciso, nel quale ogni picco risultasse maggiormente separato, in modo da poter meglio identificare i componenti della silimarina, si è deciso di aumentare il volume di iniezione da 0,5 μL a 4 μL .

Nella Fig. 4.7.2 è possibile visualizzare come il segnale blu delle nuove analisi sia molto più forte e preciso rispetto a quello nero rilevato con il vecchio metodo.

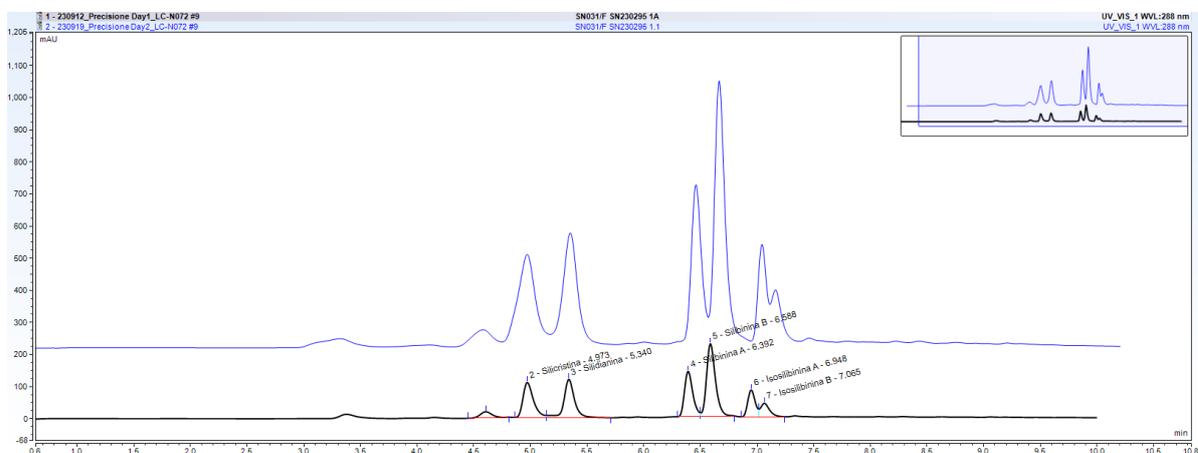


Fig. 4.7.2 Confronto tra i picchi prima e dopo la modifica del metodo.

A seguito della modifica del metodo sono stati nuovamente effettuati test di valutazione del parametro di precisione, che consistono nell'analizzare un totale di sei campioni di materia prima utilizzata nella specificità, seguendo il metodo descritto nel paragrafo 3.8 riferito alla materia prima, osservandone i titoli in percentuale e la variazione tra di essi. Si riportano qui di seguito le relative tabelle esplicative (Fig. da 4.7.3 a 4.7.5).

3.1.1- Day 1

#	Level	Assay %
Day 1 - 1/ 6	100.00	102.71
Day 1 - 2/ 6	100.00	101.89
Day 1 - 3/ 6	100.00	101.31
Day 1 - 4/ 6	100.00	101.26
Day 1 - 5/ 6	100.00	101.88
Day 1 - 6/ 6	100.00	103.67

#	Level	Assay %	STAT	Test #	Q Calc.	Q (99%)	Q (95%)
1	100.00	102.71					
2	100.00	101.89					
3	100.00	101.31					
4	100.00	101.26					
5	100.00	101.88					
6	100.00	103.67		1	0.398	0.698	0.560

(*) suspicious value, (**) aberrant value

		Test of variance	
Number of values	6	Test #	
Number of values used for calculation	6		
Mean of values	102.12		
Variance for this series	8.513600e-01	STAT	
Coefficient of variation (%)	0.90		
Confidence interval (+-)	0.97		

Fig. 4.7.3 Valori precisione titolazione primo giorno.

Per ogni giorno il coefficiente di variazione non deve superare da specifica il 2% e il primo giorno è risultato equivalente a 0,90% (Fig. 4.7.3).

3.1.2- Day 2

#	Level	Assay %
Day 2 - 1/ 6	100.00	110.11
Day 2 - 2/ 6	100.00	108.41
Day 2 - 3/ 6	100.00	110.53
Day 2 - 4/ 6	100.00	110.88
Day 2 - 5/ 6	100.00	107.06
Day 2 - 6/ 6	100.00	111.32

#	Level	Assay %	STAT	Test #	Q Calc.	Q (99%)	Q (95%)
1	100.00	110.11					
2	100.00	108.41					
3	100.00	110.53					
4	100.00	110.88					
5	100.00	107.06		1	0.317	0.698	0.560
6	100.00	111.32					

(*) suspicious value, (**) aberrant value

		Test of variance	
Number of values	6	Test #	1
Number of values used for calculation	6	C Calc	0.711
Mean of values	109.72	C (99%)	0.793
Variance for this series	2.701097e+00	C (95%)	0.707
Coefficient of variation (%)	1.50	STAT	*
Confidence interval (+-)	1.73		

Fig. 4.7.4 Valori precisione titolazione secondo giorno.

Per il secondo giorno il valore individuato equivale all'1,50%, rientrando anche in questo caso nel 2%, come da specifica (Fig. 4.7.4).

3.1.3- Day 3

#	Level	Assay %
Day 3 - 1/ 6	100.00	104.72
Day 3 - 2/ 6	100.00	104.57
Day 3 - 3/ 6	100.00	104.63
Day 3 - 4/ 6	100.00	104.24
Day 3 - 5/ 6	100.00	105.55
Day 3 - 6/ 6	100.00	104.16

#	Level	Assay %	STAT	Test #	Q Calc.	Q (99%)	Q (95%)
1	100.00	104.72					
2	100.00	104.57					
3	100.00	104.63					
4	100.00	104.24					
5	100.00	105.55	*	1	0.597	0.698	0.560
6	100.00	104.16					

(*) suspicious value, (**) aberrant value

		Test of variance	
Number of values	6	Test #	
Number of values used for calculation	6	C Calc	
Mean of values	104.65	C (99%)	
Variance for this series	2.459500e-01	C (95%)	
Coefficient of variation (%)	0.47	STAT	
Confidence interval (+-)	0.52		

Fig. 4.7.5 Valori precisione titolazione terzo giorno.

Anche il terzo giorno il coefficiente della variazione delle misurazioni è risultato essere inferiore al 2% (Fig. 4.7.5).

Per poter essere convalidato il coefficiente di variazione di ripetibilità deve essere < al 2% e dal calcolo effettuato dallo strumento risulta essere 1,07%, mentre il coefficiente di variazione della precisione intermedia deve essere < al 4% e dalle analisi risulta 3,8% (Fig. 4.7.6). Il metodo modificato nell'iniezione ha quindi superato il test di precisione sia intragiorno che intergiorno.

Confidence level (1-alpha/2) for t test	97.50
Total number of values used for calculation	18
Degrees of freedom	17
T (table)	2.110
Mean value	105.49
Variation interval	1.99
Variation interval (%)	1.89
Number of series	3
Variance of repeatability S_r^2	1.266136e+00
Inter-series variance " S_g^2 "	1.476381e+01
Variance of intermediate precision S_R^2	1.602995e+01
Coefficient of variation of repeatability (%)	1.07
Specification max.: 2.00%	
Coefficient of variation of intermediate precision (3.80
Specification max.: 4.00%	

Fig. 4.7.6 Tabella con limiti massimi del coefficiente di variazione di ripetibilità, del coefficiente di variazione della precisione intermedia e dei risultati ottenuti nei tre giorni.

4.7.2 Linearità

Per verificare il parametro di linearità, come indicato nel paragrafo 3.8, è stato prelevato in triplo dalla materia prima un quantitativo pari al 50, 75, 100, 125 e 150% di quanto descritto dal metodo, in modo da verificare se i risultati delle analisi dei campioni costituiti crescessero linearmente e se la retta di linearità descritta dai punti misurati passasse dallo 0.

#	Mg weighted	Area
Linearity - 1/ 3	22.49	112.624638
Linearity - 2/ 3	22.60	116.561909
Linearity - 3/ 3	22.58	115.663740
Linearity - 1/ 3	33.65	171.312809
Linearity - 2/ 3	34.02	172.712526
Linearity - 3/ 3	33.61	173.609473
Linearity - 1/ 3	45.26	230.025784
Linearity - 2/ 3	45.63	228.370539
Linearity - 3/ 3	45.94	228.634838
Linearity - 1/ 3	56.80	288.642410
Linearity - 2/ 3	56.28	287.528918
Linearity - 3/ 3	56.17	287.540347
Linearity - 1/ 3	68.03	347.229120
Linearity - 2/ 3	67.41	343.691566
Linearity - 3/ 3	66.99	341.855856

Confidence level for calibration curve : 97.5

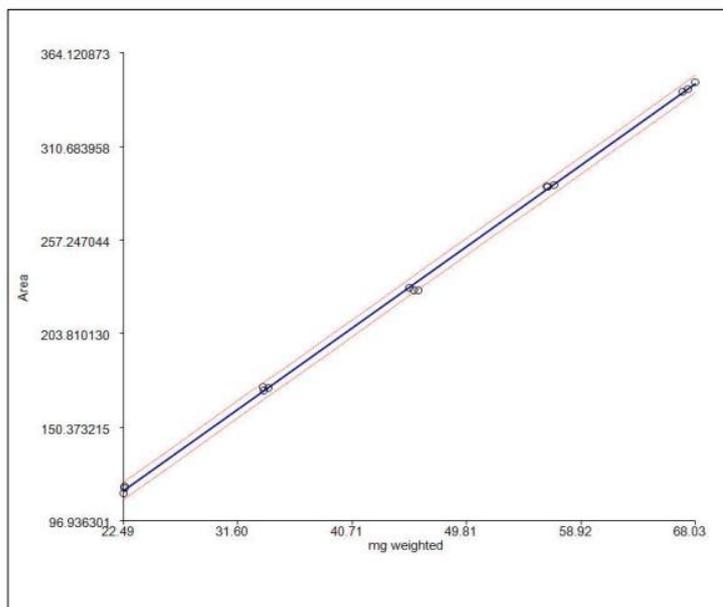


Fig. 4.7.7 Peso dei campioni con area individuata e retta di linearità derivata dai dati ottenuti.

