

LIQUIDI DI RICARICA PER LA SIGARETTA ELETTRONICA: METODI DI PROVA E CRITERI DI CONTROLLO

Rosanna Mancinelli, Luca Palleschi, Marco Famele, Carolina Ferranti, Carmelo Abenavoli, Rosa Draisci
Centro Nazionale Sostanze Chimiche, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Gli *Electronic Nicotine Delivery Systems* (ENDS) sono dispositivi elettronici simili a sigarette, alimentati a batterie, che vaporizzano dei liquidi appositamente preparati (liquidi di ricarica/*e-juice* oppure *e-liquid*) producendo un vapore simile al fumo di tabacco che viene inalato dall'utilizzatore. I liquidi di ricarica possono essere privi di nicotina o contenenti nicotina a concentrazioni diverse, insieme a varie sostanze umettanti e aromatizzanti. Il principio di funzionamento degli ENDS non si basa sulla combustione e quindi gli utilizzatori non espongono se stessi od altri a molti dei costituenti pericolosi del fumo di tabacco prodotti dalle normali sigarette. Per questo gli ENDS sono stati proposti sul mercato come strumenti utili a ridurre gli effetti dannosi del fumo. Un'altra funzione proposta per gli ENDS è quella di ausilio per smettere di fumare.

Alcuni studi recenti riguardo gli effetti degli ENDS sulla astinenza e sul *craving* (desiderio compulsivo) da tabacco sembrano suggerire buone potenzialità come aiuto nella disassuefazione dal fumo, ma i risultati necessitano di essere ulteriormente approfonditi con osservazioni a lungo termine (1-2).

Attualmente l'uso delle sigarette elettroniche (o e-cig, *electronic cigarette*) viene proposto principalmente ai fini della riduzione del danno per diminuire il rischio di patologie, tra cui malattie respiratorie e cardiovascolari, dovute all'esposizione attiva e passiva al fumo derivato dalla combustione del tabacco. Il problema della riduzione del danno da fumo è stato affrontato già da tempo dall'industria farmaceutica che nel corso degli anni ha proposto come soluzione farmaci e prodotti sostitutivi della nicotina quali cerotti, gomme da masticare, compresse, ecc.

La soluzione proposta dagli ENDS è sicuramente innovativa perché, oltre a consentire la somministrazione di nicotina senza combustione, conserva anche le caratteristiche morfologiche della sigaretta e quindi la gestualità e le abitudini del fumatore. Questo aspetto è fondamentale perché, rispetto ad altri metodi potenzialmente alternativi al fumo tradizionale, l'uso degli ENDS consente al fumatore stesso una maggior soddisfazione sensoriale complessiva.

La diffusione degli ENDS ha subito un forte incremento già a partire dal 2007, anno di introduzione sul mercato statunitense.

Il potere regolatorio della *Food and Drug Administration* (FDA) su questi articoli è limitato alla loro classificazione come prodotti del tabacco dal momento che i produttori non dichiarano un effetto terapeutico, come accade invece nel caso delle terapie sostitutive di nicotina.

In mancanza di una collocazione legislativa, l'uso, la sicurezza, il contenuto di sostanze chimiche e l'efficacia degli ENDS sono ancora oggetto di ampio dibattito nella comunità scientifica (3).

Le non poche perplessità suscitate dal rapido e ampio diffondersi dell'uso di questi articoli hanno indotto anche l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e la FDA ad intervenire nel dibattito con documenti specificamente dedicati a questo argomento (4-5).

Cartucce e liquidi di ricarica

Molti degli effetti tossici dovuti al fumo di sigaretta, come ad esempio lo stress ossidativo, derivano dal processo di combustione. Negli ENDS non ha luogo il processo di combustione e il liquido è vaporizzato e inalato dall'utilizzatore.

Nonostante le sigarette elettroniche in commercio presentino forme differenti, esse risultano generalmente costituite dagli stessi componenti: un filtro, un atomizzatore, una batteria ricaricabile e un circuito elettronico interno.

Il filtro, costituito da materiale plastico, ospita al suo interno una cartuccia contenente il liquido di ricarica. Il filtro può essere riutilizzato sostituendo la cartuccia presente al suo interno con una cartuccia nuova (cartuccia monouso).

In alcuni casi cartuccia e atomizzatore sono combinati in una singola unità chiamata cartomizzatore, dall'inglese "cartomizer".

