



GRUPPO DI LAVORO
APAT - ARPA - APPA
FITOFARMACI



Metodi multiresiduo utilizzati per il controllo ufficiale dei residui di prodotti fitosanitari negli alimenti

Marco Morelli - Arpa Emilia-Romagna

Hanno collaborato:

A. Carioli, A. Bovolenta, M. Pesci, F. Rossi – Arpa Emilia-Romagna

M. Lorenzin – Appa Trento

Roma, 21 dicembre 2007

Mancanza di un metodo di prova normato e/o ufficiale

Le agenzie preposte al controllo dei **residui di fitofarmaci** nei prodotti **ortofrutticoli**, da sempre avvertono l'esigenza di un **metodo analitico ufficiale**.

Quale riferimento per i laboratori?

Rapporti Istisan 97/23 - Istituto Superiore di Sanità



Gruppo di lavoro per i residui di antiparassitari della Commissione permanente di coordinamento interregionale per i problemi relativi al controllo ufficiale dei prodotti alimentari



metodi multiresiduo per l'analisi di residui di antiparassitari in prodotti vegetali

Quali proposte di metodi ?

- **B1:** estrazione con acetone, filtrazione, ripartizione in diclorometano, purificazione su cartuccia gel di silice
- **B2:** estrazione con acetone + metanolo (1+1,v+v), ne segue una filtrazione. Un'aliquota della soluzione di estrazione viene diluita con acqua e purificata su C18. Gli analiti sono eluiti dalla SPE-C18 mediante miscela n-esano + etere etilico, 1+1, v+v
- **B3:** estrazione con etile acetato in presenza di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, filtrazione e purificazione mediante GPC.
- **B4:** Il campione è mescolato insieme a terra di diatomee. La miscela è trasferita in una colonna di vetro, eluizione con diclorometano e purificazione mediante GPC.
- **B5:** Il campione è estratto con acetone. La soluzione di estrazione è, poi, separata mediante filtrazione, anche con l'ausilio di celite. La soluzione acetone/acqua è trasferita in una cartuccia riempita di terra di diatomee. Parte dell'acetone è rimosso con un flusso di azoto. I residui di antiparassitari sono recuperati eluendo la cartuccia con diclorometano.

Particolarità....

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici pubblicati nei Rapporti e Congressi ISTISAN è dei singoli autori

Questo comporta che i metodi di prova tratti da queste pubblicazioni non sempre sono accettati dagli Enti preposti alla valutazione di conformità alla UNI EN 17025 come metodi ufficiali e/o normati

5.4.4. Metodi non normati

Si applica il requisito di norma.

I metodi non normati di cui l'Organizzazione che li ha emessi non si assume la responsabilità della validazione (es. metodi contenuti nei Quaderni ISTISAN) devono essere validati dal laboratorio, che li può comunque indicare nella richiesta formale di accreditamento.

Fonte: SINAL DG0007 rev. 5

Atteggiamento propositivo...

Il **gruppo di lavoro AAAF**, a cui fanno riferimento la maggior parte delle agenzie, si è fatto **promotore di uno studio** con la **collaborazione di molti laboratori del sistema agenziale** che, da tempo, si occupano **dell'analisi dei residui dei fitofarmaci nei vegetali**

Perché questa esigenza?

- **Dotare** il sistema delle Agenzie di un metodo di prova comune (**armonizzazione**) per l'analisi dei residui di PF nell'ortofrutta
- **Disporre** di un metodo di prova contenente dati di **precisione** ed **accuratezza**
- **Avere** una strumentazione che permetta di allineare i LdR e di LdQ fra i laboratori preposti al controllo ufficiale

Nota:

LdR = limite di rilevabilità: minima concentrazione di analita rilevabile con ragionevole affidabilità da una certa procedura analitica

LdQ = limite di quantificazione: minima concentrazione di analita che può essere analizzata con ragionevole affidabilità da una certa procedura analitica

Fonte: Linee guida per la validazione dei metodi analitici e per il calcolo dell'incertezza di misura – I manuali ARPA

Il metodo deve essere validato...

➤ UNI CEI ISO 17025 punto 5.4.5.1

Validazione

- *“La validazione è la conferma attraverso l’esame e l’apporto di **evidenza oggettiva** che i **requisiti particolari per l’utilizzazione** siano soddisfatti”*
- E’ un **processo di verifica** con il quale si controlla se il **metodo soddisfa** convenientemente i **requisiti prefissati**

Come procedere ?

- Eseguire uno **studio collaborativo** fra i laboratori del sistema delle agenzie (es.: L 93/2001 linea 4b: residui di prodotti fitosanitari nelle acque)
- **Obiettivo:** disporre di un metodo di prova comune (ufficiale) per l'analisi dei residui di PF nei prodotti ortofrutticoli
- **Svantaggio:** percorso lungo e oneroso



Oppure ?

Oppure come procedere ?

Valorizzare

l'attività svolta negl'anni dai laboratori delle ARPA-APPA e **valutare** se **vi sono dati e condizioni** per proporre e redigere uno o più **metodi di prova per l'analisi dei residui dei PF su matrici ortofrutticole**

Quali Azioni intraprese ?

