



JORNADAS DE REFERENCIA CNA
4 y 5 JUNIO 2024

Determinación de estireno y alfametilestireno en productos lácteos mediante SPME-CG-MS/MS

Ana Gasco López

Servicio de Materiales en Contacto con los Alimentos
Centro Nacional Alimentación
agasco@aesan.gob.es



Los compuestos: STY, AMSTY y compuestos relacionados.



Descripción del método SPME-CG-MS/MS.



Aplicaciones: Productos lácteos.



Aplicaciones: Migración desde MCA.



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030

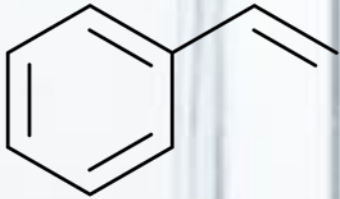
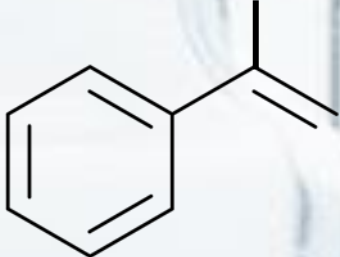


agencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

Los compuestos

COMPUESTO	ESTRUCTURA	Nº CAS	Pm (g/mol)	nº FCM	LME (mg/kg)
ESTIRENO (STY)		100-42-5	104,15	193	- (*)
ALFAMETILESTIRENO (AMSTY)		98-83-9	118,12	187	0,05

REGLAMENTO 10/2011 DE LA COMISIÓN: uso autorizado como monómero de partida en la producción de MCA.

(*) Valor previsto: 0,04 mg/kg.

IARC: Probablemente carcinógeno (2 A)

Usos como MCA



- **PS o GPPS**, poliestireno de uso general, vasos para bebidas calientes, utensilios de cocina y cubiertos reutilizables.
- **HIPS**, poliestireno de alto impacto, productos lácteos, platos y recipientes desechables para alimentos calientes.
- **GPPS, poliestireno espumado**, artículos desechables para alimentos sólidos calientes.
- **EPS, poliestireno expandido**, vasos para bebidas calientes, bandejas para envasado de carnes, frutas y verduras y cajas frías.
- **SAN**, estireno- α -metilestireno, utensilios de cocina y cubiertos reutilizables.
- **SBC**, copolímero de estireno-butadieno (en mezcla con GPPS): láminas y películas para productos lácteos, comida para llevar, cubiertos y vajillas reutilizables.
- **ABS**, Acrilonitrilo-Butadieno-Estireno, termoplástico de alta resistencia al impacto, aparatos de cocina y partes de máquinas.
- polímeros insaturados de poliéster-epoxi viniléster-estireno para cubas y otros recipientes grandes en aplicaciones industriales.
- recubrimientos de latas para alimentos y bebidas.
- selladores, p. caucho de estireno-butadieno (SBR) para tapas de latas.
- copolímeros de estireno butadieno o estireno acrilato utilizados para revestimientos de papel.



Las condiciones de uso habituales:

Baja temperatura (refrigeración) por períodos de días hasta pocas semanas, por ejemplo, pescado, carne y productos lácteos envasados.

Temperaturas elevadas durante cortos períodos de tiempo, por ejemplo, vasos expendedores de bebidas calientes o envases de comida rápida para llevar.

Migración STY:

- Fuertemente dependiente del contenido en monómero libre en el material.
- Aumenta con la temperatura, el tiempo y la superficie de contacto y con el contenido graso del alimento.

Recomendación EFSA:

- Ensayar migración en alimento (NO en simulantes), o:
- Ensayar contenido en material, 100% migración.

STY libre en material: hasta 500 mg/kg.

Migración en alimentos:

- Productos lácteos: PS: 10-30 ppb. ABS: 100 ppb. SAN < 10 ppb
- Carnes y pescados: EPS: 10-30 ppb.
- Aceite: ABS: 200 ppb. SAN < 10 ppb.



Otras vías de exposición: medioambiental, endógeno.

Aire: muy bajas concentraciones debido a su alta reactividad con ozono. Zonas industriales: de 0,5 a 5,9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, zonas cercanas a plantas de producción: hasta 3000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, Presencia en humo del tabaco.

Agua: concentraciones de 0,1 a 0,5 $\mu\text{g}/\text{litro}$ en ríos, lagos y agua potable.

Alimentos: el estireno se encuentra presente a niveles bajos en la mayoría de los alimentos posiblemente debido a contaminación ambiental.

Canela: hasta 40 mg/kg, procedente de la degradación del cinamaldehído.

Quesos “mohosos”: hasta 5 mg/kg, provocado por acción de algunos microorganismos como *Penicillium roqueforti* en la producción de algunos quesos azules.

Pulpa de aceituna conservada a temperatura ambiente: crecimiento de 27 a 230 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en una semana, este aumento no se produce si se conserva en refrigeración.