I nuovi modelli di sigarette sono invece dotati di un serbatoio denominato "tank" che consente una vaporizzazione diretta del liquido. Tale serbatoio, completamente trasparente o dotato di una finestrella per il controllo del livello del liquido, può essere in un unico blocco con l'atomizzatore e costituisce uno dei sistemi attualmente più diffusi (clearomizzatore, dall'inglese "clearomizer"). Il serbatoio viene riempito dall'utilizzatore con liquidi di ricarica premiscelati o miscelati autonomamente. Un fenomeno possibile è il cosiddetto *dry puff* che si verifica quando il liquido è insufficiente per lo stoppino dell'atomizzatore e si genera un aumento di temperatura. Questo fenomeno è percepito dall'utilizzatore come uno sgradevole odore di bruciato che si evita riducendo la durata del tiro (*puff*) e aumentando l'intervallo tra le boccate.

Le procedure di aromatizzazione delle ricariche per renderne più gradevole il gusto, come pure i dispositivi per la produzione di vapore, sono ampiamente variabili da Paese a Paese e da produttore a produttore.

I liquidi di ricarica possono essere facilmente acquistati da venditori diversi, tramite Internet, nei centri commerciali e nei negozi specializzati, e sono composti principalmente da una base di propilene glicole e glicerina vegetale, aromatizzanti ed eventualmente nicotina in concentrazioni variabili comunemente da 6 mg/mL a 36 mg/mL. Sia il propilene glicole che il glicerolo sono classificati da FDA e FEMA (*Flavor and Extracts Manufacturers Association*) come additivi "generalmente riconosciuti come sicuri" per uso alimentare e sono usati anche nelle sigarette di tabacco come umettanti anche se possono essere pirolizzati ad acroleina e formaldeide (6).

Le sostanze aromatizzanti contenute nelle ricariche sono di solito quelle autorizzate per l'industria alimentare. Alcune ditte riportano anche l'uso di estratto naturale di tabacco come additivo nei liquidi all'aroma di tabacco ma questo aromatizzante non è approvato per uso alimentare. Data l'estrema variabilità di questi liquidi, sia per produzione che per composizione, è necessario valutare potenziali effetti negativi dovuti ai liquidi stessi e/o al vapore da essi generato. Infatti, mentre gli effetti negativi della sigaretta convenzionale sono molto ben documentati, ancora pochi studi sono stati condotti sugli ENDS e sui liquidi di ricarica. Il propilene glicole e la glicerina, i principali ingredienti dei liquidi di ricarica, non sono considerati dannosi ma essi costituiscono solo una parte del liquido di ricarica che spesso non è adeguatamente etichettata. Ad esempio, le verifiche sperimentali hanno dimostrato la presenza di nicotina anche in liquidi di ricarica etichettati come *nicotine free* (7).

Gli additivi come nicotina e aromatizzanti variano anche all'interno di prodotti che dall'etichetta risultano di uguale marca e uguale aroma, e inoltre possono essere presenti dei contaminanti dovuti al processo di produzione. Per quello che se ne sa ad oggi, la tossicità a breve termine sembra essere bassa ma non si conosce la tossicità a lungo termine.

Come già riportato, la reale efficacia degli ENDS per smettere di fumare non è supportata da sufficienti dati clinici soprattutto a lungo termine. Gli ENDS non sono soggetti a regolamentazioni e quindi non devono essere sottoposti a tutti i rigorosi test necessari per assicurare sicurezza ed efficacia d'uso e per verificare la minore pericolosità rispetto alle sigarette di tabacco.

Metodi per la determinazione di nicotina

Le indagini di laboratorio effettuate nei liquidi di ricarica, pur se ancora limitate, dimostrano che in alcuni casi sono presenti impurità o componenti tossici e che non sempre il contenuto corrisponde a quanto riportato in etichetta. Inoltre, non ci sono normative cogenti per la fabbricazione degli ENDS, pur essendoci molti produttori in gran parte in Cina, Europa e USA. Inoltre gli ENDS non sono prodotti secondo gli standard imposti ai farmaci o ai dispositivi di somministrazione dei farmaci.

Elementi di base presenti nei liquidi sono la nicotina e relative impurezze, il propilene glicole e le sue impurezze (diethylene glicole e etilene glicole) e la glicerina. La nicotina impiegata è estratta dal tabacco e il processo di estrazione può produrre delle impurezze. Secondo la Farmacopea Europea, la nicotina per uso farmaceutico può contenere fino a 0,3% di ciascuna impurezza (anatabina, beta-nicotirina, cotinina, miosmina, nicotina-*N*-ossido, normicotina, anabasina) più lo 0.1% di impurezze varie per un totale non superiore a 0,8%. Poco si sa riguardo gli *e-juice* ed è necessario incentivare gli studi sperimentali per verificare se essi siano conformi ai requisiti europei.