Due sono i criteri fondamentali da valutare:

- i risultati devono essere sufficientemente lineari e perciò R^2 deve essere ≥ 0.98 ;
- la retta ricavata attraverso la regressione lineare deve avere l'origine non significativamente diversa da zero; pertanto l'intersezione della retta con l'asse y + o - gli intervalli di confidenza devono comprendere lo zero.

Il test di linearità risulta superato in quanto la retta ricavata soddisfa entrambi i requisiti richiesti (Fig. 4.7.7).

4.7.2 Accuratezza

Nell'analisi di validazione riferita all'accuratezza si è andati a ricreare sei campioni pesando tutte le componenti dalle varie materie prime già analizzate precedentemente. Si è agito come descritto nel paragrafo 3.8, riferito al test di accuratezza.

#	Level %	Recovery %
Accuracy - 1/ 6	100	98.98
Accuracy - 2/ 6	100	97.04
Accuracy - 3/ 6	100	99.63
Accuracy - 4/ 6	100	99.77
Accuracy - 5/ 6	100	99.61
Accuracy - 6/ 6	100	99.88

Fig. 4.7.8 Tabella risultati recovery dei sei campioni.

Dalla recovery è possibile ricavare la recovery media equivalente a 99,15% con un limite dell'intervallo di confidenza massimo di 00,29% e un limite minimo di 98,02%. In Fig. 4.7.9 viene mostrato l'intervallo di confidenza dell'analisi.

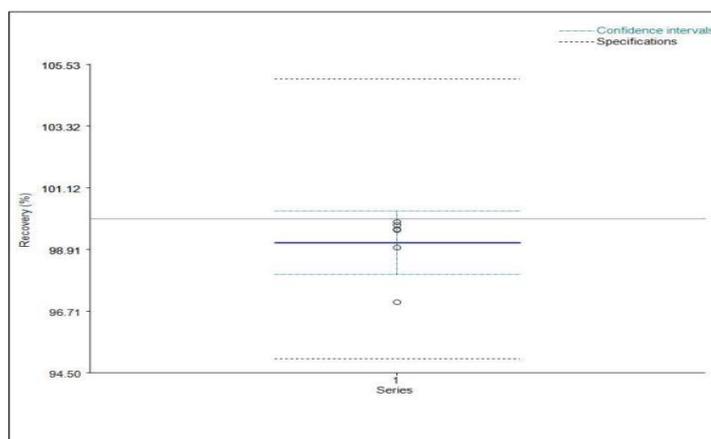


Fig. 4.7.9 Intervallo di confidenza delle misurazioni ottenute dallo strumento.

Per essere in specifica la recovery media più o meno gli intervalli di confidenza deve comprendere il 100% del recupero. Dal grafico si può evincere come il 100% del recupero sia effettivamente compreso nell'intervallo di confidenza, per cui l'analisi è da considerarsi valida.

5. Discussione

5.1 Osservazioni risultati analisi berberina cloruro

Tutte le analisi eseguite non sono da reputarsi indipendenti, ma in stretta correlazione tra loro, in quanto solo se tutti i dati ottenuti risultano conformi, il prodotto testato può essere rilasciato e immesso sul mercato.

Nel caso della berberina cloruro, ad esempio, prima si è analizza la materia prima che giunge nello stabilimento in modo da verificare che non siano presenti anomalie. Si è andati quindi a titolare la materia prima, la cui percentuale di titolazione deve essere conforme ai range presenti nella scheda tecnica della molecola, messa a disposizione dell'azienda dal fornitore e a cui si è fatto riferimento per questo tipo di analisi; se non rientrasse in specifica, la materia prima potrebbe essere contaminata non rispettando le caratteristiche ricercate. Nel nostro caso il valore deve essere $\geq 85\%$ e dai risultati ottenuti la materia prima non presenta irregolarità. Per poter certificare che la materia prima sia conforme, e possa quindi essere utilizzata in un semilavorato, si è ricercata anche la presenza di metalli pesanti tramite ICP-OES, poiché tali sostanze contaminanti sono nocive e se ingerite possono essere causa di avvelenamento e provocare gravi danni all'organismo.

La contaminazione da metalli pesanti può avere due principali origini: la presenza naturale nel suolo o la loro dispersione nell'ambiente da parte delle attività antropiche. Avendo la berberina un'origine vegetale, i metalli che si andranno a ricercare sono quelli che potrebbero trovarsi maggiormente nella composizione chimica del terreno di origine, in modo da ottimizzare il consumo dei reagenti e degli standard utilizzati in questa tipologia di analisi specifica. Nei lotti analizzati non sono stati individuati valori di Piombo, Cadmio e Nichel superiori al limite massimo consentito come da Allegato 1 del Regolamento (UE) 2023/915 della Commissione del 25 aprile 2023 relativo ai tenori massimi di alcuni contaminanti negli alimenti. Sono riportati i seguenti valori massimi consentiti per ogni contaminante: $Pb \leq 3\text{ppm}$, $Cd \leq 1\text{ppm}$. Nel caso del Ni, sebbene i botanicals non vengano esplicitamente menzionati dalla Commissione europea, si considera come limite massimo 1ppm.

Il controllo di qualità deve monitorare non solo le molecole che rappresentano un rischio per la popolazione generale, ma anche quelle responsabili di eventi avversi in soggetti con allergie, intolleranze o altre specifiche ipersensibilità. Un'altra analisi

fondamentale è pertanto la ricerca degli allergeni; tra i più importanti è sicuramente la presenza di glutine.

Essendo il prodotto finito una compressa ad uso orale, viene assorbito dall'intestino e nel caso in cui fosse contaminato, potrebbe causare nei soggetti celiaci danni ai villi intestinali provocando diverse tipologie di reazioni avverse. Materia prima, semilavorato e anche prodotto finito sono oggetto di analisi, in quanto, a causa di una procedura di pulizia non ottimale della strumentazione e delle apparecchiature in uso o della stessa linea di confezionamento, si potrebbero riscontrare contaminazioni derivate da altri prodotti contenenti glutine, che precedentemente sono stati lavorati sulla stessa linea di produzione.

Questi pericoli sono normalmente evitati seguendo attentamente le procedure di pulizia, di manutenzione delle apparecchiature adibite alla produzione e, più in generale, di corretta prassi igienica. In base al Regolamento di esecuzione (UE) n. 828/2014, nel quale i limiti della presenza di glutine sono fissati a 20 ppm, possiamo dichiarare conformi i risultati ottenuti dalle analisi condotte tramite test ELISA.

Le analisi non si interrompono al rilascio del prodotto, ma per ogni lotto vengono prelevati dei campioni sui quali si effettuano studi di stabilità per verificare che le caratteristiche descritte in etichetta siano mantenute fino alla data di scadenza.

Nel nostro caso si è andati ad analizzare un prodotto finito conservato per 24 mesi in diverse condizioni ambientali (Tabella.5.1).

		25°C 60%RH					
	T0	3m	6m	9m	12m	18m	24m
Berberina%	97.71	N/A	103.39	N/A	105.76	N/A	104.40

		30°C 65%RH					
	T0	3m	6m	9m	12m	18m	24m
Berberina%	97.71	N/A	105.59	N/A	96.95	N/A	101.89

		40°C 75%RH					
	T0	3m	6m				
Berberina%	97.71	107.31	99.13				

Tabella 5.1 Titolazione percentuale media del campione di berberina nei 24 mesi.

Il range di specifica per il prodotto finito, a cui si fa riferimento, deriva da valutazioni interne all'azienda che definiscono i limiti di conformità; tali limiti non eccedono comunque i parametri contenuti nelle linee guida descritte nel Regolamento UE n.1169/2011 del Parlamento Europeo e del Consiglio.

Nei vari stati di conservazione si può osservare come la berberina presente nel prodotto finito abbia una titolazione che rimane sempre nel range di specifica definito tra l'80% e il 120%, per cui il prodotto ha superato il test di stabilità.

Attraverso le conformità delle analisi effettuate viene garantita la sicurezza del prodotto, che non presenta contaminazioni, e il suo contenuto è conforme e stabile non alterandosi anche in condizioni critiche di conservazione.

5.2 Osservazioni risultati analisi monacolina K

Il 2 giugno 2022 è stato pubblicato il regolamento (UE) 2022/860 che modifica l'allegato III del regolamento (CE) n.1925/2006 del Parlamento Europeo e del Consiglio per quanto riguarda le monacoline, in particolare la monacolina K contenuta nel riso rosso fermentato. In base alle nuove disposizioni la quantità massima di monacolina K assimilabile giornalmente deve essere inferiore a 3 mg. Il regolamento prevede inoltre che le nuove formulazioni consentite non possano essere consumate dalle donne in gravidanza e in allattamento, da bambini di età inferiore ai 18 anni e da adulti over 70 e non possono essere utilizzate se si assumono altri prodotti contenenti riso rosso fermentato o medicinali per abbassare il colesterolo.