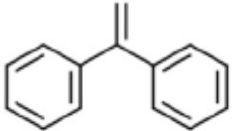
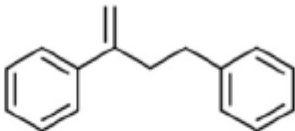
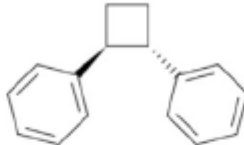
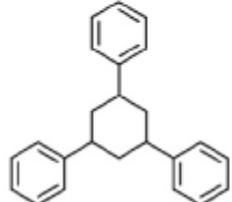
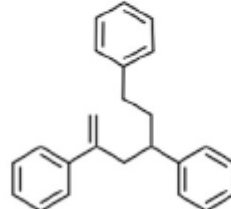
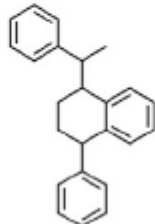
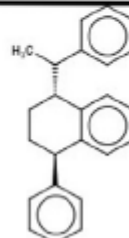
Otros compuestos relacionados: NIAS

Oligómeros:

NIAS (*):

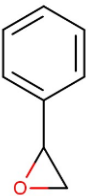
0,05 mg/kg (evaluación riesgo conforme y NO genotóxicos)

0,00015 mg/kg (NO evaluados toxicológicamente)

Polystyrene (PS) Oligomers DIMERS	 1,1-Diphenylethylene	 2,4-diphenyl-1-butene	 trans-1,2-diphenyl cyclobutane	
Polystyrene (PS) Oligomers TRIMERS	 1,3,5-triphenylcyclohexane	 2,4,6-triphenyl-1-hexene	 1a-Phenyl-4-(1-phenylethyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene	 1e-Phenyl-4-(1-phenylethyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene

Metabolitos:

Estireno-7,8-óxido



IARC: Probablemente carcinógeno (2A)

SPME-CG-MS-MS

** Determination of styrene monomer migrating in foodstuffs from polystyrene food contact articles using HS-SPME-GC-MS/MS: Results from the Greek Market. Kontou et al, 2022.*

Intervalo de trabajo: 0,1 LME -3 LME

STY: 4-120 µg/kg (*)

AMSTY: 5-150 µg/kg

Matrices empleadas en validación:

- Leche (desnatada, semidesnatada, entera)
- Yogur (de vaca, de oveja, griego, de proteínas, líquido,...)
- Quesos frescos (crema, porciones, cubos, de proteínas,...)

De diferente contenido graso y procedencia en cada tipo de matriz.

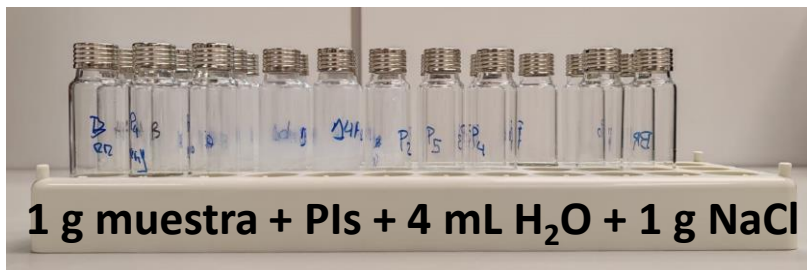


MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

PROCEDIMIENTO:



Microextracción en fase sólida: DVB/PDMS

t (min)	T (°C)	Etapas
10	250	Acond. fibra
10	50	Acond. muestra
30	50	Extracción
5	240	Desorción
5	250	Post-acond.

Condiciones CG:

- Columna: HP-5MS UI 15 m (x2)
- Inyección modo splitless
- Temperatura del inyector: 240 °C
- Temperatura de la interfaz: 300 °C
- Gas portador: Helio
- Caudal: columna 1 de 1 mL/min.; columna 2 de 1,2 mL/min.

	Rampa (°C/min)	T (°C)	t (min)
Inicio		40	2
Rampa 1	5	55	0
Rampa 2	20	300	5

Condiciones MS/MS:

- Modo MRM
- Temperatura fuente 230 °C
- Energía de ionización de 70 eV
- Gas de colisión: nitrógeno.
- Temperaturas de los cuadrupolos 150 °C

Compuesto	t _r	Transición	
	(min)	(m/z)	CE (eV)
STY-d8	7,1	112>84	15
STY	7,1	104>78	15
		104>77	25
		103>78	15
AMSTY-d10	8,3	128.1>110.1	25
AMSTY	8,3	118>115	25
		118>103	25

Muestreo del “espacio de cabeza”



Recta de calibración: sobre leche semidesnatada, seis niveles de concentración.

Patrones internos deuterados: STY-d8 y AMSTY-d10.

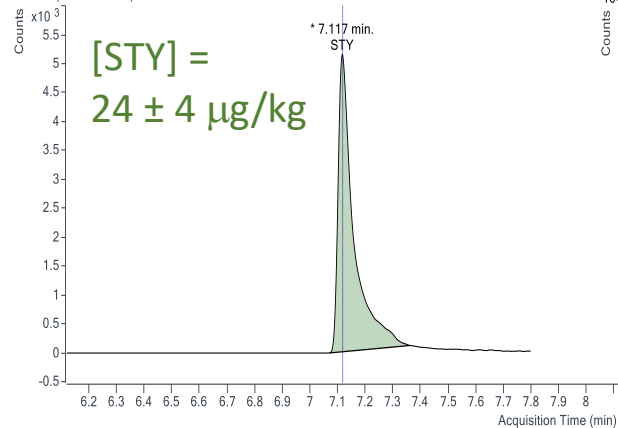
Validación: Diferentes matrices “blanco” adicionadas a tres niveles de concentración (0,1LME/LME/3LME) y procesadas por duplicado en diferentes días.

- Se observan variaciones por efecto matriz, compensadas con el uso de los patrones internos.
- Se observan diferencias más pronunciadas según el contenido graso.
- Resultados adecuados en cuanto a precisión, veracidad e incertidumbre.