- **Recensione** delle informazioni necessarie per dare evidenza oggettiva delle caratteristiche dei metodi di prova adottati dai laboratori
- **Raccolta** dei dati:
 - delle validazioni effettuate dai laboratori per accreditare i loro metodi di prova
 - dei proficiency test, nazionali e/o internazionali, a cui hanno partecipato negli anni le agenzie

Laboratori partecipanti

collaborazione fattiva delle seguenti agenzie



*A TUTTI un
particolare
ringraziamento,
per il
contributo
fornito, che ha
permesso la
realizzazione
del lavoro*

Dai laboratori delle ARPA: raccolta informazioni

Quantità di campione		Utilizzo di Terra diatomee		Solvente/Mix estrazione		Utilizzo sistemi di Automazione	Purificazione campione	
Lab.	Quant. (g)	Si/No	Tipo	Tipo	ml	Si/No	Si/No	Tipo
1	25	No		(1)	50 + 50	No	Si	SPE
2	10	Si	A	CH ₂ Cl ₂	4 x 35	No	Si	GPC
3	10	Si	D	CH ₂ Cl ₂	100	No	No	
4	10	Si	G	EtAc	25	Si	Si	GPC
5	10	Si		CH ₂ Cl ₂	100		Si	silica gel
6	10	Si	M	CH ₂ Cl ₂	100	No	No	
7	15	Si	Z	CH ₂ Cl ₂	150	Si	Si	GPC
8	5	Si	Z	EtAc	40	Si	Si	GPC
9	50	No		Acetone	200			SPE
10	15	Si	J	CH ₂ Cl ₂	150	No	No	
11	10	Si		EtAc	80	Si	Si	GPC
12	15	Si	A	CH ₂ Cl ₂	100		Si	GPC
13	10	Si	Z	CH ₂ Cl ₂	100	No	Si	GPC

(1): miscela acetone/metanolo 1:1

Lab. con numero di colore rosso: utilizzo di terre di diatomee

Legenda

A: Merck - Extrelut bustine

D: Merck

G: Bulk isolate sorbent

J: Extrelut NT Refil Pak WWR International

M: chemtek analitica

Z: hidromatrix Varian

Dai laboratori delle ARPA: raccolta informazioni

Quantificazione standard in solvente o in matrice		Quantificazione Multilivello o singolo livello		Quantificazione Utilizzo di standard di processo
Lab.	Solvente/matrice	Tipo	Numero	Si/No
1	Solvente	Multi livello	3	No
2	Solvente	Multi livello	3	Si
3	Solvente	Multi livello	3	No
4	Solvente	Singolo	1	Si
5	Solvente	Singolo	1	No
6	Solvente	Singolo	1	No
7	Solvente	Singolo	1	No
8	matrice	Singolo	1	Si
9	Solvente	Multi livello	4	Si
10	Solvente	Multi livello	> 6	Si
11	Solvente	Multi livello	6	Si
12	Solvente	Multi livello	4	No
13	Solvente	Multi livello	4	No

Dai laboratori delle ARPA: raccolta informazioni

Analisi strumentale: rivelatori utilizzati				
Codice Laboratorio	GC NPD	GC FPD	GC ECD	GCMS
1	Si	Si	Si	Si
2	Si		Si	Si
3	Si	No	Si	Si
4	Si	No	Si	No
5	Si	Si	Si	
6	Si		Si	Si
7	Si	Si	Si	Si
8	Si	Si	Si	Si
9	Si		Si	Si
10	Si	No	Si	Si
11	Si	No	Si	Si
12	Si	No	Si	Si
13	Si	No	Si	Si

Cosa è emerso dall'indagine ?

➤ **B2:** estrazione con acetone + metanolo (1+1,v+v), ne segue una filtrazione. Un'aliquota della soluzione di estrazione viene diluita con acqua e purificata su C18. Gli analiti sono eluiti dalla SPE-C18 mediante miscela n-esano + etere etilico, 1+1, v+v

➤ **B4:** Il campione è mescolato insieme a terra di diatomee. La miscela è trasferita in una colonna di vetro, eluizione con diclorometano e purificazione mediante GPC.

Punto B.2 Rapporto ISTISAN 97/23

Estrazione con acetone+metanolo (1+1, v/v), purificazione su C18



Triturazione/omogeneizzazione del campione.



Analisi strumentale: GC con rivelatori selettivi, e/o GC-MS



Estrazione con cartucce SPE. Gli analiti sono eluiti dalla SPE-C18 (C8) mediante miscela n-esano + etere etilico, 1+1, v+v, (n-esano).



50 g di campione sono omogeneizzati con 100 ml di una miscela acetone+metanolo (1+1, v/v)



Separare la soluzione di estrazione mediante filtrazione.



La soluzione viene trasferita nel matraccio da 250 ml e portata a volume con acqua.



Trasversare 50 ml di soluzione (pari a 10 g di campione) in beuta e aggiungere 400 ml di acqua



Punto B.4 Rapporto ISTISAN 97/23

“Estrazione per dispersione su terre di diatomee, purificazione mediante GPC”



Triturazione/omogeneizzazione del campione.



Un'aliquota di omogeneizzato vegetale (15 g) viene miscelata con terra di diatomee (20 g).



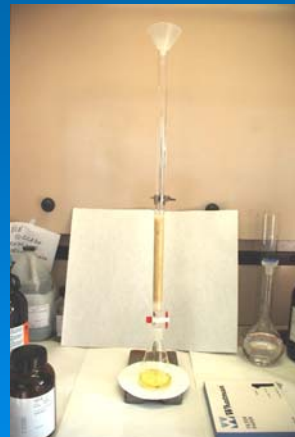
Analisi strumentale: GC-MS(/MS) e/o LC-MS(/MS)



Eventuale purificazione, mediante cromatografia a permeazione di geli (GPC).