Il range della titolazione percentuale presente nella scheda tecnica del fornitore a cui si fa riferimento, ha subito delle variazioni a causa di tale limitazione, essendo ora compreso tra l'1,7% min e l'1.9% max. Nelle analisi svolte sulla materia prima non si sono evidenziate irregolarità rientrando tutti i titoli medi nel range qui sopra riportato. Come per la berberina si sono effettuate analisi per ricercare la presenza di glutine, poiché la monacolina K viene utilizzata sia in prodotti simili a quelli contenenti berberina, sia insieme ad essa. Dai risultati ottenuti, anche in questo caso non è presente una quantità di glutine superiore al limite massimo consentito nel Regolamento di esecuzione (UE) n. 828/2014.

Le condizioni, in cui i campioni contenenti monacolina K sono inseriti in test di stabilità, sono simili a quelli visti per la berberina. Nella tabella 5.2 possiamo osservare i dati relativi alla stabilità di un campione analizzato nei 24 mesi.

	25°C 60%RH						
	T0	3m	6m	9m	12m	18m	24m
Monacolina K %	104.64	100.10	99.04	101.82	98.62	97.85	95.68

	30°C 65%RH						
	T0	3m	6m	9m	12m	18m	24m
Monacolina K %	104.64	101.61	98.85	98.40	97.47	94.80	92.16

Tabella 5.2 Titolazione percentuale media del campione di monacolina K nei 24 mesi.

Complessivamente per la monacolina K le analisi effettuate hanno dato come risultato una materia prima che tende a non modificarsi nel tempo, anche se sottoposta a diversi metodi di conservazione; infatti, tutti i valori ottenuti sono compresi tra 85% e 105%. Il range è stabilito da valutazioni aziendali con parametri conformi alle linee guida presenti nel Regolamento UE n.1169/2011 del Parlamento Europeo e del Consiglio. Per questo motivo possiamo affermare che il lotto in questione non ha evidenziato problemi di stabilità nel conservarsi e da queste analisi si può evincere come la monacolina K sia una molecola resistente, che non subisce modificazioni significative nel corso del tempo.

5.3 Osservazioni risultati analisi silimarina

La silimarina è contraddistinta da funzioni e campi d'azione differenti rispetto a berberina cloruro e monacolina K, che possono sinergizzare, grazie alla complementarietà dei rispettivi meccanismi di azione.

La silimarina, inoltre, è una molecola più complessa con più isoforme presenti in concentrazioni diverse; per questo motivo quando viene analizzata si deve valutare la presenza di tutte le isoforme, dalla cui somma si ottiene la percentuale della titolazione finale.

Dai test sulla materia si denota che la stessa è conforme alle specifiche presenti nella scheda tecnica del fornitore a cui l'azienda fa riferimento; infatti, la titolazione media percentuale totale è compresa nel range tra 75% e 80,9%, avvicinandosi al limite massimo senza superarlo.

Riguardo alla stabilità nel prodotto finito si è analizzato un numero maggiore di campioni derivati da due sue tipologie, composte da diverse miscele contenenti silimarina.

Nel primo caso i campioni sono stati conservati nelle condizioni di temperatura e umidità visibili in tabella 5.3.1.

	25°C 60%RH						
	T0	3m	6m	9m	12m	18m	24m
Silimarina %	104.10	N/A	N/A	104.94	103.98	96.84	112.40

	30°C 75%RH						
	T0	3m	6m	9m	12m	18m	24m
Silimarina %	104.10	113.21	109.63	116.70	104.22	100.00	112.30

Tabella 5.3.1 Titolazione percentuale media del campione di silimarina nei 24 mesi.

In un primo momento si sono effettuate le analisi a 25°C 60%RH a T0, ossia il momento in cui il campione è stato prodotto e messo in stabilità. Rianalizzando il campione dopo un anno e dopo due anni si è osservato come le titolazioni percentuali non presentino una variazione significativa, risultando ampiamente all'interno del range di conformità del prodotto finito stabilito da valutazioni interne, che lo definiscono tra il 70% e il 130%, rimanendo nei parametri contenuti nel Regolamento UE n.1169/2011 del Parlamento Europeo e del Consiglio.

Nel secondo caso si è analizzato un prodotto finito con una forbice più ampia di valori di conservazione; infatti, si può osservare in tabella 5.3.2 le modalità in cui sono stati inseriti in stabilità i campioni presi in esame.

	25°C 60%RH						
	T0	3m	6m	9m	12m	18m	24m
Silimarina %	107.14	105.45	112.18				

	30°C 65%RH						
	T0	3m	6m	9m	12m	18m	24m
Silimarina %	107.14	105.51	110.70				

	30°C 75%RH						
	T0	3m	6m	9m	12m	18m	24m
Silimarina %	107.14	109.81	113.29				

	40°C 70%RH						
	T0	3m	6m	9m	12m	18m	24m
Silimarina %	107.14	107.27	111.05				

Tabella 5.3.2 Titolazione percentuale media del campione di silimarina nei 6 mesi.

Come si può osservare a 25°C 60%RH, a 30°C 65%RH, a 30°C 75%RH e a 40°C 70%RH non sono presenti grandi variazioni nelle titolazioni nel corso dei sei mesi; pertanto, si può dedurre che nel secondo prodotto finito, la silimarina si mantiene stabile anche se sottoposta a variazioni importanti di temperatura e di percentuale di umidità relativa, per cui il prodotto è sicuro e viene garantita la sua efficacia fino alla data di scadenza.

La variabilità intrinseca delle materie prime naturali che non sono costruite con stabilizzanti chimici (come può essere un principio attivo farmacologico), unita alla variabilità sperimentale dei metodi analitici, conferma che le molecole analizzate per gli integratori alimentari sono entro i limiti previsti e rimangono stabili nel tempo per tutta la shelf life del prodotto.

5.3.1 Osservazioni validazione metodo su un nuovo strumento

Con l'arrivo del nuovo strumento le analisi sono state osservate da un'altra prospettiva, ossia il fine ultimo non era andare a verificare la presenza della molecola in esame, ma la capacità dello strumento di fornire risultati corretti tramite il metodo utilizzato per la silimarina. Il dato analitico deve essere robusto e in accordo agli standard GMP, per cui è necessario avere una convalida del metodo stesso basata su Specificità, Precisione, Accuratezza e Linearità secondo le linee guida ICH Q2A e ICH Q2B.

Per validare il nuovo HPLC si sono effettuate diverse tipologie di analisi anche su più giorni e con campioni preparati in giorni diversi, aventi caratteristiche specifiche conosciute da rilevare tramite iniezioni effettuate in date differenti da più operatori.

Uno dei parametri valutati è la Specificità, utilizzando la linea guida ICH Q2 (R1). In relazione ad essa si è osservato come lo strumento non presentasse interferenze nel grafico riferito al campione contenente solo silimarina, oltre a non fornire alcun segnale nel bianco composto da una miscela priva della molecola analizzata. Questo risultato ha dimostrato che lo strumento è in grado di distinguere senza errori la molecola in esame rispetto ad altre possibili sostanze contenute all'interno di un integratore.

La Precisione, invece, descrive quanto i valori restituiti dallo strumento siano tutti uniformi. Per verificarlo si sono effettuate tre analisi in tre giorni diversi, in modo da ottenere sia un coefficiente di variazione intragiorno per il quale la percentuale massima si attesta al 2%, sia un coefficiente di variazione intergiorno (riferito a tre giorni di analisi) inferiore al 4%, entrambi definiti dalle norme ISO 5725-1:2023, ISO 5725-2:2020, ISO 5725-3: 2023, ISO 5725-4: 2020, ISO 5725-5: 1998 e ISO 5725-6: 1994.

Nelle prime prove i risultati ottenuti non erano conformi, poiché non soddisfavano i limiti intergiorno. Si è reso dunque necessario ipotizzare le cause del problema. Si è inizialmente intervenuti aumentando il tempo di condizionamento dello strumento, ma ciò non ha portato variazioni significative dei risultati, si è quindi provato ad intervenire sulla pulizia dell'ago di iniezione, ma anche in questo caso non sono stati osservati miglioramenti apprezzabili. Si è valutato infine la possibilità di aumentare la quantità di campione analizzato dallo strumento, ed in quest'ultimo caso si è notato che aumentando l'iniezione da 0,5 µl a 4 µl di campione, si è ottenuto un miglioramento nella precisione. Dalle analisi effettuate successivamente alla modifica del metodo, entrambi i coefficienti di variazione sono risultati essere inferiori ai limiti massimi permessi; a seguito di ciò lo strumento è stato convalidato nel test di precisione.

Un altro parametro molto importante che è stato testato sullo strumento è la Linearità, per la quale le medie dei risultati derivanti dalle varie percentuali dei campioni prelevati sono stati inseriti in un grafico (Y= area rilevata, X= mg pesati dei campioni).

Tali misurazioni ottenute, per essere valide secondo la norma ISO 11095:2010, devono posizionarsi in punti appartenenti ad una retta passante per l'origine avente una $R^2 \geq 0.98$.

La retta risultante dai dati ottenuti rispecchia le caratteristiche dei parametri analizzati e quindi certifica che lo strumento è in grado di rilevare correttamente le titolazioni dei campioni, anche con quantità prelevate differenti rispetto a quelle indicate nel metodo d'analisi.