L'elevato numero di prodotti e di marche presenti sul mercato rende difficile la selezione di un campione realmente rappresentativo. La determinazione della nicotina e delle sue impurezze può essere effettuata tramite differenti tecniche analitiche, quali quelle basate sulla cromatografia liquida accoppiata alla spettrofotometria nell'ultravioletto (*High Performance Liquid Chromatography – Ultra Violet*, HPLC-UV) o alla spettrometria di massa e spettrometria di massa tandem (*Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*: LC-MS, LC-MS/MS). Inoltre possono essere utilizzate anche tecniche gas-cromatografiche con rivelatori a ionizzazione di fiamma (*Gas Chromatography- Flame Ionization Detector*, GC-FID), a spettrometria di massa e a spettrometria di massa tandem (GC-MS/MS, GC-MS).

Il metodo pubblicato sulla Farmacopea americana (*United States Pharmacopoeia*, USP) per la determinazione della purezza della nicotina per preparati farmaceutici (*chromatographic purity*) (8) prevede l'analisi in GC-FID, mentre la Farmacopea europea prevede l'utilizzo di un metodo HPLC-UV (9). In un rapporto emesso dalla Divisione di Analisi Farmaceutica della FDA nel 2009, in seguito alla richiesta da parte dell'*Office Compliance* di analizzare due marche di sigarette elettroniche per verificarne il contenuto di nicotina e impurezze, è stata utilizzata come procedura analitica quella pubblicata nella sezione *Nicotine Transdermal System Assay* della USP, che prevedeva l'estrazione dalle cartucce tramite due differenti solventi prima dell'analisi in HPLC-UV (10).

Uno studio pubblicato nel 2012 sulla rivista *Tobacco Control* (11) in cui sono stati testati i contenuti di nicotina e glicoli di alcune sigarette elettroniche in commercio, ha dimostrato che le informazioni riportate sulle confezioni delle cartucce erano limitate e incomplete. In particolare si evinceva una difformità tra il reale contenuto di nicotina e quanto dichiarato in etichetta.

Più recentemente, uno studio pubblicato sulla rivista *Addiction* nel 2013 (12) ha evidenziato che il numero delle difformità riscontrate tra il contenuto di nicotina dichiarato e quello effettivamente presente nei prodotti in commercio si è ridotto rispetto agli anni precedenti,

indicando che nel corso degli anni si è verificato un progressivo miglioramento dei processi di produzione.

Sviluppo e validazione di un metodo HPLC-MS/MS per la determinazione di nicotina in cartucce e liquidi di ricarica per e-cig

Per la verifica della conformità delle etichette di *e-liquid* e di cartucce in commercio rispetto al contenuto di nicotina, nel laboratorio del Centro nazionale Sostanze Chimiche (CSC) dell'Istituto Superiore di Sanità è stato sviluppato e validato un metodo basato sulla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS). La LC-MS/MS è stata scelta in quanto essa costituisce un rapido, sensibile e selettivo mezzo per la determinazione di tale alcaloide. Inoltre, numerosi sono i metodi presenti in letteratura scientifica sviluppati con questa tecnica analitica per la determinazione del contenuto di nicotina e suoi metaboliti sia in relazione al tabacco e al fumo di tabacco, sia negli *e-liquid* (13-17).

Preparazione dei campioni

Le modalità operative per la preparazione dei campioni per l'analisi strumentale in LC-MS/MS sono differenti per gli *e-liquid* rispetto alle cartucce, per queste ultime infatti il liquido di ricarica è adsorbito su di un supporto (tampone in cotone). Pertanto, la fase preparativa del campione è preceduta dalle operazioni di estrazione del liquido. Generalmente una cartuccia monouso contiene un tampone di cotone imbevuto di *e-liquid* e ha una forma cilindrica, aperta alle due estremità: un'estremità è collegata al corpo della sigaretta elettronica mentre l'altra serve per aspirare, fungendo da bocchino. Nei primi modelli di sigarette elettroniche, le cartucce erano scorperate dall'atomizzatore. In questa tipologia, la cartuccia contiene a una delle due estremità un tappo di protezione di materiale plastico da rimuovere quando essa viene inserita nell'atomizzatore. La rimozione del tappo permette di accedere al tampone che può essere facilmente estratto attraverso l'utilizzo di pinzette per poter essere analizzato (16). Nei modelli più recenti di sigarette elettroniche, atomizzatore e cartuccia sono stati assemblati in un'unica unità detta "cartomizzatore". Questa tipologia di cartuccia è dotata di un'estremità metallica fissa da avvitare direttamente alla batteria della sigaretta elettronica. L'elemento riscaldante, costituito da un filamento di rame, è avvolto dalle fibre di cotone del tampone alloggiato all'interno di un cilindretto metallico (16, 18). In questo caso, il tampone può essere estratto mediante pinzette solo dopo la rimozione forzata dell'estremità metallica e dopo recisione dei fili del circuito elettronico che corrono lungo l'elemento riscaldante. I cartomizzatori risultano essere più sicuri per l'utilizzatore in quanto sono sigillate da una estremità metallica e impediscono all'utilizzatore stesso di entrare in contatto con il liquido. Diversamente, nelle cartucce sprovviste di elemento riscaldante e prive di un sigillo sicuro può accadere che il liquido assorbito sul tampone si depositi sul tappo di gomma e/o fuoriesca dalla cartuccia stessa. Ciò costituisce un rischio per il consumatore specialmente nel caso di liquidi ad alto contenuto di nicotina.