La miscela può essere estratta mediante sistemi di estrazione automatici (tipo ASE)



Oppure mediante cromatografia su colonna. Eluizione con circa 150 ml di diclorometano (100 + 50)



Raccogliere l'eluato ed i lavaggi in beuta da 200 ml

Portare a piccolo volume con evaporatore rotante ed a secco con corrente di azoto

Laboratori e Proficiency test (PT)

N°	Si/No	anni	Enti			
1	Si	10	EUPT			
2						
3	Si	4	EUPT	FAPAS	ARPAV	
4	Si	4	EUPT			
5						
6	Si	9	EUPT	AAAF		
7	Si	10	EUPT	I.S.S.	AAAF	Is.Pa.Ve.
8	Si	7	EUPT	I.S.S.	C.O.O.	AAAF
9	Si			AAAF	FAPAS	
10	Si	8	EUPT	I.S.S.		
11	Si	6	EUPT	I.S.S.	C.O.O.	
12	Si		EUPT	AAAF	FAPAS	
13	Si	1	EUPT			

Legenda

I.S.S. = Istituto Superiore di Sanità

EUPT = European Commission's PT

AAAF = ARPA - gruppo di lavoro AAAF

C.O.O. = Centro Operativo Ortofrutticolo - Coop Italia

10: laboratori hanno partecipato all'European Commission's PT

PT: a cosa servono ?

- **documentare la riferibilità delle misure**
 - quando non siano disponibili campioni di prima linea o materiali certificati;
- **validare i metodi di prova**
 - con riferimento alla ISO 5725;
- **certificare materiali di riferimento**
 - Guide ISO 30-305
- **valutare la competenza tecnica dei laboratori**
 - Proficiency tests o prove valutative riferimento Guida ISO 43

Perché partecipare ai PT?

Regolamento (CE) n. 396/2005 - Art. 28 comma 3: **Tutti i laboratori incaricati dell'analisi dei campioni, ai fini dei controlli ufficiali sui residui di antiparassitari, partecipano alle prove interlaboratorio comunitarie per i residui di antiparassitari, organizzate dalla Commissione**

Sanco/3131/2007 p.to 66: The laboratory **must participate regularly** in relevant **proficiency tests** ...

66. The laboratory must participate regularly in relevant proficiency tests. Where the accuracy achieved in any of the tests is questionable or unacceptable, the problem(s) should be investigated and, particularly for unacceptable performance, rectified before proceeding with further determinations of the analyte/matrices combinations involved.

L'Unione Europea nelle linee guida SANCO/3131/2007:
"Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed" nel punto

Analytical methods validation and performance criteria – Method validation:



55. For both multi- and selective residue methods, representative matrices may be used. As a minimum, one matrix from each commodity category as described in Annex I must be validated, depending on the intended scope of the method. When the method is applied in routine for a wider variety of matrices, complementary, on-going QC- and validation data (calibration and recoveries) should be acquired during the routine analyses.

Matrici rappresentative

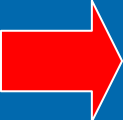
Table 4. Representative commodities/samples for validation of analytical procedures for pesticide residues

Group	Common properties	Commodity group	Representative species
Plant products			
I.	High water and chlorophyll content	Leafy vegetables Brassica leafy vegetables Legume vegetables	spinach or lettuce broccoli, cabbage, kale green beans
II.	High water and low or no chlorophyll content	Pome fruits Stone fruits Berries Small fruits Fruiting vegetables Root vegetables	apple, pear peach, cherry strawberry grape, tomato, bell pepper, melon mushroom potato, carrot, parsley
III.	High acid content	Citrus fruits	orange, lemon
IV.	High sugar content		raisins, dates
V.	High oil or fat	Oil seeds Nuts	avocado, sunflower seed, walnut, pecan nut, pistachios
VI.	Dry materials	Cereals Cereal products	wheat, rice or maize grains wheat bran, wheat floor
	Commodities requiring individual test		e.g. garlic, hops, tea, spices, cranberry

Fonte: Guidelines for Single-laboratory Validation of Analytical Methods for Trace-level Concentrations of Organic Chemicals – annex 1

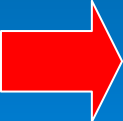
Viene ribadito...

Deve essere effettuata con molta
attenzione e cura la scelta:



le matrici: vengono individuate e selezionate sulla base *of their biological or “analytical” similarity*

(es.: occorre valutare il contenuto di acqua, di clorofilla, di grassi, di zuccheri e di acidità)



degli analiti: occorre valutare le caratteristiche chimico-fisiche delle sostanze attive (polarità, degradabilità, basicità, ecc.)

Analiti rappresentativi

Sanco/3131/2007

- Il sistema di determinazione deve essere “*calibrated*” con gli **analiti rappresentativi** [1] per ogni serie di analisi (tab. 1)

Representative analytes

42. Where practicable, each determination system should be calibrated with all the targeted analytes for every batch of analyses. If this requires a disproportionately large number of calibrations, the determination system must be calibrated with a minimum number of representative analytes.

- 42... gli analiti rappresentativi **devono essere scelti con molta attenzione**, per fornire la prova che la selezione realizzata è accettabile per tutti gli altri analiti.

Therefore representative analytes must be chosen very carefully, to provide enough evidence that acceptable screening is achieved for all other analytes.

The choice should be made according to the probability of finding residues in the sample and the physico-chemical characteristics of the analytes i.e. analytes likely to give the poorest and most variable response.

[1] Un analita usato per valutare la prestazione più probabili e utilizzando un altro analita nell'analisi. I dati accettabili per un analita rappresentativo sono dati presunti per mostrare che quella prestazione è soddisfacente. L'analita rappresentativo deve includere quelli per cui ci si aspetta la prestazione peggiore.

Validazione del metodo

Nel documento FAO/IAEA “**Guidelines for single laboratory validation of analytical methods for trace-level concentrations of organic chemicals**” – annex 3 al punto 3 validazione del metodo si riporta:



The laboratory selected **representative pesticides** and ... **representative commodities** for validating the method ...

Le matrici dei PT, in base alle loro caratteristiche, possono essere così raggruppate...