Nell'ultimo test eseguito si è valutata l'Accuratezza dello strumento, cioè quanto i risultati ottenuti si discostano dai valori effettivi dei campioni preparati con una quantità nota del campione ricostituito utilizzato per la validazione.

I dati ottenuti dalla media delle recovery dimostrano che lo strumento risulta accurato, essendo in grado di rilevare l'effettiva quantità della molecola all'interno di prodotto contenente silimarina posto in analisi secondo gli intervalli di tolleranza previsti dalla norma ISO 16269-6:2014 / USP 1210 con limite minimo di 95% di recovery e limite massimo di 105%.

Al termine di tutti i processi di validazione sopra descritti, si è potuto convalidare il metodo d'analisi della silimarina sul nuovo HPLC, poiché tutti i risultati rientravano nei limiti di accettazione dei test effettuati.

6. Conclusione

Uno stile di vita sano, costruito su una dieta controllata e varia, un costante esercizio fisico e l'adozione di comportamenti virtuosi per la salute risultano essere fondamentali in ogni fase della vita di persone giovani, adulti o anziani. Gli studi scientifici pubblicati negli ultimi decenni hanno dimostrato chiaramente che la dieta e i suoi componenti sono in grado di influenzare lo stato di salute, modulando favorevolmente o sfavorevolmente aspetti fisiologici o fisiopatologici. La dieta, però, non sempre riesce ad assicurare un corretto rifornimento di principi nutritivi.

I nutraceutici possono dunque assumere un ruolo significativo come modulatori cellulari e funzionali in grado di ottimizzare i processi fisiologici dell'organismo umano, contribuendo in alcuni casi anche alla prevenzione di fattori di rischio di malattia, come ormai dimostrano numerose osservazioni epidemiologiche.

Nel contesto della medicina anti-aging, l'azione epatoprotettrice, antiossidante, antinfiammatoria, rigenerativa, detossificante e tonico-stimolante dei principi attivi contenuti nel cardo mariano (*Sylibum marianum*) fanno di questa pianta officinale un'importante molecola utilizzabile sul piano clinico e preventivo. Buona parte delle sue proprietà sono attribuite alla silimarina, un mix di sostanze antiossidanti ed epatoprotettive impiegate nella moderna fitoterapia e le cui tante possibili applicazioni terapeutiche e cliniche sono in corso di esplorazione. E proprio la silimarina è al centro di recenti studi volti a sviluppare un sistema per produrre *in vitro* questa importante frazione flavonoidica del cardo mariano, basandosi sull'utilizzo di colture cellulari. La silimarina disponibile sui mercati farmaceutici e nutraceutici è estratta dai frutti secchi di cardo mariano. I metodi convenzionali utilizzati per la sua produzione presentano però diversi limiti, dovuti alla scarsa resa delle coltivazioni di cardo e alla stagionalità di accumulo della silimarina nei suoi frutti. Grazie alla produzione *in vitro*, i vantaggi rispetto alla produzione agricola di silimarina sarebbero molteplici; ad esempio si potrebbe ottenere un livello costante di produzione, indipendentemente dai vincoli ambientali, e con procedure di purificazione notevolmente semplificate. Il processo di produzione risulterebbe inoltre più economico e a più alto rendimento, contribuendo così a diffonderne l'assunzione e i conseguenti effetti benefici sulla salute umana.

In uno studio pubblicato nell'agosto 2022 sulla rivista scientifica *Nutrients*, si indaga il meccanismo di assorbimento della berberina sucrosomiale e i suoi effetti sui livelli di glucosio in un modello di sindrome metabolica (Lupo M.G. *et al.*, 2022).

La berberina, alcaloide naturale, mostrerebbe proprietà di controllo dei livelli di colesterolo e glicemia. Per queste sue caratteristiche risulta un fitoestratto particolarmente interessante sul controllo del metabolismo dei grassi. Tuttavia, presenta scarse capacità di assorbimento, quindi, per osservare un effetto misurabile nell'organismo, è necessario assumerne quantità molto elevate. Per ovviare a questo limite, al normale fitoestratto di berberina è stata applicata la tecnologia sucrosomiale. Il nome di questa speciale tecnologia deriva dal sucrosoma, ovvero il complesso di sostanze che circondano il nutriente, lo preservano dall'azione di sostanze esterne, lo trasportano e ne favoriscono l'assorbimento a livello della mucosa dell'intestino.

Questo sistema brevettato è applicato con successo da anni ai minerali e nutrienti essenziali per l'organismo umano come il selenio, lo zinco, il calcio, il magnesio, lo iodio e, soprattutto, il ferro, e come dimostrano le numerose evidenze scientifiche pubblicate, ha permesso di aumentarne sia la tollerabilità gastrointestinale che l'assorbimento. L'applicazione della tecnologia sucrosomiale alla berberina è in questo senso una novità assoluta, perché si tratta di un fitoestratto, quindi un elemento con caratteristiche molto diverse rispetto ai minerali.

Tra i principi attivi dotati di una significativa capacità di migliorare il profilo lipidico, disponibili per l'uso clinico nel nostro Paese, è presente anche il riso rosso fermentato (*Red Yeast Rice* o RYR), prodotto purificato dell'attività di un fungo, il *Monascus Purpureus* e titolato in monacolina K; la sua indicazione elettiva è rappresentata dai pazienti con ipercolesterolemia da lieve a moderata e rischio cardiovascolare globale non elevato. Inoltre, gli integratori a base di riso rosso fermentato sembrano caratterizzati da un migliore profilo di sicurezza rispetto alle statine. Dal giugno 2022 sono state però imposte restrizioni dall'UE sul dosaggio giornaliero consentito e i soggetti utilizzatori.

Gli integratori alimentari contenenti estratti o derivati vegetali destinati alla vendita nell'Unione Europea devono essere conformi ai requisiti previsti dalla legislazione alimentare dell'UE per quanto riguarda composizione, etichettatura, qualità e sicurezza. Per formulazioni che contengono estratti vegetali è richiesta la corrispondenza fra etichetta e preparazione sia in termini quantitativi sia qualitativi per i suoi componenti biologicamente attivi. Nella produzione e controllo la presenza di ingredienti botanici aggiunge però qualche criticità specifica. La materia prima rappresenta il primo stadio della filiera ed ha un ruolo cruciale nella qualità; le piante che verranno utilizzate come ingredienti, dovranno essere sottoposte a stretti controlli

per i contaminanti biologici (batteri, virus, muffe e relative tossine) e chimici (pesticidi, metalli pesanti ecc.).

I prodotti utilizzati in nutraceutica sono per lo più classificati quali integratori e vengono pertanto normati dagli stessi regolamenti del settore alimentare. In questo contesto devono pertanto anche assicurare il controllo degli ingredienti allergenici o implicati nelle intolleranze alimentari.

La legislazione alimentare dell'UE prevede che tutti i prodotti, compresi quelli a base di vegetali, debbano contenere una data di termine minimo di conservazione o data di scadenza in etichetta. Il fabbricante del prodotto è responsabile della determinazione della data di scadenza in funzione delle caratteristiche e della forma di presentazione dell'integratore. Le informazioni necessarie per determinare la shelf-life possono essere ricavate dai test di stabilità in condizioni di umidità e temperatura prefissate.

Nel quadro del sistema HACCP in vigore, i produttori devono adottare le misure necessarie per garantire che tutte le fasi del processo siano adeguate ad ottenere i risultati attesi. Eventuali variazioni del processo produttivo, delle materie prime, o delle attrezzature, devono essere affrontate con adeguate modifiche al sistema di assicurazione della qualità.

Gli integratori sono sicuramente un settore in continua crescita. Nel 2022 il comparto ha superato i 4 miliardi di euro di fatturato, confermandosi un settore in forte ascesa. L'Italia è il leader europeo nel mercato, coprendo abbondantemente il 26% del valore totale dello stesso. In Italia ad assumerli sono 30 milioni di soggetti, con una leggera prevalenza tra le donne e nel target 35-54 anni. È quanto emerso dallo studio "Lo scenario degli integratori, tra benessere e star bene", condotto dall'Istituto di Ricerca Internazionale Future Concept Lab per Integratori & Salute, l'associazione che rappresenta il comparto degli integratori alimentari in Italia, parte di Unione Italiana Food. Lo studio, presentato in occasione di un media event svoltosi nel giugno 2023 ha permesso di disegnare il futuro degli integratori nel nostro Paese. Gli italiani sono sempre più attenti alla salute e alla prevenzione puntando su un mix di alimentazione equilibrata, vita attiva e uso appropriato di integratori alimentari per mantenere un benessere fisico e mentale. Basti pensare che, nell'ultimo anno, il 73,3% degli italiani ha utilizzato integratori alimentari almeno una volta e più di 8 italiani su 10 (82,8%) li hanno usati nel corso della propria vita. La maggior parte li assume per sostenere le difese immunitarie (30,1%), come complemento energetico (26,3%) e come aiuto per le ossa e le articolazioni (24,4%). Altri ne fanno ricorso per integrare diete vegane e

vegetariane (22%), per normalizzare l'intestino (22%), per aiutare la digestione (20,8%) e migliorare i problemi d'insonnia (20,2%). Il consumo di integratori da parte degli italiani è comunque in larga parte consapevole: dallo studio emerge infatti come 8 su 10 (77,7%) abbiano una percezione corretta degli integratori alimentari. Sono stati definiti soprattutto come un "aiuto a colmare le carenze dell'organismo", ma anche come "un supporto per rafforzare l'abitudine a mangiare sano e a fare movimento" e "sono per tutti, per un benessere complessivo". Guardando dunque al futuro, si prevede una crescente importanza degli integratori nella vita delle persone. In primis, perché si crede che la ricerca scientifica contribuirà con nuovi ritrovati ad allungare la vita in salute (60,5%) e perché gli integratori saranno sempre più innovativi e utili al mantenimento dello stato di salute grazie al contributo della scienza (55,6%) (www.nutrientiesupplementi.it).