Il recupero del liquido assorbito può avvenire strizzando semplicemente il tampone o sottoponendolo a centrifugazione. I liquidi, essendo altamente viscosi a causa dell'elevato contenuto di propilene glicole (circa 90% del liquido), possono rendere difficoltosa la preparazione del campione: l'esatto volume è difficile da "pipettare" e può portare a campioni

non omogenei, producendo differenze nelle determinazioni analitiche (12). Pertanto è necessario prelevare l'aliquota da destinare all'analisi mediante opportuna microsiringa in vetro per ottenere un dato più accurato e ripetibile. Il liquido, diluito con metanolo e, dopo aggiunta di standard interno, è sottoposto ad analisi in LC-MS/MS. In alternativa, il liquido può essere recuperato anche trasferendo il tampone in becker contenente metanolo o etanolo, ed estraendo sotto agitazione magnetica (16). Un'aliquota dell'estratto viene successivamente prelevata, addizionata con lo standard interno e sottoposta ad analisi. Nel caso si ricorra ad estrazione con solvente, la procedura analitica permetterà di ricavare solo la quantità assoluta di nicotina (mg di nicotina per cartuccia) e non la concentrazione, poiché sulle confezioni delle cartucce non viene riportato il volume di liquido. Nel caso di cartucce dotate di tappo rimovibile di materiale plastico (silicone), può determinarsi un adsorbimento di parte della nicotina e quindi una sottostima del contenuto presente nella cartuccia (16). Pertanto in questo caso, è buona norma porre nel contenitore di estrazione non solo il tampone ma tutte le parti in materiale plastico e non, con cui il tampone entra in contatto.

I liquidi di ricarica (*e-liquid*) non adsorbiti su tamponi, vengono sottoposti direttamente ad analisi dopo opportuna diluizione e aggiunta dello standard interno.

Analisi strumentale

Il metodo sviluppato dal CSC per l'analisi in LC-MS/MS, prevede l'eluizione isocratica a temperatura ambiente su colonna a fase inversa *Synergi Polar RP 80 A (Phenomenex)* 250 mm x 4.60 mm I.D., 4 μ m. La fase mobile è costituita da una soluzione di acido formico allo 0.1% (fase mobile A, 30%) e acetonitrile (fase mobile B, 70%) con flusso 0.6 mL/min e il tempo di analisi è 12 minuti. Lo spettrometro di massa è un triplo quadrupolo API 3000 con sorgente *Turbo IonSpray* operante in modalità ioni positivi e alla temperatura di 400 °C.

Le soluzioni utilizzate per la costruzione della curva di taratura sono preparate, attraverso diluizioni seriali, a partire da soluzioni in metanolo a 10 mg/mL di nicotina e di standard interno (SI). Come SI è stato utilizzata la (\pm)-nicotina-(piridina- d_4) di purezza e contenuto di atomi di deuterio pari a 98%. Le soluzioni di lavoro, preparate giornalmente, vengono conservate al buio e a 4 °C. Le soluzioni madre di nicotina e SI vengono analizzate ad intervalli regolari entro sei mesi dalla preparazione per verificare la stabilità e l'assenza di prodotti di degradazione.

L'identificazione degli analiti è effettuata secondo criteri basati sia sulla cromatografia (tempo di ritenzione relativo) che sulla spettrometria di massa (due transizioni ione precursore - ione prodotto e intensità ioniche). Lo ione più abbondante nello spettro di massa ottenuto in Q_1 -scan è rappresentato da $[M+H]^+$ per nicotina e (\pm) - nicotina-(piridina- d_4). Gli ioni precursori, selezionati nel primo quadrupolo Q_1 , sono ulteriormente frammentati nel secondo quadrupolo Q_2 . Gli ioni prodotto (Tabella. 1) così ottenuti sono selezionati registrando uno spettro di massa in Q_3 -scan.