Gruppo	Proprietà	Matrice
I	Alto contenuto di acqua e clorofilla	Lattuga, cetriolo, zucchino
II	Alto contenuto di acqua e basso o assente contenuto di clorofilla	Mele, actinidia, uva, pomodoro, peperone
III	Alto contenuto di acidità	arance

Nei **3 gruppi di matrici**, rientrano la maggior parte dei prodotti ortofrutticoli analizzati e portati sulle tavole dei consumatori

Risultati dei PT

P.A. Analizzati	Soddisfacenti		Discutibili		Non Soddisfacenti	
	n.	%	n.	%	n.	%
549	475	86,5	44	8	30	5,5

Aggiornamento dati al dicembre 2005

Come valorizzare le informazioni provenienti dai PT ?

Utilizzare le informazioni derivanti dai PT per **sottolineare e ribadire la validità del criterio:**

- ✓ **delle matrici rappresentative**
- ✓ **dei parametri rappresentativi**

Verifica del criterio delle matrici rappresentative

- ✓ Sono state considerate solo le matrici appartenenti ad un determinato gruppo (es.: I, II)
- ✓ Sono stati fatti confronti statistici solo fra p.a. comuni a più matrici del medesimo gruppo
 - ✓ es.: la s.a. diazinone comune a più matrici (lattuga e cetriolo)
- ✓ Sono stati utilizzati solo le s.a. con z-score soddisfacenti ($-2 \leq z \leq 2$)
- ✓ Il confronto è stato fatto con l'applicazione di test statistici (Shapiro-Wilk, Dixon, Grubb, ecc.) al **95% di probabilità**

Gruppo II

Rappresentatività delle matrici

<i>Parametri</i>	<i>Matrice 1</i>	<i>Matrice 2</i>	<i>Matrice 3</i>	<i>Matrice 4</i>	<i>t Test/Anova</i>
Azoxistrobina	actinidia	pomodoro			nds
Clortalonil	actinidia	pomodoro			nds
Diazinone	peperone	pomodoro	mela	uva	nds
Endosulfan	peperone	pomodoro			nds
Iprodione			mela	uva	nds
Metidation	actinidia		mela		nds
Procimidone	peperone	pomodoro		uva	nds
Tiabendazolo		pomodoro		uva	nds

Gruppo I

<i>Parametri</i>	<i>Matrice 1</i>	<i>Matrice 2</i>	<i>Matrice 3</i>	<i>t Test</i>
Deltametrina	cetriolo		zucchino	nds
Diazinone	cetriolo	lattuga		nds
Metalaxil	cetriolo		zucchino	nds
Vinclozolin	cetriolo		zucchino	nds

nds = nessuna differenza significativa al 95% di probabilità

Conferma criterio matrici rappresentative

da quanto è emerso dai risultati ottenuti,
per le matrici esaminate (Gr. I, II), al
95% di probabilità, c'è **confrontabilità
delle matrici e quindi**



da quanto si è potuto constatare
**il criterio della rappresentatività
delle matrici risulta confermato**

Verifica del criterio dei parametri rappresentativi

Nell' *Annex 3 Worked example of method validation, as applied to a method for pesticides residues* sono riportati i criteri per la scelta delle s.a. rappresentative

Il documento considera le seguenti caratteristiche per valutare le s.a.:

- ✓ **solubilità in acqua**
- ✓ **Log P_{ow}**
- ✓ **tensione di vapore**
- ✓ **idrolisi in acqua come DT_{50} .**

Legenda: P_{ow} : octanol/water partition coefficient

Parametri ordinati per solubilità in acqua

Principio attivo	Solubilità in acqua (mg/l)	Principio attivo	Solubilità in acqua (mg/l)	Principio attivo	Solubilità in acqua (mg/l)
mevinfos	1000000	difenilammina	53	kresoxim m	2
monocrotofos	1000000	azinfos metile	28	fludioxonil	1,8
metalaxil	8400	nuarimol	26	clorpirifos	1,4
tolilfluanide	4000	fosmet	25	diclofluanide	1,3
oxadixil	3400	dimetoato	23,8	tolclofos metile	1,1
pirimicarb	3000	fenexamide	20	clorotalonil	0,81
propoxur	1900	quinalfos	17,8	bromopropilato	0,5
metidation	200	propizamide	15	endosulfan	0,32
imazalil	180	ciprodinil	13	metossicloro	0,1
tetraconazolo	156	iprodone	13	quintozene	0,1
malation	145	paration	11	permetrina	0,006
miclobutanil	142	azoxistrobina	6	lambda cialotrina	0,005
pirimetanil	121	procimidone	4,5	cipermetrina	0,004
carbaril	120	tiabendazolo	3	deltametrina	0,0002
diazinone	60	clorpirifos metile	2,6		
		vinclozolin	2,6		

Classi di solubilità in acqua dei p.a.

- I p.a. sono stati suddivisi considerando la loro solubilità in acqua.
- Sono state costituite **n. 5 classi** di p.a. in base al loro valore, in mg/l, di solubilità in acqua alla temperatura di 20°C.

Classe	Solubilità in acqua	N. p.a.
A	$x \leq 1$	9
B	$1 < x \leq 10$	10
C	$10 < x \leq 100$	9
D	$100 < x \leq 1000$	6
E	$x > 1000$	9

La colonna "N. p.a." indica quante s.a. oggetto di *PT* rientrano nelle 5 classi di solubilità predisposte.