Bibliografia

Abenavoli L., Izzo A.A., Milic N., Cicala C., Santini A., Capasso R., Milk Thistle (*Silybum marianum*): A Concise Overview on Its Chemistry, Pharmacological, and Nutraceutical Uses in Liver Diseases; *Phytherapy Research*, 2018, 32(11): 2202-2213.

Abidi P., Zhou Y., Jiang J.D., Liu J., Extracellular signal-regulated kinase–dependent stabilization of hepatic low-density lipoprotein receptor mRNA by herbal medicine berberine; *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular biology*, 2005, 25(10): 2170-2176.

Aghazadeh S., Amini R., Yazdanparast R., Ghaffari S.H., Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of *Silybum marianum* in treatment of experimental steatohepatitis; *Experimental and toxicologic pathology*, 2011, 63(6): 569-574.

Alabdan M.A., Silymarin Ameliorates Metabolic Risk Factors and Protects against Cardiac Apoptosis in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Biomedicine and Biotechnology*, 2015, 3(2): 20-27.

Al-Rasheed N.M., Faddah L.M., Mohamed A.M., Mohammad R.A., Al-Amin, M., Potential impact of silymarin in combination with chlorogenic acid and/or melatonin in combating cardiomyopathy induced by carbon tetrachloride; *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2014, 21(3): 265-274.

Amniattalab A., Malekinejad H., Rezaabakhsh A., Rokhsartalab-Azar S., Alizade-Fanalou S., Silymarin: A Novel Natural Agent to Restore Defective Pancreatic Cells in Streptozotocin (STZ)-Induced Diabetic Rats; *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2016, 15 (3): 493-500.

Banach M., Bruckert E., Descamps O.S., Ellegård L., Ezhov M., Föger B., Fras Z., Kovanen P.T., Latkovskis G., März W., Panagiotakos D.B., Paragh G., Pella D., Pirillo A., Poli A., Reiner Ž., Silbernagel G., Viigimaa M., Vrablík M., Catapano A.L., The role of red yeast rice (RYR) supplementation in plasma cholesterol control: a review and expert opinion; *Atherosclerosis Supplements*, 2019, 39: e1-e8.

Banach M., Patti A.M., Giglio R.V., Cicero A.F.G., Atanasov A.G., Bajraktari G., Bruckert E., Descamps O., Djuric D.M., Ezhov M., Fras Z., von Haehling S., Katsiki N., Langlois M., Latkovskis G., Mancini G.B.J., Mikhailidis D.P., Mitchenko O., Moriarty P.M., Muntner P., Nikolic D., Panagiotakos D.B., Paragh G., Paulweber B., Pella D., Pitsavos C., Reiner Ž., Rosano G.M.C., Rosenson R.S., Rysz J., Sahebkar A., Serban M.C., Vinereanu D., Vrablík M., Watts G.F., Wong N.D., Rizzo M., International Lipid Expert Panel (ILEP), The role of nutraceuticals in statin intolerant patients; *Journal of the American College of Cardiology*, 2018, 72(1): 96-118.

Besler M., Daul C.B., Leung P.S.C., Allergen Data Collection – update: Shrimps (*Natantia*); *Internet Symposium on Food Allergens*, 2001, 3(1): 37-53.

Bijak, M., Silybin, a major bioactive component of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.); Chemistry, bioavailability, and metabolism; *Molecules*, 2017, 22(11): 1942.

Brouwers J.R., Roeters van Lennep J.E., Maas A.H., ‘Red yeast rice’ as a cholesterol-lowering substance? Caution is warranted; *Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde*, 2016, 160: D99.

Chen C.H., Uang Y.S., Wang S.T., Yang J.C., Lin C.J., Interaction between red yeast rice and CYP450 enzymes/P-glycoprotein and its implication for the clinical pharmacokinetics of lovastatin; *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 2012: 127043.

Cicero A.F.G., Colletti A., Bajraktari G., Descamps O., Djuric D.M., Ezhov M., Fras Z., Katsiki N., Langlois M., Latkovskis G., Panagiotakos D.B., Paragh G., Mikhailidis D.P., Mitchenko O., Paulweber B., Pella D., Pitsavos C., Reiner Ž., Ray K.K., Rizzo M., Sahebkar A., Serban M.C., Sperling L.S., Toth P.P., Vinereanu D., Vrablík M., Wong N.D., Banach M., Lipid-lowering nutraceuticals in clinical practice: position paper from an International Lipid Expert Panel; *Nutrition Reviews*, 2017, 75(9): 731-767.

Cicero A.F.G., Colletti A., Combinations of phytomedicines with different lipid lowering activity for dyslipidemia management: the available clinical data; *Phytomedicine*, 2016, 23(11): 1113-1118.

Cicero A.F.G., Fogacci F., Banach M., Red Yeast Rice for Hypercholesterolemia; *Methodist DeBaKey Cardiovascular Journal*, 2019, 15(3): 192-199.

Cicero A.F.G., Parini A., Rosticci M., Brancaloni B., Derosa G., Grandi E., Borghi, C., Effect of a lipid-lowering nutraceutical on pulse-wave-velocity in hypercholesterolemic patients with or without chronic kidney disease; *The Open Hypertension Journal*, 2013, 5(1): 18-22.

Cicero A.F.G., Parini A., Rosticci M., Nutraceuticals and cholesterol-lowering action; *IJC Metabolic & Endocrine*, 2015, 6: 1-4.

Cicero A.F.G., Rovati L.C., Setnikar I., Eulipidemic effects of berberine administered alone or in combination with other natural cholesterol-lowering agents; *Arzneimittelforschung*, 2007, 57(01): 26-30.

Clichici S., Olteanu D., Nagy A.L., Oros A., Filip A., Mircea P.A., Silymarin Inhibits the Progression of Fibrosis in the Early Stages of Liver Injury in CCl₄-Treated Rats; *Journal of Medicinal Food*, 2015, 18(3): 290-298.

De Castro-Oros I., Sola R., Valls R.M., Brea A., Mozas P., Puzo J., Pocoví M., Genetic variants of LDLR and PCSK9 associated with variations in response to antihypercholesterolemic effects of armolipid plus with berberine; *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150785.

Dehmlow C., Erhard J., De Groot H., Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin; *Hepatology*, 1996, 23(4): 749-754.

Derosa G., Romano D., D'Angelo A., Maffioli P., Berberis aristata combined with Silybum marianum on lipid profile in patients not tolerating statins at high doses; *Atherosclerosis*, 2015, 239(1): 87-92.

Desimoni E., Brunetti B., Assicurazione di qualità nel laboratorio chimico. Validazione dei metodi di analisi, Bologna, Ed. Clueb, 2003.

Dong H., Zhao Y., Zhao L., Lu, F., The effects of berberine on blood lipids: a systemic review and meta-analysis of randomized controlled trials; *Planta medica*, 2013, 79(06): 437-446.

Ehara S., Ueda M., Naruko T., Haze K., Itoh A., Otsuka M., Becker A.E., Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation*, 2001, 103(15): 1955-1960.

EMA HMPC, Draft Assessment Report on Silybum Marianum (L.) Gaertn, fructus, 2015.

Erice Manifesto 2022: On the Surveillance of Potential Harms Caused by Food Supplements in Europe Drug Safety, 2023, 46: 435-437.

Farkouh A., Baumgärtel C., Mini-review: medication safety of red yeast rice products; *International Journal of General Medicine*, 2019, 12: 167-171.

Federico A., Dallio M., Masarone M., Gravina A.G., Di Sarno R., Tuccillo C., Cossiga V., Lama S., Stiuso P., Morisco F., Persico M., Loguercio C., Evaluation of the Effect Derived from Silybin with Vitamin D and Vitamin E Administration on Clinical, Metabolic, Endothelial Dysfunction, Oxidative Stress Parameters, and Serological Worsening Markers in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Patients; *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 2019:8742075.

Feng B., Meng R., Huang B., Shen S., Bi Y., Zhu D., Silymarin alleviates hepatic oxidative stress and protects against metabolic disorders in high-fat diet-fed mice; *Free Radical Research*, 2016, 50(3): 314-327.

Fried M.W., Navarro V.J., Afdhal N., Belle S.H., Wahed A.S., Hawke R.L., Reddy K.R., Effect of silymarin (milk thistle) on liver disease in patients with chronic hepatitis C unsuccessfully treated with interferon therapy: a randomized controlled trial; *Jama (Journal of American Medical Association)*, 2012, 308(3): 274-282.

Fujimura S., Shimakage H., Tanioka H., Yoshida M., Suzuki-Kusaba M., Hisa H., Satoh S., Effects of GABA on noradrenaline release and vasoconstriction induced by renal nerve stimulation in isolated perfused rat kidney; *British Journal of Pharmacology*, 1999,127(1): 109.

Fukami H., Higa Y., Hisano T., Asano K., Hirata T., Nishibe S.A., Review of Red Yeast Rice, a Traditional Fermented Food in Japan and East Asia: Its Characteristic Ingredients and Application in the Maintenance and Improvement of Health in Lipid Metabolism and the Circulatory System; *Molecules*, 2021, 26(6):1619.