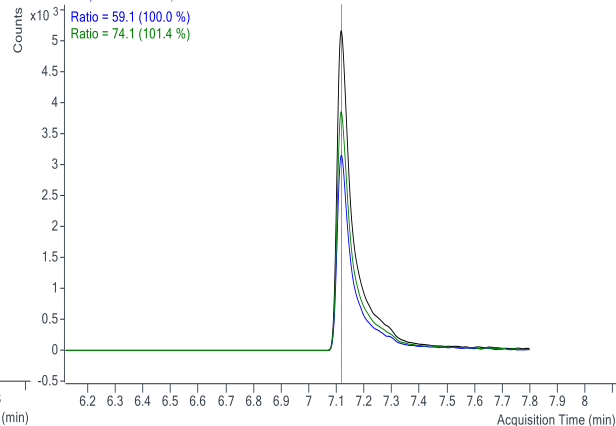


Ejemplo: Muestra de yogur natural en envase PS

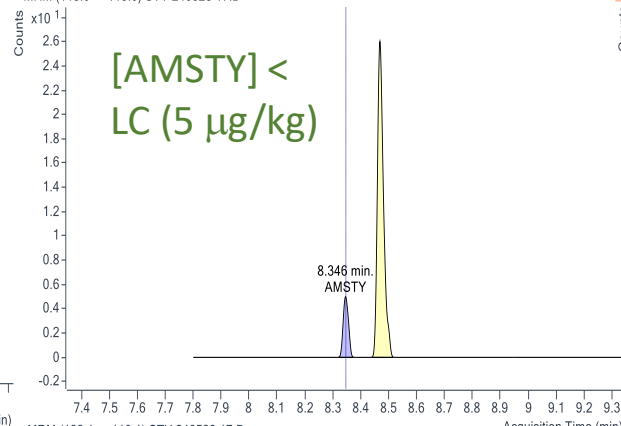
+MRM (104.0 → 78.0) STY 240528 17.D



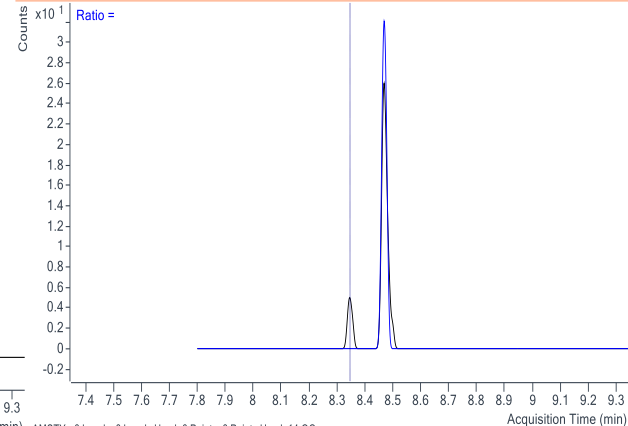
104.0 → 78.0, 104.0 → 77.0, 103.0 → 77.0



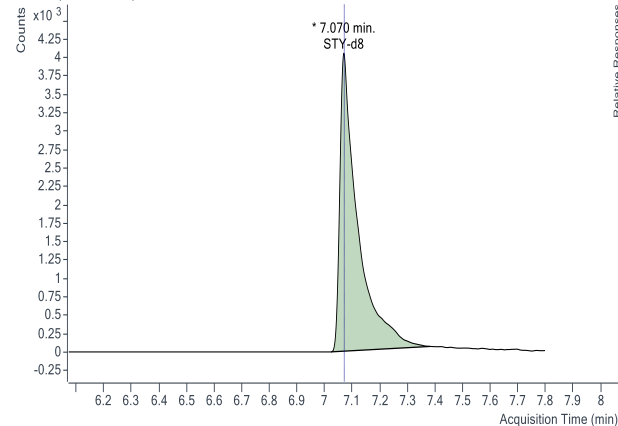
+MRM (118.0 → 115.0) STY 240528 17.D



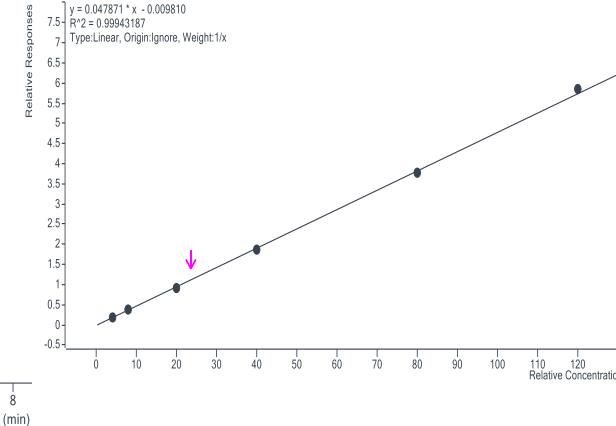
118.0 → 115.0, 118.0 → 103.0



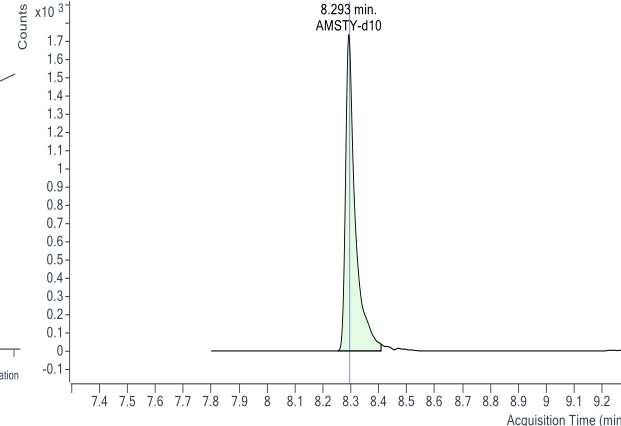
+MRM (112.0 → 84.0) STY 240528 17.D



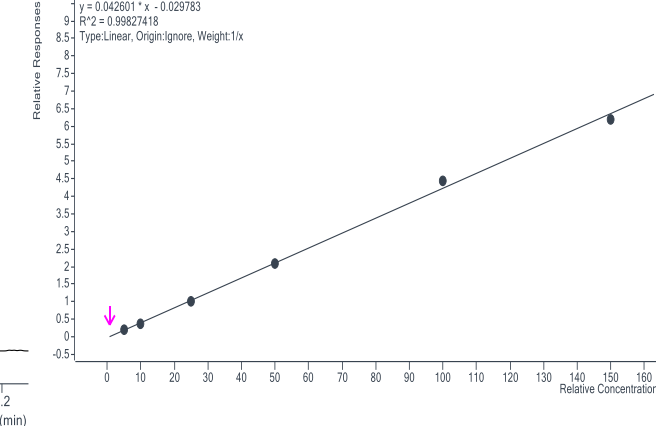
STY - 6 Levels, 6 Levels Used, 6 Points, 6 Points Used, 14 QCs