Tabella1. Transizioni per la nicotina e la nicotina- d_4

Analita	Transizioni
Nicotina	163,2 m/z > 130,0 m/z 163,2 m/z > 117,0 m/z
(\pm) - Nicotina-(piridina- d_4)	167,1 m/z > 134,0 m/z 167,1 m/z > 121,3 m/z

Gli ioni 130.0 m/z e 134.4 m/z rappresentano rispettivamente gli ioni prodotto più abbondanti per la nicotina e nicotina deuterata e derivano da successive frammentazioni dello ione precursore in seguito a perdite consecutive di CH_3NH_2 e H_2 (19). I parametri strumentali sono stati ottimizzati in modalità MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) per ciascuna transizione monitorata al fine di ottenere la più alta sensibilità per entrambi gli analiti.

L'analisi quantitativa viene effettuata impiegando curve di taratura in matrice costruite riportando i rapporti delle aree misurate dello ione prodotto selezionato per l'analita e dello standard interno in funzione dei rapporti delle loro rispettive concentrazioni, usando il modello della regressione lineare dei minimi quadrati.

Per la costruzione della curva di taratura, campioni di matrice bianca vengono addizionati con soluzioni standard di nicotina, al fine di ottenere attraverso diluizioni seriali cinque livelli di concentrazione (1,0 ng/mL, 2,5 ng/mL, 5,0 ng/mL, 10,0 ng/mL, 20,0 ng/mL). Se il valore riscontrato nella misura di un campione risulta superiore a quello corrispondente al livello più alto della curva di taratura, è necessario diluire ulteriormente il campione. Il fattore di diluizione dei campioni dipenderà dalla quantità presunta di nicotina presente all'interno del liquido. La matrice bianca può essere rappresentata da liquidi di ricarica commercialmente disponibili in cui è stata verificata la completa assenza di nicotina o da semplice propilene glicole. Il metodo è stato validato (20) attraverso valutazione di parametri sia qualitativi e che quantitativi. Il limite di rivelazione (LOD) e di quantificazione (LOQ) sono pari rispettivamente a 0,3 ng/mL e 1,0 ng/mL. I valori di precisione, espressi come coefficienti di variazione *intra-day* (CV%), risultano al di sotto dell'11% al valore del LOQ mentre i valori di CV% *intra-day* agli altri livelli di validazione (10 ng/mL e 20 ng/mL) sono compresi tra 4% e 6%. I valori di ripetibilità *inter-day* sono al di sotto del 12% al LOQ e al di sotto del 6% agli altri livelli di validazione.

L'esattezza del metodo è stata valutata utilizzando un materiale di riferimento certificato (nicotina 99,7%, *LGC Standards*) e applicando un test statistico *t-Student* ad un livello di probabilità del 95%.

Valutazione del contenuto di nicotina in liquidi e cartucce di ricarica disponibili in commercio

Sono stati analizzati oltre 30 campioni tra le tre tipologie possibili: *e-liquid*, cartucce di ricarica e sigarette usa e getta corrispondenti a 6 diverse tipologie di sigarette elettroniche. Il contenuto di nicotina variava in un intervallo compreso tra 85.0 – 114.5% rispetto al contenuto dichiarato. Tali difformità nel contenuto riflettono probabilmente l'assenza di standard di produzione obbligatori. Nonostante le difformità riscontrate, non sono stati rilevati casi in cui la quantità di nicotina dichiarata fosse differente da quella determinata ai fini della etichettatura tossico/nocivo.

Si ravvisa inoltre la presenza di tracce di nicotina in circa il 43% dei campioni “*nicotina zero*” in un intervallo di concentrazione compreso tra 1,2 - 16,6 $\mu\text{g/mL}$. Tali valori risultano inferiori al limite di concentrazione di 0,1% che comporta la classificazione delle miscele contenenti nicotina come “nocivo per contatto con la pelle”, secondo i criteri del Regolamento CE n. 1272/2008 (*Classification, Labelling and Packaging, CLP*) e dei decreti legislativi n. 52/1997 e n. 65/2003 relativi alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura rispettivamente delle sostanze e dei preparati pericolosi. Pertanto la concentrazione di nicotina in questi campioni è tale da non comportare la classificazione della miscela come pericolosa.

Qualità del dato e interpretazione del risultato

Le attività analitiche relative ai liquidi di ricarica per la sigaretta elettronica rientrano nelle attività analitiche di controllo previste dai Regolamenti REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) e CLP per la verifica della conformità alle restrizioni dell'allegato XVII del REACH, la ricerca di sostanze estremamente preoccupanti, la verifica della conformità delle sostanze, delle miscele e degli articoli, nonché la verifica dell'applicazione dei criteri di classificazione ed etichettatura delle sostanze e miscele.