Esempio: s.a. appartenenti alla CLASSE B

$1 < x \leq 10$	Sol. (mg/l)	$1 < x \leq 10$	Sol. (mg/l)	$1 < x \leq 10$	Sol. (mg/l)
Anilazina	8	Diclofluanide	1,3	Mepanipirim	3,1
Azinfos etile	4,5	Dicloran	7	Pirazofos	4,2
Azoxistrobina	6	Etion	2	Pirimifos etile	2,3
Benfuracarb	8,1	Fenoxicarb	7,9	Pirimifos m	9
Bitertanolo	2	Fention	4,2	Procimidone	4,5
Cloroneb	8	Fentoato	10	Propizamide	15
Clorpirifos	1,4	Fludioxonil	1,8	Tiabendazolo	3
Clorpirifos m	2,6	Fosalone	3,05	Tebufenpirad	2,6
Clozolate	2	Iodofenfos	2	Tolclofos m	1,1
Diclobutrazolo	9	Kresoxim m	2	Vinclozolin	2,6

Carattere grassetto per le s.a. dei proficiency test

Confronto fra parametri rappresentativi

Sono stati fatti confronti fra più p.a. appartenenti alla **stessa classe di solubilità** e nella **stessa matrice**

Sono state effettuate elaborazioni statistiche (*Test di: Shapiro Wilk, Dixon, Grubb, Anova*) confrontando i risultati conseguiti nei PT dai laboratori, per valutare, **al 95%** di probabilità^(*), la confrontabilità dei parametri

^(*) Qualora il confronto evidenziasse differenze statisticamente significative al 95% di probabilità, è stata considerata l'applicazione del test di Anova al 99% di probabilità.

Parametri rappresentativi: esempio di alcuni confronti

Matrici gruppo II

Matrici	classi	n. pa	parametri	p.a.
Pomodoro	A	3	Bromopropilato Clortalonil endosulfan	nds
uva	D	3	Carbaril, pirimetanil Tetraconazolo	nds

Matrici gruppo III (arancia)

classi	n. pa	parametri	p.a.
B	3	azoxistrobina clorpirifos clorpirifos m	nds
C	3	azinfos m diazinone paration	nds

Matrici gruppo I

matrice	classi	n. pa	parametri	p.a.
cetriolo	A	3	Deltametrina Permetrina endosulfan	nds
lattuga	C	4	Diazinone Fosmet Paration propizamide	nds

Legenda:

✓ nds – nessuna differenza significativa al 95%

Parametri rappresentativi: Considerazione sui confronti

Fra i p.a. appartenenti alla
stessa classe di solubilità,
nell'ambito dei **gruppi di matrici**
esaminati, viene confermato il
**criterio dei parametri
rappresentativi**

Confronti ⁽¹⁾ sul metodo B4...

(1): confronti fra i risultati dei PT di più p.a. appartenenti alla **stessa classe di solubilità** e nella **stessa matrice**.

Sono stati utilizzati test statistici per confrontare i risultati conseguiti nei PT dai laboratori, per valutare, **al 95%** di probabilità (*), l'eventuale differenza qualora:

- ✓ siano portate all'analisi diverse quantità, in g, di campione
- ✓ utilizzo di diversa tipologia di terra di diatomee
- ✓ impiego o meno dell'automazione nell'estrazione
- ✓ influenza della purificazione sul risultato analitico
- ✓ confronto fra i diversi tipi di solvente di estrazione
- ✓ impiego di un diverso volume di solvente di estrazione
- ✓ la quantificazione con retta (multilivello) o con uno standard esterno
- ✓ l'influenza dello standard di processo nell'analisi quantitativa
- ✓ confronto fra risultati conseguiti preparando lo standard in matrice o in solvente

(*) Qualora il confronto avesse evidenziato differenze statisticamente significative al 95% di probabilità, i test venivano ripetuti al 99% di probabilità.

Riassunto confronti sul metodo

Gruppo I (Matrici: cetriolo e lattuga)

matrice	classi	n. pa	parametri	p.a.	Q.tà	Terra diatomee	ASE	Solv tipo
cetriolo	A	3	Deltametrina Permetrina endosulfan	nds	nds	nds	nds(*)	nds(*)
lattuga	C	4	Diazinone Fosmet Paration propizamide	nds	nds	nds	nds	nds

matrice	classi	n. pa	parametri	Purific	vol sol.	Std Solv.	Retta o singolo	Std proc.
cetriolo	A	3	Deltametrina Permetrina endosulfan	nds(*)	nds	nds	nds	nds
lattuga	C	4	Diazinone Fosmet Paration propizamide	nds	nds	nds	nds	nds

Legenda:

- ✓ nds – nessuna differenza significativa al 95%
- ✓ nds(*) - nessuna differenza significativa al 99%

(Alcuni esempi)

Riassunto confronti sul metodo

Gruppo II (matrici: pomodoro e uva)

Matrici	classi	n. pa	pa	p.a.	Q.tà	Terra diatomee	ASE	Purif.
Pomodoro	A	3	Bromopropilato Clortalonil endosulfan	nds	nds	nds	nds(*)	nds
uva	D	3	Carbaril, pirimetanil Tetraconazolo	nds	nds	nds	nds	nds

Matrici	classi	n. pa	pa	Solv tipo	vol solv.	Std Solv.	Retta o singolo	Std proc.
Pomodoro	A	3	Bromopropilato Clortalonil endosulfan	nds	nds	nds	nds	nds
uva	D	3	Carbaril, pirimetanil Tetraconazolo	nds	nds	nds	nds	nds

Legenda:

- ✓ nds – nessuna differenza significativa al 95%
- ✓ nds(*) - nessuna differenza significativa al 99%

(Alcuni esempi)

Riassunto confronti sul metodo

Gruppo III (matrice: Arancia)							
classi	n. pa	parametri	p.a.	Q.tà	Terra diatomee	ASE	Solv tipo
B	3	azoxistrobina clorpirifos clorpirifos m	nds	nds	nds	nds	nds
C	3	azinfos m diazinone paration	nds	nds	nds	nds	nds

classi	n. pa	parametri	Purific	vol solv.	Std Solv.	Retta o singolo	Std proc.
B	3	azoxistrobina clorpirifos clorpirifos m	nds	nds	nds(*)	nds	nds
C	3	azinfos m diazinone paration	nds	nds	nds	nds	nds

Legenda:

- ✓ nds – nessuna differenza significativa al 95%
- ✓ nds(*) - nessuna differenza significativa al 99%

(Alcuni esempi)

Per quanto attiene i confronti a sostegno del metodo di prova B4...