+MRM (128.1 → 110.1) STY 240528 17.D



AMSTY - 6 Levels, 6 Levels Used, 6 Points, 6 Points Used, 14 QCs





Aplicaciones a muestras

- Estudio de la variación de la migración de STY/AMSTY con el tiempo de envasado.
- Estudio de la presencia de STY en queso fresco envasado en PP (formación endógena).
- Ensayo de migración de envases de PS de uso repetido.





VARIACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE STY CON EL TIEMPO

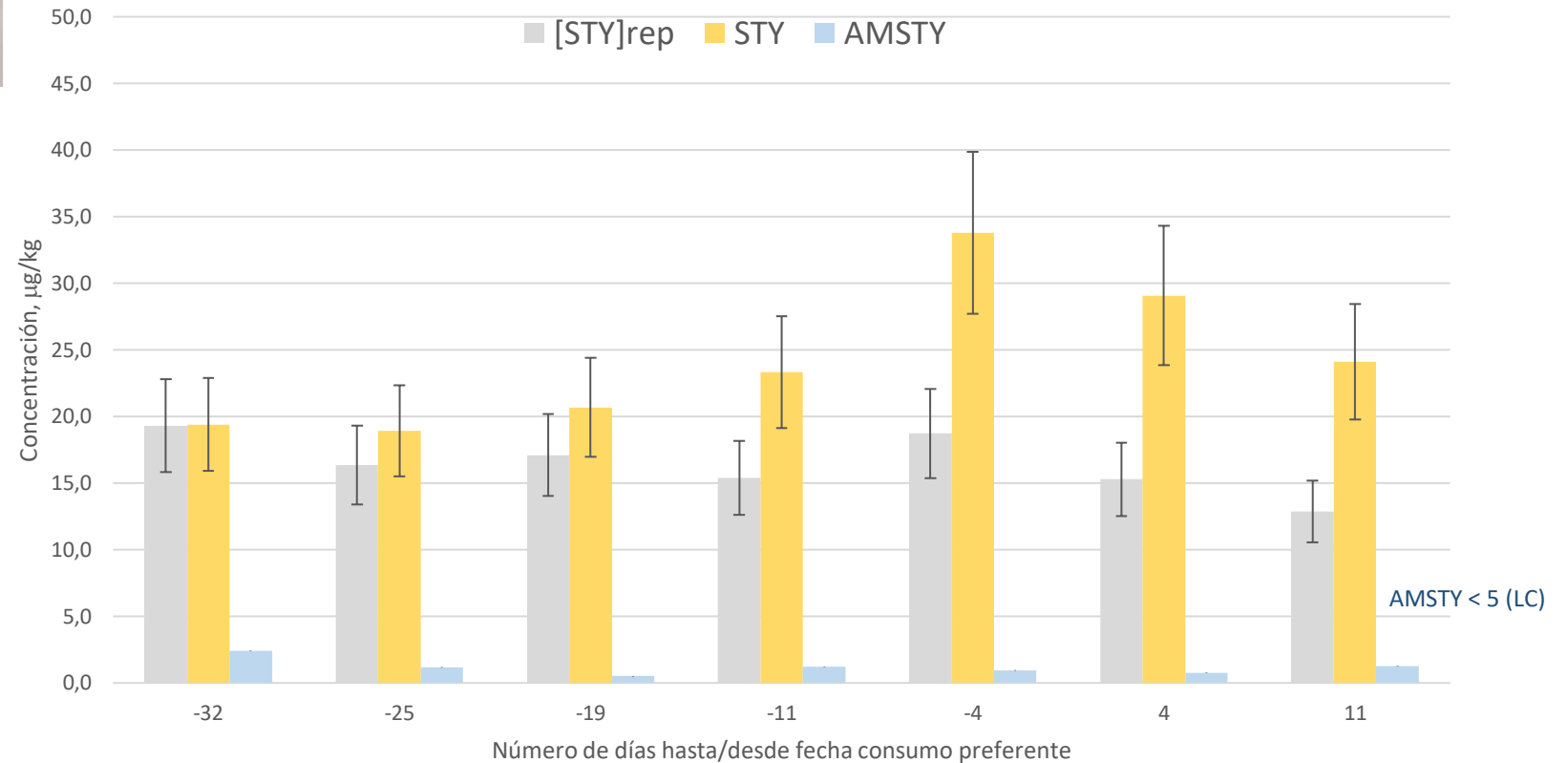
El Real Decreto 271/2014 establece **fecha de consumo preferente** para los yogures, sustituye al Real Decreto 179/2003 (fecha de caducidad de 28 días). “Más alimentos, menos desperdicio”.

La fecha de consumo preferente en estos productos se establece alrededor de **35 días**, e indica que, sobrepasada esa fecha, el alimento continúa siendo **seguro**, aunque puede perder cualidades: aparición de suero, aumento de acidez, sabor amargo,...

INFORME OCU, Octubre 2023, seguridad del yogur tras fecha de consumo preferente.
Propiedades organolépticas y seguridad microbiológica.



VARIACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE STY CON EL TIEMPO: YUGUR NATURAL EN ENVASE DE POLIESTIRENO



Descripción del estudio:

28 unidades de mismo lote, conservadas en refrigeración y analizadas por triplicado (n=3) a lo largo del tiempo.

Envase 1, conservado en envase de vidrio en refrigeración, reanalizado junto al resto.



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN



Evaluación conformidad con LME: Corrección por S/V

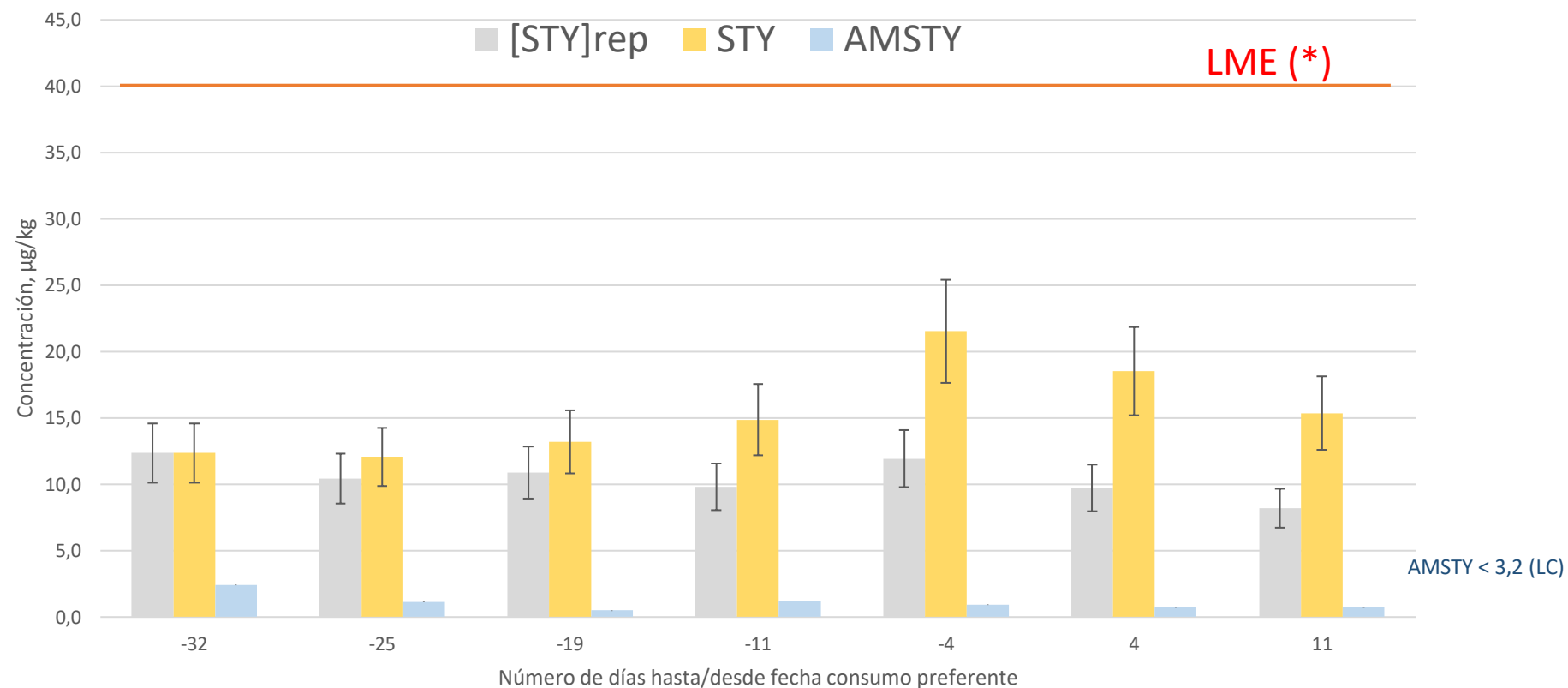
$$[\text{STY}]_{\text{corr}} = [\text{STY}] * 6 / (\text{S/V})_{\text{real}}$$

$$S = 1,13 \text{ dm}^2$$

$$V = 0,120 \text{ kg}$$

$$(\text{S/V})_{\text{real}} = 9,42 \text{ dm}^2/\text{kg}$$

Variación de la migración de STY y AMSTY con el tiempo



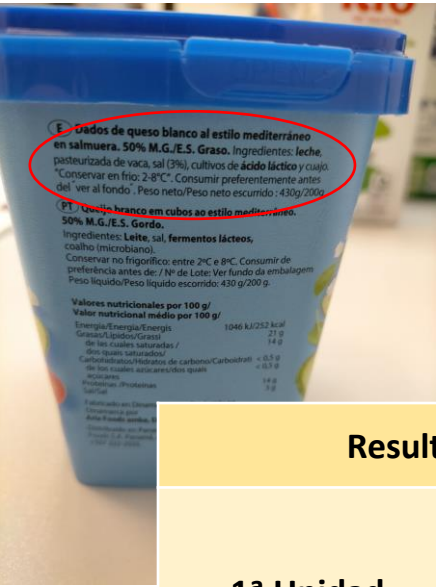


PRODUCCIÓN DE ESTIRENO ENDÓGENO:

Algunos hongos del género *Penicillium* pueden deteriorar los alimentos y provocar cambios no deseados en sus características sensoriales (sabor, olor, textura).

En algunos tipos de queso el crecimiento de moho es fundamental para garantizar la calidad del producto.

Producción de algunos quesos azules: inoculación de leche con cultivos iniciadores puros de *Penicillium roqueforti* y/o *Penicillium expansum*. Convierten fenilalanina a ácido cinámico y éste a su vez, en estireno.