Altre attività di prova possono comprendere i controlli richiesti dalle Autorità competenti per situazioni sospette, allerte e/o emergenze sanitarie. I laboratori preposti ad effettuare le analisi nell'ambito del controllo ufficiale sono tra l'altro le Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA), i Laboratori di Sanità Pubblica (LSP) e l'Istituto Superiore di Sanità (ISS). In tale contesto, pur non essendo esplicitamente previsto da disposizioni cogenti europee e nazionali, si ritiene necessario che i laboratori preposti ai controlli in ambito REACH/CLP operino conformemente ai criteri generali di funzionamento previsti dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 (di seguito norma 17025) "Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura", con particolare riferimento alla validazione dei metodi di prova, alla stima dell'incertezza di misura e all'assicurazione della qualità dei dati.

La validazione è la conferma attraverso l'esame e l'apporto di evidenza oggettiva che i requisiti particolari per l'utilizzazione prevista siano soddisfatti (punto 5.4.5.1 della norma 17025).

La validazione di un metodo comprende attività quali la specifica dei requisiti, la determinazione delle caratteristiche/parametri del metodo, il controllo che i requisiti siano soddisfatti utilizzando il metodo e l'elaborazione della dichiarazione di validità. Il laboratorio deve pertanto chiarire innanzitutto i requisiti per l'idoneità all'uso dei metodi di prova nella fase precedente agli studi di validazione. Può a tal fine utilizzare quanto specificato in norme, leggi, decreti, decisioni, direttive e regolamenti UE, parametri di prestazione di metodi di riferimento, linee guida nazionali o internazionali, criteri fissati dalla direzione del laboratorio in base ad esigenze di carattere economico e di mercato, o richieste specifiche del cliente. Il laboratorio prima dell'utilizzo di metodi normati e ufficiali, deve dimostrare che le sue prestazioni (in termini di precisione ed esattezza) siano compatibili con quelle riportate sul metodo e verificarne il mantenimento nel tempo. Per i metodi di prova ufficiali o normalizzati che non riportino i dati di precisione ed esattezza, il laboratorio determina la propria ripetibilità ed esattezza, eseguendone la verifica del mantenimento nel tempo, e verifica inoltre che tale ripetibilità sia congruente con eventuali disposizioni normative cogenti. In assenza di tali disposizioni la ripetibilità *target* può essere definita dal laboratorio sulla base di altre specifiche riscontrabili per analoghe matrici o analoghi analiti. Il laboratorio è tenuto a validare i metodi sviluppati internamente, i metodi non normati e i metodi normati e ufficiali qualora essi siano utilizzati al di fuori del proprio campo di applicazione, modificati dal laboratorio o che non riportino una adeguata validazione (caratteristiche di prestazione del metodo non determinate).

Il laboratorio deve registrare i dati ottenuti, le procedure utilizzate per la validazione, così come una dichiarazione circa la validità del metodo per l'utilizzo previsto. I metodi di prova sviluppati dal laboratorio, sono metodi messi a punto o adottati dal laboratorio sulla base di conoscenze desunte dalla letteratura scientifica e/o dall'esperienza pratica. I metodi sviluppati dal laboratorio devono essere interamente validati indicando, ove possibile, tutti i parametri che descrivono le caratteristiche del metodo analitico (punto 5.4.5.3 della norma 17025). Nel caso del controllo sui liquidi di ricarica per le sigarette elettroniche relativamente ai parametri nicotina e benzene, non ci sono ancora metodi normati o emessi da organizzazioni tecniche rinomate nazionale e internazionali per questa particolare matrice. Ai fini della valutazione del

contenuto di nicotina in tale matrice il laboratorio del CSC ha sviluppato un metodo in LC-MS/MS idoneo allo scopo. Il metodo è stato validato in accordo ai criteri stabiliti dalla norma 17025 che prevede caratteristiche di prestazioni quali: selettività/specificità, limite di rilevabilità (*Limit Of Detection*, LOD), limite di quantificazione (*Limit Of Quantification*, LOQ), intervallo di lavoro e intervallo di linearità, precisione (ripetibilità e riproducibilità), accuratezza, sensibilità, robustezza, recupero, incertezza di misura. L'incertezza di misura è definita come un parametro non negativo che caratterizza la dispersione dei valori di una grandezza attribuiti ad un misurando, sulla base delle informazioni utilizzate. L'intervallo di incertezza di misura fornisce indicazioni sulle prestazioni del metodo nel laboratorio. La norma 17025 richiede che il laboratorio implementi procedure per la stima dell'incertezza dei propri risultati e dichiari l'incertezza di misura nel rapporto di prova quando tale informazione può essere rilevante ai fini delle decisioni che devono essere prese in base al risultato ottenuto. In particolare il risultato relativo alla concentrazione di nicotina negli *e-liquid*, deve essere associato all'incertezza per poter correttamente valutare la conformità o meno della etichettatura.