➤ Si rileva “nds al 95% di probabilità” per le seguenti fasi del metodo:

- **Fase preparativa/estrattiva**

- quantità, in g, di campione portata all'analisi
- impiego di diversa tipologia di terra di diatomee
- utilizzo o meno di sistemi automatici di estrazione *
- diversi tipi di solvente di estrazione *
- un diverso volume di solvente di estrazione
- nessuna influenza della purificazione sul risultato analitico *

- **Quantificazione**

- con retta (multilivello) o con uno standard esterno
- Impiego o meno dello standard di processo
- utilizzo dello standard in matrice o in solvente *

* pochi casi al 99% di probabilità

Considerazione...

Dai risultati dei PT e dai confronti fatti, al 95% di probabilità^(*), emerge che il metodo di prova più utilizzato dai laboratori (B4), analizzando p.a. in un ampio range di solubilità, e per le matrici riconducibili ai gruppi I, II e III è robusto

^(*) pochi casi al 99% di probabilità

Metodo B4: Matrici oggetto di validazione e livelli di concentrazione

Cod. Lab.	Gr II	Gr II	Gr I	Gr I	Gr III	Gr II	altri
1							
2	mela (0,03-0,2)		zucchine (0,03-0,2)				
3		pere (0,1)		lattuga (0,1)	limone (0,1)		
4	mela (0,1)						farina (0,2-0,4)
5		pere (0,1-0,3)				pomodoro (0,1-0,4)	
6	mela (0,2-3)						
7	mela (0,15)						
8							
9							
10			zucchine (0,13)				
11	mela (0,1)						farina (0,3)
12	mela			lattuga(0,02)			
13	mela (0,04-0,2)		zucchine (0,04-0,2)		limone (0,04-0,2)	pomodoro (0,04-0,2)	farina (0,04-0,2)

Cod. Lab.	8m	9m	10 m	11m	12m
1					
2					
3					
4					
5		Cachi (0,01)	Uva (0,1-1)		Vino(0,01-0,04)
6					
7					
8				patate (0,1)	
9					
10					
11					
12					
13	fagiolo (0,04-0,2)				

Dati di validazione dei metodi di prova dei laboratori...

- Sono state considerate solo le **s.a. comuni a più laboratori**
- è stato verificato che lo **scarto tipo di ripetibilità (S_r)**, in fase di validazione, rispettasse la condizione:

$$\frac{1}{2} \sigma_R \leq S_r \leq \frac{2}{3} \sigma_R \quad (*)$$

- Disponendo di livelli di concentrazione differenti, i dati, per essere confrontati, sono stati **normalizzati rispetto all'incremento teorico**

(*): σ_R scarto tipo valutato con la relazione di Horwitz.

parametro	matrice	cod.lab.	n	it	M	S _r	CV%	σ _H	S _r /σ _H ≤ 2/3	R%
azoxistrobin	mele	12	3	0,05	0,048	0,00346	7,2	0,01056	Ok	98
		12	6	0,1	0,076	0,00157	2,1	0,01669	Ok	77
		13	5	0,25	0,228	0,02084	9,1	0,04554	Ok	93
		6	5	0,45	0,412	0,04499	10,9	0,07537	Ok	92
Clortalonil	mele	12	3	0,05	0,041	0,00902	2,4	0,00902	Ok	89
		12	6	0,09	0,074	0,01629	5,2	0,01629	Ok	80
		12	6	0,23	0,178	0,03688	12,8	0,03688	Ok	77
		4	8	0,1	0,086	0,00804	9,4	0,01883	Ok	86
		7	6	0,15	0,132	0,01762	13,4	0,02857	Ok	88
diazinone	mele	7	6	0,15	0,147	0,00893	6,1	0,03132	Ok	98
		6	5	0,49	0,415	0,03796	9,2	0,07576	Ok	84
	pere	3	8	0,1	0,08	0,00515	6,4	0,01768	Ok	80
		13	6	0,05	0,048	0,00415	8,6	0,01056	Ok	98
	mele	13	6	0,025	0,019	0,00042	2,02	0,00407	Ok	75
13		6	0,1	0,082	0,00534	6,05	0,01797	Ok	83	
dimetoato	pere	3	5	0,39	0,43	0,04381	10,2	0,07816	Ok	110
		7	6	0,15	0,145	0,00552	3,8	0,03103	Ok	97
	pere	3	8	0,1	0,095	0,00623	6,6	0,02085	Ok	95

Gr. II - Risultati validazione

parametro	matrice	cod.lab.	n	it	M	S _r	CV%	σ _H	S _r /σ _H ≤ 2/3	R%
metidation	mele	7	6	0,15	0,153	0,01009	6,6	0,0324	Ok	102
		6	5	0,8	0,733	0,03974	5,4	0,12295	Ok	92
		12	6	0,25	0,229	0,02078	9,1	0,04578	Ok	92
		12	6	0,1	0,086	0,00303	3,5	0,01894	Ok	86
		13	6	0,05	0,04	0,00252	6,3	0,0088	Ok	78
		13	6	0,025	0,023	0,00107	4,07	0,00506	Ok	89
		13	6	0,1	0,089	0,00915	9,2	0,01958	Ok	87
procimidone	mele	7	6	0,15	0,131	0,01115	8,5	0,02839	Ok	87
		2	6	0,03	0,029	0,00058	2	0,00645	Ok	105
		2	6	0,18	0,181	0,00187	1	0,03746	Ok	100
		11	6	0,2	0,148	0,00408	2,8	0,03163	Ok	74
endosulfan a	mele	7	6	0,15	0,135	0,00733	5,4	0,02923	Ok	90
		6	5	0,72	0,566	0,03548	6,3	0,09862	Ok	79
	pere	3	7	0,1	0,076	0,00447	5,9	0,01672	Ok	76
		mele	13	6	0,025	0,019	0,00061	3,2	0,00418	Ok
	pomodoro	13	6	0,025	0,018	0,00067	3,7	0,00396	Ok	72
endosulfan b	pere	3	8	0,1	0,093	0,00656	7	0,02052	Ok	93
		mele	13	6	0,005	0,006	0,00036	6	0,00132	Ok
endosulfan s	mele	7	6	0,15	0,138	0,00889	6,4	0,02975	Ok	92
		6	5	0,55	0,482	0,03502	7,3	0,08609	Ok	87
		13	6	0,005	0,005	0,00059	11,8	0,00113	Ok	98