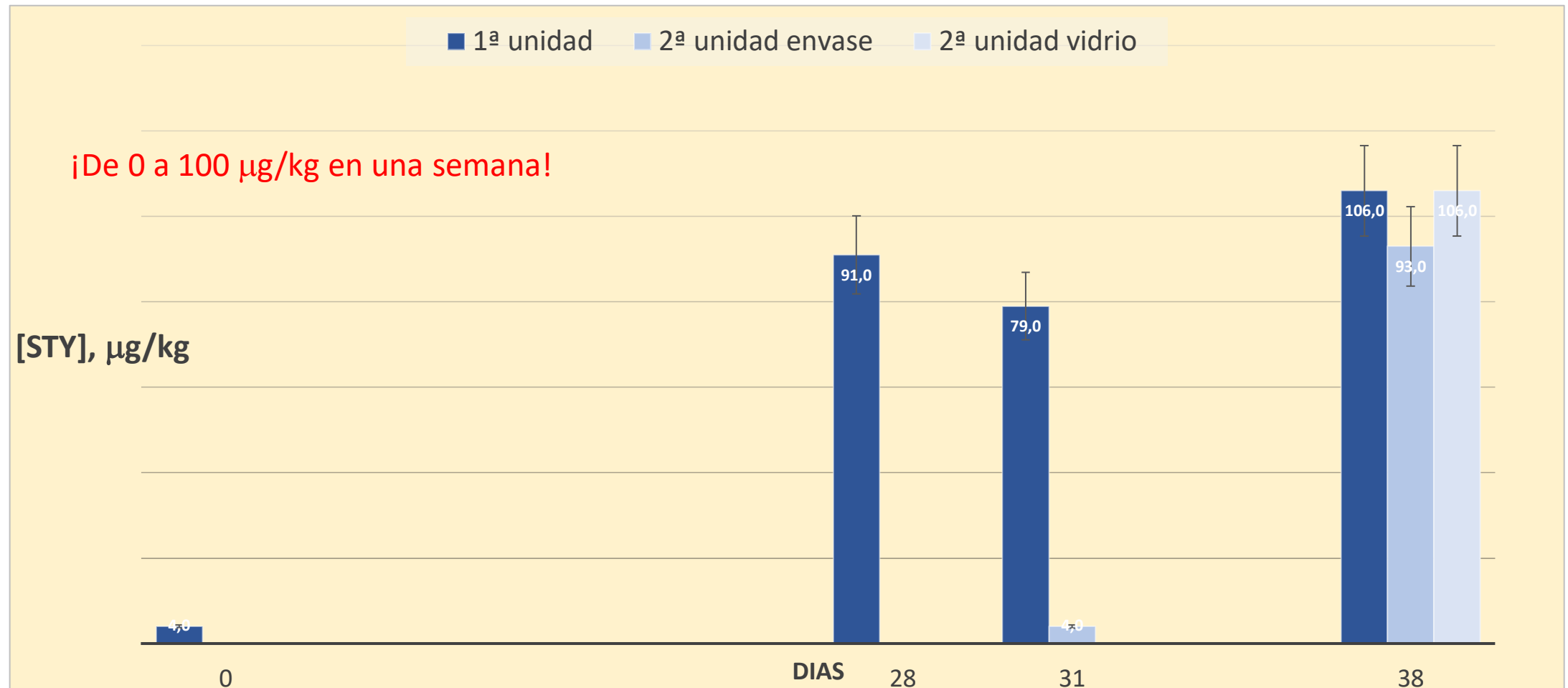


PRODUCCIÓN DE ESTIRENO ENDÓGENO: MUESTRA DE QUESO "BLANCO EN CUBOS" en envase PP

Ingredientes: leche pasteurizada de vaca, **sal al 3%**, cultivos de ácido láctico y cuajo.

Resultados (µg/kg)		07/02/2024	05/03/2024	08/03/2024	15/03/2024	
1ª Unidad Lote: 29/11/23 Cad: 25/08/2024	Envase abierto el 07/02 , escurrido el líquido de gobierno, picado en picadora y conservado en su propio envase en refrigeración	[STY] < LC [AMSTY] < LC	[STY] = 91 ± 19 [AMSTY] < LC	[STY] = 79 ± 16 [AMSTY] < LC	[STY] = 106 ± 22 [AMSTY] < LC	
2ª Unidad Lote: 05/12/23 Cad: 31/08/2024	El 07/03 se adquiere una segunda muestra de igual naturaleza. Se procesa de la misma manera. (*)Se conserva en refrigeración la mitad en su propio envase y el resto en envase de vidrio.			[STY] < LC [AMSTY] < LC	(*) su envase	[STY] = 93 ± 19 [AMSTY] < LC
					(*) frasco vidrio	[STY] = 106 ± 22 [AMSTY] < LC





MIGRACIÓN DESDE ENVASES DE PS

Migración STY:

- Fuertemente dependiente del contenido en monómero libre en el material.
- Aumenta con el contenido graso del alimento.
- Ensayar migración en alimento: Los simulantes hidroetanólicos (10 y 50%) sobrestiman la migración (Deterioro del material)
- Elección de condiciones de tiempo y temperatura.
- Medida de la superficie de contacto.

Si no es posible: Ensayar contenido en material y suponer 100% migración.

Vasos de PS de uso repetido

- Migración en leche semidesnatada.
- Muestra por triplicado (n=3).
- Cuarta unidad: control de temperatura y medida de superficie.
- Tres migraciones sucesivas: evaluación estabilidad.