Esistono differenti approcci per il calcolo dell'incertezza di misura, ma in ogni caso questa viene espressa come incertezza estesa nelle stesse unità di misura del risultato di prova. In conformità al documento EA-4/16, viene riportata sul Rapporto di Prova una dichiarazione relativa al livello di fiducia e al fattore di copertura utilizzato per il calcolo dell'incertezza estesa (è generalmente accettato utilizzare un fattore di copertura $k = 2$ che per una distribuzione normale fornisce un livello di fiducia del 95%). La stima dell'incertezza di misura ha importanti implicazioni nell'interpretazione dei risultati analitici soprattutto in presenza di un limite di legge, come nel caso degli *e-liquid* ai fini della classificazione di pericolosità. In generale l'interpretazione del risultato accompagnato dall'incertezza di misura ai fini del confronto con limiti di legge dovrebbe essere quanto più possibile uniforme, per garantire l'applicazione univoca delle normative a livello nazionale e internazionale, in particolare per quanto riguarda la protezione della salute dei consumatori e la libera circolazione delle merci. La norma 17025 a tal proposito specifica che i rapporti di prova devono contenere per l'interpretazione dei risultati di prova, quando pertinente, una dichiarazione circa la conformità/non conformità ai requisiti e/o alle specifiche. In assenza di disposizioni specifiche, non è possibile applicare un criterio generale per l'interpretazione del risultato rispetto alla dichiarazione (o meno) di conformità con un limite. L'interpretazione del risultato dovrà tenere conto delle particolari situazioni, del contesto legislativo e dei rischi associati con le decisioni prese. Indicazioni generali a questo riguardo sono contenute nella linea guida ILAC-G8.

La qualità dei dati analitici e la loro corretta valutazione richiedono che il laboratorio applichi un sistema di gestione della qualità che includa procedure di controllo qualità interno ed esterno, utilizzo regolare di materiali di riferimento e la partecipazione a programmi di confronto interlaboratorio o prove valutative, analisi periodica dei dati del controllo qualità, in modo tale che le tendenze siano rilevabili (carte di controllo). La partecipazione a circuiti interlaboratorio è fondamentale per consentire la valutazione delle prestazioni del laboratorio per prove specifiche e il loro monitoraggio, e l'identificazione di problemi correlati a procedure di prova inadeguate, all'efficacia della formazione del personale e alla taratura delle apparecchiature.

Conclusioni

Lo stato dell'arte dimostra che, nell'ambito dello studio degli effetti della sigaretta elettronica, sono necessari ulteriori ricerche per verificare i risultati già ottenuti e per sviluppare modelli sperimentali che consentano lo studio degli effetti dei vapori e non solo dei liquidi. Il

vapore rappresenta infatti la principale via di esposizione per i consumatori e dal punto di vista sperimentale non c'è ancora consenso sulle procedure per il campionamento dei vapori provenienti dagli ENDS, e sui modelli che consentano di ottenere una simulazione il più possibile realistica delle condizioni di esposizione umana.

Gli studi condotti sino ad oggi sono limitati al contenuto di sostanze potenzialmente tossiche nei liquidi, e scarsi sono le valutazioni effettuate sul vapore e sugli effetti in vivo. Inoltre i dati disponibili riguardano solamente gli effetti a breve termine degli ENDS e poco o nulla sappiamo sugli effetti a lungo termine. Allo stato attuale la ricerca quali-quantitativa delle sostanze contenute nei liquidi di ricarica appare un punto di partenza essenziale per la valutazione dei rischi connessi all'uso sistematico di *e-liquid*, al contatto accidentale con essi e all'esposizione al vapore da essi generato. Risulta quindi necessario ottimizzare e armonizzare le condizioni preanalitiche e analitiche per la determinazione quali-quantitativa dei componenti chimici dei liquidi di ricarica incluso l'eventuale contenuto di nicotina e la presenza di contaminanti potenzialmente pericolosi come, ad esempio, il benzene.

Bisogna anche considerare che, a prescindere dalle quantità di nicotina presenti all'interno della sigaretta elettronica, sono disponibili in commercio interi flaconi di liquidi contenenti fino a 1700 mg di nicotina che vengono utilizzati per le preparazioni "fai da te". Queste quantità sono estremamente pericolose poiché è noto che la dose minima letale di nicotina in seguito ad esposizione acuta è pari a 40-60 mg (0,8-1,0 mg per kg di peso corporeo negli adulti non fumatori) e sono sufficienti dosi molto minori per avere effetti tossici, quindi anche 3 o 4 mg se assorbiti rapidamente, potrebbero produrre fenomeni rilevanti. In pratica, un flacone contenente 1700 mg di nicotina contiene circa 20 volte la dose letale (21).