Legenda:
It: incremento teorico
n: numero delle prove
M: media dei risultati
S_r: scarto tipo di ripetibilità
CV%: coefficiente di variazione
σ_H: scarto tipo di riproducibilità secondo la Horwitz
R%: recupero percentuale

Parametro	Gruppo	matrice	Concentrazione		Recupero			cod. Lab
			min	Max	R%	CV%	n	
azinfos met	III	limone	0,05	0,05	99	4	6	13
		arancia	0,21	0,21	92	10	5	EUPT4
azoxistrobina	II	mele	0,05	0,1	84	7	9	12
			0,25	0,25	93	8	5	13
			0,45	0,45	92	10	5	6
	III	arancia	0,25	0,25	85	10	3	12
arancia		0,263	0,263	86	16	6	EUPT4	
clorpirifos	III	arancia	0,05	0,09	79	6	12	12
		limone	0,05	0,05	84	3	6	13
clorpirifos met	III	arancia	0,04	0,22	87	8	18	12
			0,159	0,159	100	14	6	EUPT4
clortalonil	II	mele	0,05	0,23	81	17	15	12
			0,1	0,1	86	8	6	4
			0,15	0,15	88	12	6	7
diazinone	I	zucchino	0,05	0,05	93	4	6	13
		lattuga	0,1	0,1	78	4	6	3
			0,109	0,109	87	13	7	EUPT5
	Cetriolo	0,143	0,143	93	24	4	EUPT3	
	II	mele	0,15	0,15	98	6	6	7
			0,49	0,49	84	8	5	6
		pere	0,1	0,1	80	5	8	3
	mele	0,025	0,1	85	5	18	13	
		III	Limone	0,05	0,05	91	5	6
	0,1			0,1	86	3	8	3

Gruppi I, II e III: Riassunto risultati con dati di precisione e recupero

Parametro	Gruppo	matrice	Concentrazione		Recupero			cod. Lab
			min	Max	R%	CV%	n	
dimetoato	II	pere	0,1	0,39	101	8	13	3
		mele	0,15	0,15	97	4	6	7
endosulfan a	II	mele	0,15	0,15	90	5	6	7
			0,72	0,72	79	5	5	6
		pere	0,1	0,1	76	4	7	3
endosulfan b	II	Mele, pomodoro	0,025	0,025	74	3	12	13
		pere	0,1	0,1	93	7	8	3
endosulfan s	II	mele	0,005	0,005	100	7	6	13
			0,15	0,15	92	6	6	7
endosulfan	II	pomodoro	0,55	0,55	87	6	5	6
			0,005	0,005	98	12	6	13
			0,344	0,344	101	20	8	EUPT6
metidation	II	mele	0,15	0,15	102	7	6	7
			0,8	0,8	92	5	5	6
			0,1	0,25	89	6	12	12
			0,025	0,1	85	6	18	13
procimidone	II	mele	0,15	0,15	87	7	6	7
			0,03	0,18	103	2	12	2
			0,2	0,2	74	2	6	11
vinclozolin	I	zucchino	0,05	0,05	88	4	6	13
		Lattuga	0,1	0,1	88	6	6	3
		ceetriolo	0,216	0,216	93	5	5	EUPT3

Legenda:

min: concentrazione minima

Max: concentrazione massima

R%: recupero espresso in %

CV%: coefficiente di variazione %

n.: numero prove

Considerazione

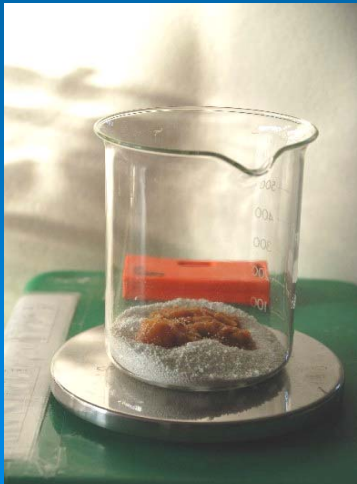
➤ Considerate le elaborazioni statistiche, di cui ai **gruppi I, II e III precedenti**, si dispongono di informazioni (**precisione** e **accuratezza**) per il metodo di prova B4 limitatamente alle s.a. ed ai gruppi di matrici:

- **Gruppo I - alto contenuto di acqua e di clorofilla:**
 - diazinone, vinclozolin
- **Gruppo II - alto contenuto di acqua e basso o assente contenuto di clorofilla:**
 - azoxistrobina, clortalonil, diazinone, dimetoato, endosulfan alfa, endosulfan beta, endosulfan solfato, metalaxil, metidation, procimidone, tiabendazolo
- **Gruppo III - alto contenuto di acidità:**
 - azinfos m, azoxistrobina, clorpirifos, clorpirifos m, diazinone

Proposta di metodo di prova ...