Gabrielová E., Zholobenko A.V., Bartošíková L., Nečas J., Modriansky M., Silymarin constituent 2, 3-dehydrosilybin triggers reserpine-sensitive positive inotropic effect in perfused rat heart; *PLoS One*, 2015, 10(9): e0139208.

Gažák R., Walterova D., Kren V., Silybin and Silymarin – New and Emerging Applications in Medicine; *Current Medical Chemistry*, 2007 14(3): 315-338.

Gerards M.C., Terlou R.J., Yu H., Koks C.H.W., Gerdes V.E.A., Traditional Chinese lipid-lowering agent red yeast rice results in significant LDL reduction but safety is uncertain—a systematic review and meta-analysis; *Atherosclerosis*, 2015, 240(2): 415-423.

Gharagozloo M., Jafari S., Esmail N., Javid E.N., Bagherpour B., Rezaei A., Immunosuppressive Effect of Silymarin on Mitogen-Activated Protein Kinase Signalling Pathway: The Impact on T Cell Proliferation and Cytokine Production; *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2013, 113: 209-214.

Guigas B., Naboulsi R., Villanueva G.R., Taleux N., Lopez-Novoa J. M., Leverage X. M., El-Mir M. Y., The flavonoid silibinin decreases glucose-6-phosphate hydrolysis in perfused rat hepatocytes by an inhibitory effect on glucose-6-phosphatase; *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2007, 20(6): 925-934.

Gunaratna C., Zhang T., Application of liquid chromatography–electrospray ionization-ion trap mass spectrometry to investigate the metabolism of silibinin in human liver microsomes; *Journal of Chromatography B*, 2003, 794(2): 303-310.

Guo Y., Wang S., Wang Y., Zhu T., Silymarin Improved Diet-Induced Liver Damage and Insulin Resistance by Decreasing Inflammation in Mice; *Pharmaceutical Biology*, 2016, 54: 2995-3000.

- Han Y.H., Lou H.X., Ren D.M., Sun L.R., Ma B., Ji M., Stereoselective metabolism of silybin diastereoisomers in the glucuronidation process; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004, 34(5): 1071-1078.
- Hayakawa K., Kimura M., Kamata K., Mechanism underlying γ -aminobutyric acid-induced antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats; *European Journal of Pharmacology*, 2002, 438(1-2): 107-113.
- Hayakawa K., Kimura M., Yamori Y., Role of the renal nerves in γ -aminobutyric acid-induced antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats; *European Journal of Pharmacology*, 2005, 524(1-3): 120-125.
- Hermans N., Van der Auwera A., Breynaert A., Verlaet A., De Bruyne T., Van Gaal, L., Pieters L., Verhoeven, V., A red yeast rice-olive extract supplement reduces biomarkers of oxidative stress, OxLDL and Lp-PLA 2, in subjects with metabolic syndrome: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial; *Trials*, 2017, 18(1): 302.
- Higashi Y., Sasaki S., Nakagawa K., Ueda T., Yoshimizu A., Kurisu S., Oshima T., A comparison of angiotensin-converting enzyme inhibitors, calcium antagonists, beta-blockers and diuretic agents on reactive hyperemia in patients with essential hypertension: a multicenter study; *Journal of the American College of Cardiology*, 2000, 35(2): 284-291.
- Hoh C., Boocock D., Marczylo T., Singh R., Berry D. P., Dennison A.R., Hemingway D., Miller A., West K., Euden S., Garcea G., Farmer P.B., Steward W.P., Gescher A.J., Pilot study of oral silibinin, a putative chemopreventive agent, in colorectal cancer patients: silibinin levels in plasma, colorectum, and liver and their pharmacodynamic consequences; *Clinical Cancer Research*, 2006, 12(9): 2944-2950.
- Hoh C.S., Boocock D.J., Marczylo T.H., Brown V.A., Cai, H., Steward W.P., Berry D.P., Gescher A.J., Quantitation of silibinin, a putative cancer chemopreventive agent derived from milk thistle (*Silybum marianum*), in human plasma by high-performance liquid chromatography and identification of possible metabolites; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(7): 2532-2535.
- Hsu W.H., Chen T.H., Lee B.H., Hsu Y.W., Pan T.M., Monascin and ankaflavin act as natural AMPK activators with PPAR α agonist activity to down-regulate nonalcoholic steatohepatitis in high-fat diet-fed C57BL/6 mice; *Food and Chemical Toxicology*, 2014, 64: 94-103.
- Jančová P., Anzenbacherova E., Papoušková B., Lemr K., Lužná P., Veinlichová A., Šimánek V., Silybin is metabolized by cytochrome P450 2C8 in vitro; *Drug Metabolism and Disposition*, 2007, 35(11): 2035-2039.
- Javed S., Kohli K., Ali M., Reassessing bioavailability of silymarin; *Alternative Medicine Review*, 2011, 16(3): 239-249.
- Ju J., Li J., Lin Q., Xu H., Efficacy and safety of berberine for dyslipidaemias: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials; *Phytomedicine*, 2018, 50: 25-34.
- Kim E.J., Kim J., Lee M.Y., Sudhanva M.S., Devakumar S., Jeon Y.J., Silymarin Inhibits Cytokine-Stimulated Pancreatic Beta Cells by Blocking the ERK1/2 Pathway; *Biomolecules & Therapeutics*, 2014, 22: 282-287.
- Kim S.H., Oh D.S., Oh J.Y., Son T.G., Yuk D.Y., Jung Y.S., Silymarin prevents restraint stress-induced acute liver injury by ameliorating oxidative stress and reducing inflammatory response; *Molecules*, 2016, 21(4): 443.

Kono, I., Development of food materials that have the effect of improving vascular endothelial function; *Journal of the Brewing Society of Japan*, 2012, 107: 750-759.

Kren V., Marhol P., Purchartova K., Gabrielová E., Modriansky M., Biotransformation of silybin and its congeners; *Current Drug Metabolism*, 2013, 14(10): 1009-1021.

Laufs U., La Fata V., Plutzky J., Liao J.K., Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors; *Circulation*, 1998, 97(12): 1129-1135.

Lee C.L., Wen J.Y., Hsu Y.W., Pan T.M., The blood lipid regulation of Monascus-produced monascin and ankaflavin via the suppression of low-density lipoprotein cholesterol assembly and stimulation of apolipoprotein A1 expression in the liver; *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2018, 51(1): 27-37.

Lee Y.S., Kim W.S., Kim K.H., Yoon M.J., Cho H J., Shen Y., Ye J.M., Lee C.H., Oh W.K., Kim C.T., Hohnen-Behrens C., Gosby A., Kraegen E.W., James D.E., Kim J.B., Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states; *Diabetes*, 2006, 55(8): 2256-2264.

Leng S.H., Lu F.E., Xu L.J., Therapeutic effects of berberine in impaired glucose tolerance rats and its influence on insulin secretion; *Acta Pharmacologica Sinica*, 2004, 25(4): 496-502.

Li H., Dong B., Park S.W., Lee H.S., Chen W., Liu, J., Hepatocyte nuclear factor 1 α plays a critical role in PCSK9 gene transcription and regulation by the natural hypocholesterolemic compound berberine; *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(42): 28885-28895.

Li H.B., Yang Y.R.Y., Mo Z.J., Ding Y., Jiang W.J., Silibinin improves palmitate-induced insulin resistance in C2C12 myotubes by attenuating IRS-1/PI3K/Akt pathway inhibition; *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2015, 48(5): 440-446.

Li X.Y., Zhao Z.X., Huang M., Feng R., He C.Y., Ma C., Luo S.H., Fu J., Wen B.Y., Ren L., Shou J.W., Guo F., Chen Y., Gao X., Wang Y., Jiang J.D., Effect of Berberine on promoting the excretion of cholesterol in high-fat diet-induced hyperlipidemic hamsters; *Journal of Translational Medicine*, 2015, 13: 278.

Loguercio C., Andreone P., Brisc C., Brisc M. C., Bugianesi E., Chiaramonte M., Federico A., Silybin combined with phosphatidylcholine and vitamin E in patients with nonalcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial; *Free Radical Biology and Medicine*, 2012, 52(9): 1658-1665.

Lorenz D., Lücker P.W., Mennicke W.H., Wetzelsberger N., Pharmacokinetic studies with silymarin in human serum and bile; *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 1984, 6(10): 655-661.

Lupo M.G., Brill E., De Vito V., Tarantino G., Sut S., Ferrarese I., Panighel G., Gabbia D., De Martin S., Dall'Acqua S., Ferri N., In Vitro and In Vivo Sucrosomial® Berberine Activity on Insulin Resistance; *Nutrients*, 2022, 14(17): 3595.

Malekinejad H., Rokhsartalab-Azar S., Hassani-Dizaj S., Alizadeh-Fanalou S., Rezabakhsh A., Amniattalab A., Effects of silymarin on the pharmacokinetics of atorvastatin in diabetic rats; *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 2014, 39: 311-320.

Marazzi G., Cacciotti L., Pelliccia F., Iaia L., Volterrani, M., Caminiti G., Sposato B., Massaro R., Grieco F., Rosano G., Long-term effects of nutraceuticals (berberine, red yeast rice, policosanol) in elderly hypercholesterolemic patients; *Advances in Therapy*, 2011, 28(12): 1105-1113.

Mengesha T., Gnanasekaran N., Mehare T., Hepatoprotective effect of silymarin on fructose induced nonalcoholic fatty liver disease in male albino wistar rats; *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2021, 21(1): 1-13.