Le attività di ricerca dell'ISS quale ulteriore contributo allo sviluppo di metodi per la ricerca di ingredienti e di contaminanti, potranno fornire ulteriori elementi su questa problematica di grande impatto sulla salute pubblica e potranno contribuire in modo significativo all'individuazione di strategie di prevenzione e riduzione del danno.

Bibliografia

1. Etter JF, Bullen C. A longitudinal study of electronic cigarette users. *Addict Behav* 2014;39(2):491-4.
2. Bullen C, Howe C, Laugesen M, McRobbie H, Parag V, Williman J, Walker N. Electronic cigarettes for smoking cessation: a randomised controlled trial. *Lancet* 2013;382(9905):1629-37.
3. Rankin KV. E-cigarettes: What's known, what's unknown. *Tex Dent J* 2013;130(5):446-52.
4. Chen IL. FDA summary of adverse events on electronic cigarettes. *Nicotine Tob Res* 2013;15(2):615-6.
5. World Health Organization. *Statement: questions and answers on electronic cigarettes or Electronic Nicotine Delivery (ENDS)*. Geneva; WHO: 2013. Disponibile all'indirizzo: http://www.who.int/tobacco/communications/statements/electronic_cigarettes/en/index.html; ultima consultazione 19/12/13.
6. Stein YS, Antal MJ, Jones MJ. A study of the gas-phase pyrolysis of glycerol. *J Anal Appl Pyrol* 1983;4:283-96.
7. Pepper JK, Brewer NT. Electronic nicotine delivery system (electronic cigarette) awareness, use, reactions and beliefs: a systematic review. *Tob Control* 2013. In press
8. United States Pharmacopeia Convention. United States Pharmacopeia 35 - National Formulary 30. United States Pharmacopeia; 2012. (USP 35/NF 30; vol. 3: 4045-6).
9. European Pharmacopoeia Commission. *European Pharmacopoeia* 6.0. 2008; vol. 2:2500-1.
10. Westenberger BJ. *Evaluation of e-cigarettes*. St. Louis, MO: Department of Health & Human Services, Food and Drug Administration; 2009. (DPATR-FY-09-23).

11. Cheah NP, Chong NWL, Tan J, Morsed FA, Yee SK. Electronic nicotine delivery systems: regulatory and safety challenges: Singapore perspective. *Tob Control* 2012;in press.
12. Etter JF, Zäther E, Svensson S. Analysis of refill liquids for electronic cigarettes. *Addiction* 2013;108(9):1671-9.
13. Kataoka H, Inoue R, Yagi K, Saito K. Determination of nicotine, cotinine, and related alkaloids in human urine and saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pharmaceut Biomed* 2009;49(1):108-14.
14. Kataoka H, Inoue R, Yagi K, Saito K. Simultaneous quantification of nicotine, cotinine, trans-3'-hydroxycotinine, norcotinine and mecamylamine in human urine by liquid chromatography-tandem mass-spectrometry. *Clin Chim Acta* 2012;413(11-12):978-84.
15. Miller EI, Norris HRK, Rollins DE, Tiffany ST, Wilkins DG. A novel validated procedure for the determination of nicotine, eight nicotine metabolites and two minor tobacco alkaloids in human plasma or urine by solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010;878(9-10):725-37.
16. Trehy M, Ye W, Hadwiger ME, Moore TW, Allgire JF, Woodruff JT, Ahadi SS, Black JC, Westenberger BJ. Analysis of electronic cigarette cartridges, refill solutions, and smoke for nicotine and nicotine related impurities. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2011;34(14):1442-58.
17. Laugesen M. *Safety report on the Ruyan® e-cigarette cartridge and inhaled aerosol*. Christchurch: Health New Zealand Ltd; 2008. Disponibile all'indirizzo: <http://www.healthnz.co.nz/RuyanCartridgeReport30-Oct-08.pdf>; ultima consultazione 19/12/13.
18. Williams M, Villarreal A, Bozhilov K, Lin S, Talbot P. Metal and silicate particles including nanoparticles are present in electronic cigarette cartomizer fluid and aerosol. *Plos One* 2013;8(3):e57987.
19. Smyth TJ, Ramachandran VN, McGuidan A, Hopps J, Smyth WF. Characterisation of nicotine and related compounds using electrospray ionisation with ion trap mass spectrometry and with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and their detection by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007;21(4):557-66.
20. European Commission. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August, implementing Council Directive 93/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities* L221, 17/8/2002.
21. Salamon ME. Nicotine and tobacco preparations. In: Flomenbaum NE, Goldfrank LR, Hoffman RS (Ed.). *Goldfrank's toxicologic emergencies*. 8th. New York: McGraw-Hill; 2006. p. 1221-30.