- Pesare:
 - Da 5 a 15 g di campione omogenato con circa 15-20 g di terra di diatomee
- Miscelare
 - accuratamente il campione e la terra di diatomee (t.d.) sino ad ottenere un materiale pulvirulento senza grumi
- Estrazione di tipo:
 - Manuale: caricando su colonna la miscela campione + t.d.
 - Automatica: caricando nelle celle dell'apparecchiatura la miscela campione + t.d

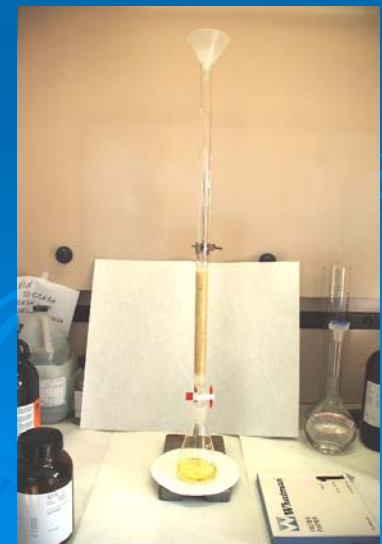
Mescolare il campione con
Terra di diatomee



Estrazione con
apparecchiatura automatica



Estrazione su colonna



➤ **Eluizione con un volume di:**

- V1 ml se etile acetato (con V1 compreso fra 25 e 80 ml)
- V2 ml se diclorometano (con V2 compreso fra 100 e 150 ml)

➤ **Raccogliere l'eluato**

➤ **evaporare il solvente**

➤ **Eventuale purificazione del campione (in G.P.C.)**

➤ **Analisi strumentale**

- **stessi rivelatori impiegati dai laboratori per le medesime matrici ed i medesimi p.a. nei proficiency test e nella fase di validazione**



Raccogliere l'eluato ed i lavaggi in beuta da 200 ml



3 ml di campione ripresi con etile acetato e cicloesano, purificati in GPC, e ripresi 0.5 ml di miscela n-esano acetone, 1:1



Portare a piccolo volume con evaporatore rotante ed a secco con corrente di azoto



*Analisi strumentale:
GC e/o GC-MS*

Proposta del gruppo di lavoro AAAF

Il metodo di prova

viene proposto al

Ministero della Salute

quale

***“metodo di prova per il controllo dei residui
dei prodotti fitosanitari nell’ortofrutta”***

Quale il futuro?

This method is called

“**QuEChERS**”,

which stands for:

*Quick, Easy, Cheap,
Effective, Rugged and
Safe.*


Draft prEN15662 april 2007: Food of plant origin - determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS(/MS) following acetonitrile extraction/partitioning and cleanup by dispersive SPE - QuEChERS - method

Quale il limite?


- *Nessun rapporto di concentrazione (uso di acetonitrile)*
- *Strumentazione costosa (LC-MS(/MS) e GC-MS(/MS))*

Metodo QuEChERS: alcune fasi ...

Weigh out 10.0 g sample
Add 10-mL acetonitrile;
Vortex 1 min



Weigh out 1 g NaCl + 4g MgSO₄
add to tube and vortex 1 min



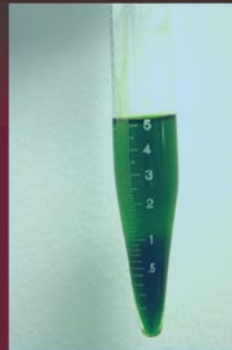
and CENTRIFUGE



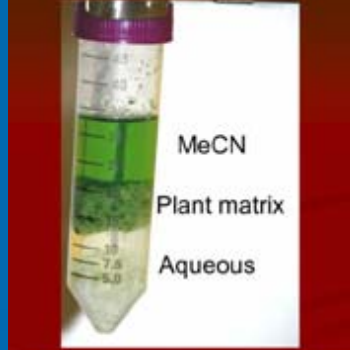
Add PSA and MgSO₄ to the centrifuge tube and vortex mix



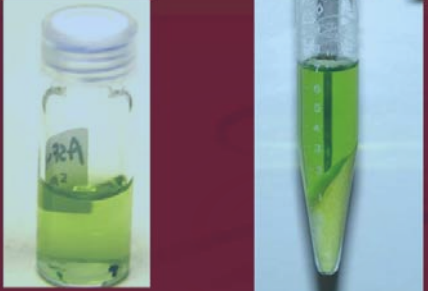
Decant supernatant into a 15-mL graduated centrifuge tube



MeCN
Plant matrix
Aqueous

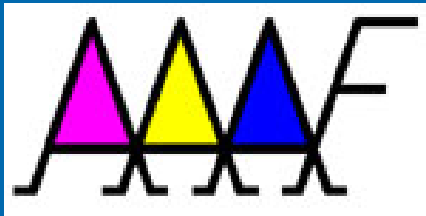


Centrifuge and, transfer to vial



Bibliografia

- Linee guida per la validazione dei metodi analitici e per il calcolo dell'incertezza di misura – I manuali Arpa
- I50451/LM Validazione e calcolo dell'incertezza di misura dei metodi di prova chimici – ARPA Emilia-Romagna
- Regolamento (CE) n. 396/2005 ... concernente i livelli massimi di residui di antiparassitari nei o sui prodotti alimentari e mangimi di origine vegetale e animale e che modifica la direttiva 91/414/CEE del Consiglio
- SANCO/10232/2006:”Quality control procedures for pesticide residues analysis
- SANCO/3131/2007:” method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed
- Rapporti Istisan 97/23, 97/24 e 6/06
- SINAL documento DG 0007 e PT0002
- FAO/IAEA “Guidelines for single laboratory validation of analytical methods for trace-level concentrations of organic chemicals
- Annex 3 Worked example of method validation, as applied to a method for pesticides residues
- The Pesticide Manual 13 edizione editor CDS Tomlin BCPC 2003



**GRUPPO DI LAVORO
APAT - ARPA - APPA
FITOFARMACI**



Un Grazie a tutti per l'attenzione!

Dr Marco Morelli

Arpa Regione Emilia-Romagna

Tel. 0532 901214 fax 0532 901241

E-mail: mamorelli@arpa.emr.it