Miranda S.R., Lee J.K., Brouwer K. L., Wen Z., Smith P.C., Hawke, R.L., Hepatic metabolism and biliary excretion of silymarin flavonolignans in isolated perfused rat livers: role of multidrug resistance-associated protein 2 (Abcc2); *Drug Metabolism and Disposition*, 2008, 36(11): 2219-2226.

Monasterolo L.A., Trumper L., Elías M.M., Effects of gamma-aminobutyric acid agonists on the isolated perfused rat kidney; *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1996, 279(2): 602-607.

Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to a notification from Cognis, ADM and Cargill on vegetable oils-derived phytosterols and phytosterol esters from soybean sources pursuant to Article 6 paragraph 11 of Directive 2000/13/EC; *The EFSA Journal*, 2007, 486: 1-8.

Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to a notification from Raisio Life Sciences on plant stanol esters produced from soybean oil sterols pursuant to Article 6, paragraph 11 of Directive 2000/13/EC- for permanent exemption from labelling; *The EFSA Journal*, 2007, 571: 1-6.

Ou Q., Weng Y., Wang S., Zhao Y., Zhang F., Zhou J., Wu X., Silybin alleviates hepatic steatosis and fibrosis in NASH mice by inhibiting oxidative stress and involvement with the Nf- κ B pathway; *Digestive Diseases and Sciences*, 2018, 63: 3398-3408.

Pan G.Y., Wang G.J., Liu X D., Fawcett J.P., Xie Y.Y., The involvement of P-glycoprotein in berberine absorption; *Pharmacology & Toxicology*, 2002, 91(4): 193-197.

Pastorello E., Ortolani C., Effects of Processing and Preparation of Foods; Study on nutritional factors in food allergies and food intolerance, European Commission, Directorate-General for Research and Innovation, Publications Office, 1997.

Pirillo A., Catapano A.L., Berberina, un alcaloide vegetale con attività ipolipemizzante e ipoglicemizzante; *Giornale Italiano dell'Arteriosclerosi*, 2015; 6(4): 53-64.

Pirro M., Mannarino M.R., Bianconi V., Simental-Mendia L.E., Bagaglia F., Mannarino E., Sahebkar, A., The effects of a nutraceutical combination on plasma lipids and glucose: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials; *Pharmacological Research*, 2016, 110: 76-88.

Pisciotta L., Bellocchio A., Bertolini S., Nutraceutical pill containing berberine versus ezetimibe on plasma lipid pattern in hypercholesterolemic subjects and its additive effect in patients with familial hypercholesterolemia on stable cholesterol-lowering treatment; *Lipids in Health and Disease*, 2012, 11(123): 1-10.

Qin N., Hu X.; Li S., Wang J., Li Z., Li D., Xu F., Gao M., Hua H., Hypoglycemic Effect of Silychristin A from *Silybum marianum* Fruit via Protecting Pancreatic Islet β Cells from Oxidative Damage and Inhibiting α -Glucosidase Activity In Vitro and in Rats with Type 1 Diabetes; *Journal of Functional Foods*, 2017, 38: 168-179.

- Rao P.R., Viswanath R.K., Cardioprotective activity of silymarin in ischemia-reperfusion-induced myocardial infarction in albino rats; *Experimental & Clinical Cardiology*, 2007, 12(4): 179-187.
- Sahebkar A., Serban M.C., Gluba-Brzózka A., Mikhailidis D.P., Cicero A.F.G., Rysz J., Banach M., Lipid-modifying effects of nutraceuticals: an evidence-based approach; *Nutrition*, 2016, 32(11-12): 1179-1192.
- Sasaki S., Higashi Y., Nakagawa K., Kimura M., Noma K., Sasaki S., Hara K., Matsuura H., Goto C., Oshima T., Chayama K., A low-calorie diet improves endothelium-dependent vasodilation in obese patients with essential hypertension; *American Journal of Hypertension*, 2002, 15(4): 302-309.
- Sharma K., Bairwa R., Chauhan N., Shrivastava B., Saini N.K., Berberis aristata: a review; *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy*, 2011, 2(2): 383-388.
- Soto C., Raya L., Juárez J., Pérez J., González I., Effect of Silymarin in Pdx-1 Expression and the Proliferation of Pancreatic β -cells Cells in a Pancreatectomy Model; *Phytomedicine*, 2014, 21(3): 233-239.
- Srianta I., Zubaidah E., Estiasih T., Iuchi Y., Harijono H., Yamada, M., Antioxidant activity of pigments derived from *Monascus purpureus* fermented rice, corn, and sorghum; *International Food Research Journal*, 2017, 24(3): 1186-1191.
- Taghiabadi E., Imenshahidi M., Abnous K., Mosafa F., Sankian M., Memar B., Karimi G., Protective effect of silymarin against acrolein-induced cardiotoxicity in mice; *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 2012: 1-14.
- Ting H.H., Timimi F.K., Boles K.S., Creager S.J., Ganz P., Creager, M.A., Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus; *The Journal of Clinical Investigation*, 1996, 97(1): 22-28.
- Turner N., Li J.Y., Gosby A., To S.W., Cheng Z., Miyoshi H., Taketo M.M., Cooney G.J., Kraegen E.W., James D.E., Hu L.H., Li J., Ye J.M., Berberine and its more biologically available derivative, dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I: a mechanism for the action of berberine to activate AMP-activated protein kinase and improve insulin action; *Diabetes*, 2008, 57(5): 1414-1418.
- Wada M., Kido H., Ohyama K., Ichibangase T., Kishikawa N., Ohba Y., Nakashima K., Chemiluminescent screening of quenching effects of natural colorants against reactive oxygen species: Evaluation of grape seed, monascus, gardenia and red radish extracts as multi-functional food additives; *Food Chemistry*, 2007, 101(3): 980-986.
- Wadhwa K., Pahwa R., Kumar M., Kumar S., Sharma P.C., Singh G., Verma R., Mittal V., Singh I., Kaushik D., Mechanistic Insights into the Pharmacological Significance of Silymarin; *Molecules*. 2022; 27(16): 5327.
- Wang X., Zhang Z., Wu S.C., Health benefits of *Silybum marianum*: Phytochemistry, pharmacology, and applications; *Journal of agricultural and food chemistry*, 2020, 68(42): 11644-11664.
- Wen Z., Dumas T.E., Schrieber S.J., Hawke R.L., Fried M.W., Smith P.C., Pharmacokinetics and metabolic profile of free, conjugated, and total silymarin flavonolignans in human plasma after oral administration of milk thistle extract; *Drug Metabolism and Disposition*, 2008, 36(1): 65-72.

Wu J.W., Lin, L.C., Hung S.C., Chi C.W., Tsai T.H., Analysis of silibinin in rat plasma and bile for hepatobiliary excretion and oral bioavailability application; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, 45(4): 635-641.

Xie Y., Zhang D., Zhang J., Yuan J., Metabolism, transport and drug–drug interactions of silymarin; *Molecules*, 2019, 24(20): 3693.

Xu F., Yang J., Negishi H., Sun Y., Li D., Zhang X., Hayashi T., Gao M., Ikeda K., Ikejima T., Silibinin decreases hepatic glucose production through the activation of gut–brain–liver axis in diabetic rats; *Food & Function*, 2018, 9(9): 4926-4935.

Yin J., Xing H., Ye J., Efficacy of berberine in patients with type 2 diabetes mellitus; *Metabolism*, 2008, 57(5): 712-717.

Yuan Z.W., Li Y.Z., Liu Z.Q., Feng S.L., Zhou H., Liu, C.X., Xie, Y., Role of tangeretin as a potential bioavailability enhancer for silybin: Pharmacokinetic and pharmacological studies; *Pharmacological Research*, 2018, 128: 153-166.

Zhang B., Xu D., She L., Wang Z., Yang N., Sun R, Zhang Y., Yan C., Wei Q., Aa J., Liu B., Wang G., Xie Y., Silybin Inhibits NLRP3 Inflammasome Assembly through the NAD⁺/SIRT2 Pathway in Mice with Nonalcoholic Fatty Liver Disease; *FASEB Journal*, 2018, 32(2): 757-767.

Zhang Y., Li X., Zou D., Liu W., Yang J., Zhu N., Huo L., Wang M., Hong J., Wu P., Ren G., Ning G., Treatment of type 2 diabetes and dyslipidemia with the natural plant alkaloid berberine; *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2008, 93(7): 2559-2565.

Zhao Y., Yang Y.Y., Yang B.L., Du Y.W., Ren D.W., Zhou H. M., Wang J., Yang H.M., Wang Y.X., Zhang Y.Y., Wu, S.X., Efficacy and safety of berberine for dyslipidemia: study protocol for a randomized double-blind placebo-controlled trial; *Trials*, 2021, 22: 1-8.

Zhu S.Y., Jiang N., Yang J., Tu J., Zhou Y., Xiao X., Dong, Y., Silybum marianum oil attenuates hepatic steatosis and oxidative stress in high fat diet-fed mice; *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 100: 191-197.