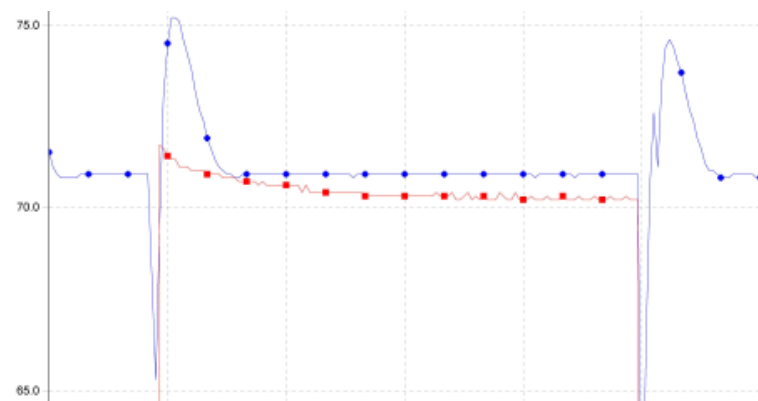


*Segun la norma - De acordo com a norma
In accordance with standard: EN 12875-1:2005

Recycling symbols: a recycling symbol, a trash can, a glass, and a recycling symbol with a registered trademark.

Distribuido para / Distribuido para / Distributed
El Corte Inglés por / by Gabbiano Iberia, S.L.

Control temperatura:
(70 ± 2) °C y (120 ± 5) min



Medida de superficie:
molde y pesada





SUPERFICIE (dm²): 2,05

VOLUMEN (mL): 300

S/V (dm²/kg): 6,8

Aplica corrección por S/V = 6 dm²/kg

[STY]corr = [STY]*6/(S/V)real

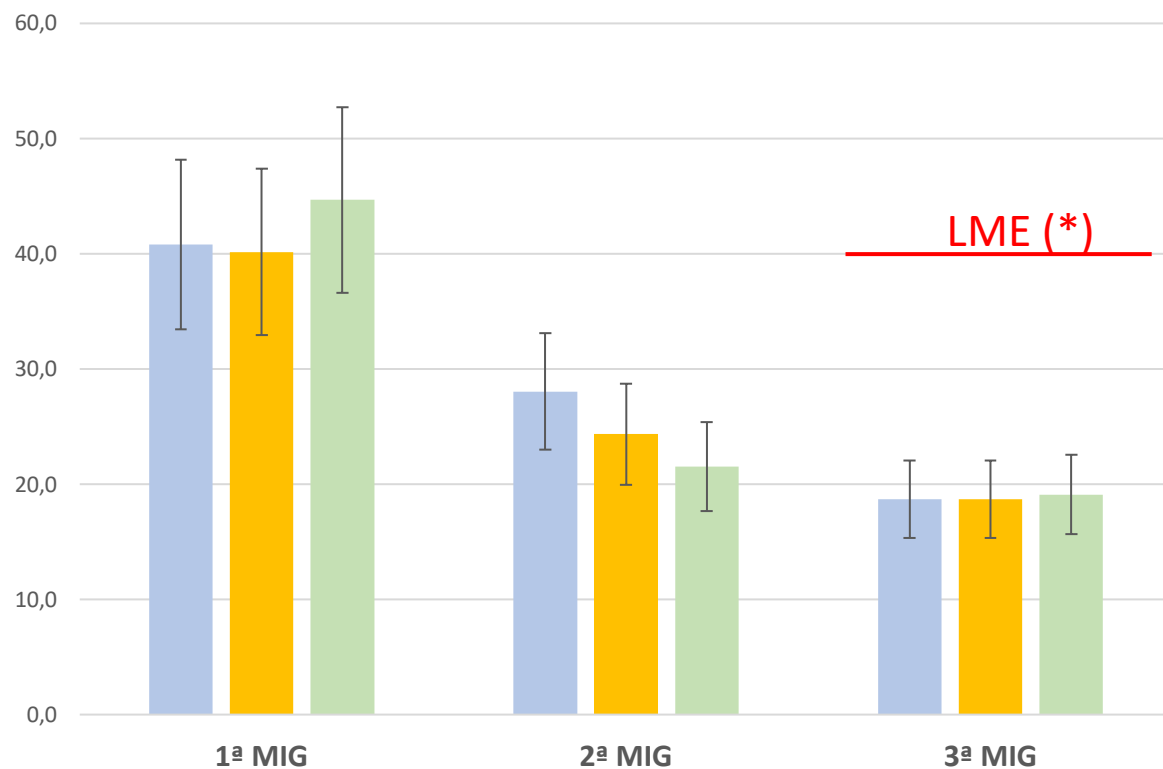
	RESULTADOS:	[STY] µg/kg	± U (µg/kg)	[STY] µg/kg Correg	± U (µg/kg)
1ª MIG	A	46,5	8,4	40,8	7,3
	B	45,7	8,2	40,1	7,2
	C	50,9	9,2	44,7	8,0
2ª MIG	A	32,0	5,8	28,1	5,0
	B	27,7	5,0	24,3	4,4
	C	24,5	4,4	21,5	3,9
3ª MIG	A	21,3	3,8	18,7	3,4
	B	21,3	3,8	18,7	3,4
	C	21,8	3,9	19,1	3,4





[STY]corr, µg/kg. Según migración.