Sitografia

Associazione Italiana Celiachia, <https://www.celiachia.it/celiachia/il-glutine/>

Associazione Italiana Latto-Intolleranti, <https://www.associazioneaiali.it/articolo/senza-lattosio-la-normativa>

EFSA, Food supplements, <https://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/food-supplements>

EFSA, Overview on Tolerable Upper Intake Levels as derived by the Scientific Committee on Food (SCF) and the EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2018, https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/assets/UL_Summary_tables.pdf

IPSOS, European Public Affairs, Consumers survey on food supplements in the EU, 2022, <https://www.ipsos.com/en/nutrition-pill-europeans-attitudes-towards-food-supplements>

Microbiologia Italia, <https://www.microbiologiaitalia.it/test-microbiologici/elisa-principi-delle-tecniche-immunochimiche-ed-esempi-di-saggi/>

Ministero della Salute, Autocontrollo e HACCP, (ultimo aggiornamento) 4 giugno 2019, https://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?id=1225&area=sicurezzaAlimentare&menu=igi

Ministero della Salute, Codex Alimentarius, Recommended International Code of practice general principles of food hygiene, CAC/RCP 1-1996, Rev 4-2003, https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pagineAree_1225_listaFile_itemName_4_file.pdf

Nutrienti e Supplementi, <https://www.nutrientisupplementi.it/mercato/item/2511-nell-ultimo-anno-7-italiani-su-10-hanno-utilizzato-integratori-alimentari>

Fonti legislative e normative

Regolamento (UE) 2023/915 della Commissione del 25 aprile 2023 relativo ai tenori massimi di alcuni contaminanti negli alimenti e che abroga il regolamento (CE) 1881/2006 (Testo rilevante ai fini del SEE), in GUUE L. 119/103 del 5 maggio 2023.

ISO 5725-1:2023, Application of statistics - Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results, 2023.

ISO 5725-3: 2023, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results, 2023.

Regolamento (UE) 860/2022 della Commissione del 1 giugno 2022 che modifica l'allegato III del regolamento (CE) n. 1925/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le monacoline da riso rosso fermentato (Testo rilevante ai fini del SEE), in GUUE L. 151/137 del 2 giugno 2022.

ISO 5725-4:2020, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results, 2020.

ISO 5725-2: 2019, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results, 2019.

Ministero della Salute, D.M. 10 agosto 2018, Disciplina dell'impiego negli integratori alimentari di sostanze e preparati vegetali, in GU n. 224 del 26 settembre 2018.

UNI CEI EN ISO/IEC 17025, Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura, 2018.

Regolamento (UE) n. 625/2017 del Parlamento europeo e del Consiglio del 15 marzo 2017 relativo ai controlli ufficiali e alle altre attività ufficiali effettuati per garantire l'applicazione della legislazione sugli alimenti e sui mangimi, delle norme sulla salute e sul benessere degli animali, sulla sanità delle piante nonché sui prodotti fitosanitari, recante modifica dei regolamenti (CE) n. 999/2001, (CE) n. 396/2005, (CE) n. 1069/2009, (CE) n. 1107/2009, (UE) n. 1151/2012, (UE) n. 652/2014, (UE) 2016/429 e (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio, dei regolamenti (CE) n. 1/2005 e (CE) n. 1099/2009 del Consiglio e delle direttive 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE e 2008/120/CE del Consiglio, e che abroga i regolamenti (CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE e 97/78/CE del Consiglio e la decisione 92/438/CEE del Consiglio (regolamento sui controlli ufficiali), in GUUE L.95 del 7 aprile 2017.

UNI EN ISO 9000:2000, Sistema di gestione per la qualità – Fondamenti e vocabolario, 2000, (ultima revisione ISO 2000:2015 del 23 settembre 2015).

Regolamento di esecuzione (UE) n. 828/2014 della Commissione del 30 luglio 2014 relativo alle prescrizioni riguardanti l'informazione dei consumatori sull'assenza di glutine o sulla sua presenza in misura ridotta negli alimenti (Testo rilevante ai fini del SEE), in GUUE L. 228/5 del 31 luglio 2014.

ISO 16269-6: 2014, Statistical interpretation of data, 2014.

New chapter 1210 Statistical Tools for Procedure Validation; *USP Pharmacopoeial Forum*, 2014, 40(5): 2014.

Regolamento (UE) N. 1169/2011 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 25 ottobre 2011 relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori, che modifica i regolamenti (CE) n. 1924/2006 e (CE) n. 1925/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio e abroga la direttiva 87/250/CEE della Commissione, la direttiva 90/496/CEE del Consiglio, la direttiva 1999/10/CE della Commissione, la direttiva 2000/13/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 2002/67/CE e 2008/5/CE della Commissione e il regolamento (CE) n. 608/2004 della Commissione (Testo rilevante ai fini del SEE), in GUUE L. 304/18 del 22 novembre 2011.

UNI EN 15633-1:2009, Prodotti alimentari – Ricerca di allergeni alimentari mediante metodi immunologici, 2009.

Regolamento (CE) 1333/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio del 16 dicembre 2008 relativo agli additivi alimentari, in GUUE L.354 del 31 dicembre 2008.

Regolamento (CE) 1925/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio del 20 dicembre 2006 sull'aggiunta di vitamine e minerali e di talune altre sostanze agli alimenti, in GUUE L. 404/26 del 30 dicembre 2006.

Art. 8 Regolamento (CE) n. 1925/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio del 20 dicembre 2006 sull'aggiunta di vitamine e minerali e di talune altre sostanze agli alimenti, in GUUE L. 404/31 del 30 dicembre 2006.

Allegato III Regolamento (CE) n. 1925/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio del 20 dicembre 2006 sull'aggiunta di vitamine e minerali e di talune altre sostanze agli alimenti, in GUUE L. 404/38 del 30 dicembre 2006.

ICH Harmonized Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), Current Step 4 version, novembre 2005.

Art. 1 D.Lgs. 21 maggio 2004 n. 169, Attuazione della direttiva 2002/46/CE relativa agli integratori alimentari, in GU n.164 del 15 luglio 2004.

Regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale, in GUUE L. 139 del 30 aprile 2004.

Regolamento (CE) n. 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 sull'igiene dei prodotti alimentari, in GUUE L.139 del 30 aprile 2004.

ICH Harmonized Tripartite Guideline, Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2), Current Step 4 version, 6 febbraio 2003.

Direttiva 2002/46/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 10 giugno 2002 per il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative agli integratori alimentari, in GUCE L.183 del 12 luglio 2002.

Allegato I Direttiva 2002/46/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 10 giugno 2002 per il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative agli integratori alimentari, in GUCE L.183/55 del 12 luglio 2002.

Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare, in GU L.31/1 del 1 febbraio 2002. (Modificato da: M1 Regolamento (CE) n. 1642/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 luglio 2003 L 245/4 29.9.2003; M2 Regolamento (CE) n. 575/2006 della Commissione del 7 aprile 2006 L 100/ 3 8.4.2006; M3 Regolamento (CE) n. 202/2008 della Commissione del 4 marzo 2008 L 60/17 5.3.2008; M4 Regolamento (CE) n. 596/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio del 18 giugno 2009 L 188/14 18.7.2009; M5 Regolamento (UE) n. 652/2014 del Parlamento europeo e del Consiglio del 15 maggio 2014 L 189/1 27.6.2014; M6 Regolamento (UE) 2017/228 della Commissione del 9 febbraio 2017 L 35/10 10.2.2017; M7 Regolamento (UE) 2019/1243 del Parlamento europeo e del Consiglio del 20 giugno 2019 L 198/241 25.7.2019; M8 Regolamento (UE) 2019/1381 del Parlamento europeo e del Consiglio del 20 giugno 2019 L 231 1 6.9.2019 relativo alla trasparenza e alla sostenibilità dell'analisi del rischio dell'Unione nella filiera alimentare, e che modifica i regolamenti (CE) n. 178/2002, (CE) n. 1829/2003, (CE) n. 1831/2003, (CE) n. 2065/2003, (CE) n. 1935/2004, (CE) n. 1331/2008, (CE) n. 1107/2009, (UE) 2015/2283 e la direttiva 2001/18/CE).

ISO 5725-5:1998, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results, 1998.

D.lgs. 26 maggio 1997, n. 155, Attuazione delle direttive 93/43/CEE e 96/3/CE concernenti l'igiene dei prodotti alimentari, in GU n. 136 del 13 giugno 1997.

ISO 11095:1996, Linear calibration using reference materials, 1996.

ICH Q2A "Note for guidance on validation of analytical procedures: definitions and terminology" (CPMP/ICH/381/95), 1995.

ICH Q2B "Note for guidance on validation of analytical procedures: methodology" (CPMP/ICH/281/95), 1995.

ISO 5725-6: 1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results, 1994.

Direttiva 43/93/CEE del Consiglio del 14 giugno 1993 sull'igiene dei prodotti alimentari, in GUCE L.175 del 19 luglio 1993.

Ringraziamenti

Ringrazio il mio relatore, Prof.ssa Simona Martinotti, per la grande disponibilità dimostrata nell'accompagnarmi in questa ultima fase del mio percorso universitario, per il suo prezioso incoraggiamento e aiuto.

Ringrazio la Dott.ssa Patrizia Fornasari, che mi ha permesso di compiere i primi passi all'interno di una realtà lavorativa e di acquisire capacità e competenze fondamentali per il mio futuro.

Ringrazio i dipendenti di Meda Pharma, con cui ho avuto l'opportunità di collaborare, per la professionalità, il supporto e il grande senso di accoglienza dimostrati durante i mesi di tirocinio.

Ringrazio la mia famiglia e Giulia per essere sempre stati presenti nei momenti felici, di difficoltà o di smarrimento e per avere condiviso con me il raggiungimento di questo importante traguardo.

Ringrazio i miei amici per avermi sempre sostenuto e spronato a dare il massimo.