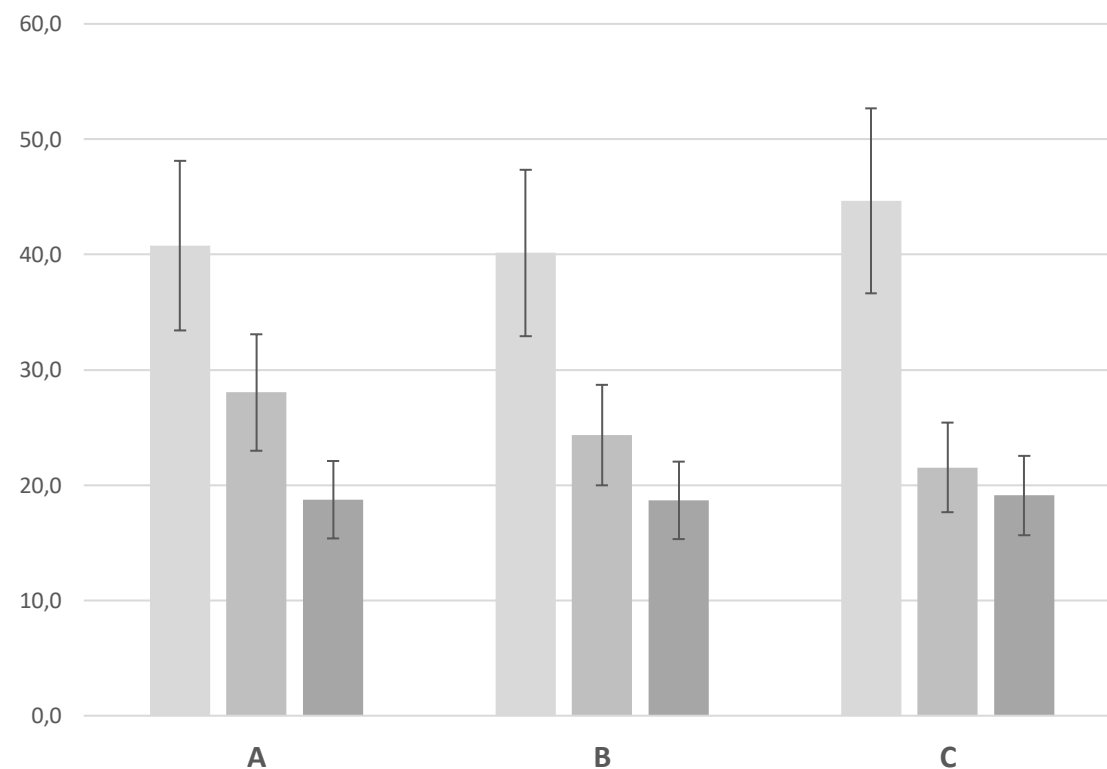
■ A ■ B ■ C



$m3 \leq m2 \leq m1$
 $m3 \leq LME$

[STY]corr, µg/kg. Según artículo.

■ 1ª MIG ■ 2ª MIG ■ 3ª MIG



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN



Evaluación de conformidad: LME y estabilidad

$$m_3 - U_3 \leq \text{LME}$$

$$m_3 - U_3 \leq m_2 + U_2$$

$$m_2 - U_2 \leq m_1 + U_1$$

$$m_3 - U_3 \leq m_1 + U_1$$

$$U_i = U_{\text{val}} (\%) * m_i$$

$$k=2$$

$$LC_{\text{met}}$$

- IF $(m_3 - \text{SML}) / [u(m_3)] > 1.64$ THEN $m_3 > \text{SML}$,
- IF $(m_2 - m_1) / [u(m_2) + u(m_1)] > 1.64$ THEN $m_1 < m_2$
- IF $(m_3 - m_2) / [u(m_3) + u(m_2)] > 1.64$ THEN $m_2 < m_3$
- IF $(m_3 - m_1) / [u(m_3) + u(m_1)] > 1.64$ THEN $m_1 < m_3$

$$u(m) = \text{CVR} * m.$$

CVR → Horwitz-Thompson
 $k=1,64$

Límite "evaluación" = 0,2 LME



➤ Ensayo de intercomparación EURL-FCM: FCM-24/01
"Determinación de la migración de estireno de vasos de poliestireno en leche".

- ARTÍCULO DE ENSAYO: 5 vasos de poliestireno de un solo uso para la prueba de migración.
- Dos litros de leche UHT Tetra Pak© con 1,6 % de grasa para realizar la prueba de migración.

Ensayo de migración: 70 °C durante 2 horas.

Fecha límite emisión resultados: 8th July 2024

➤ Estudio prospectivo para 2025. Productos lácteos.

REFERENCIAS:

- *Assessment of the impact of the IARC Monograph Vol. 121 on the safety of the substance styrene (FCM No 193) for its use in plastic food contact materials.* SCIENTIFIC OPINION. EFSA Journal, doi: 10.2903/j.efsa. 2020.6247. Sep 20.
- *Styrene in Drinking-wáter. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality.* WHO/SDE/WSH/03.04/27. World Health Organization 2003.
- *Determination of styrene monomer migrating in foodstuffs from polystyrene food contact articles using HS-SPME-GC-MS/MS: Results from the Greek Market.* S. Kontou. FOOD ADDITIVES & CONTAMINANTS: PART A 2022, Vol. 39, nº. 2, 415–427. doi.org/10.1080/19440049.2021.2005830.
- *Estimation of human exposure to styrene and ethylbenzene.* W. Tang et al. / *Toxicology* 144 (2000) 39–50.
- *Determination of styrene content in Gorgonzola PDO cheese by headspace solid phase micro-extraction (HS-SPME) and gas-chromatography mass-spectrometry (GC-MS).* L. Chiesa. *Vet Res Commun* (2010) 34 (Suppl 1):S167–S170.
- *Próxima enmienda al Reglamento 10/2011:* https://food.ec.europa.eu/document/download/9aff9ef8-0fa5-4076-8b77-b38a4f9f117a_en?filename=cs_fcm_wg_20240122_handout_0.pdf

MUCHAS GRACIAS

Grupo de trabajo:
Francisco Barahona
Carmen Carreras
Ana Gasco



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



agencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

*Cuidando de ti
desde el laboratorio*



Centro
Nacional de
Alimentación