



Descrizione di un criterio di scelta della griglia di fitofarmaci da utilizzare per la validazione dei metodi multiresiduo su matrici vegetali

M.C. Manca, D. Mirella, A. Arcoraci, V. Granellini, B. Preziosi
ARPACampania - Laboratorio Specializzato Fitofarmaci*

La determinazione dei residui di prodotti fitosanitari ha sempre rappresentato una grossa sfida analitica per i laboratori impegnati nel controllo ufficiale degli alimenti:

- Elevata diversità di matrici ortofrutticole (acide, basiche, grasse, con alto o basso tenore di acqua...)

Elevato numero di principi attivi autorizzati

Più di 400 molecole di diverse classi organiche



proprietà chimico-fisiche differenti

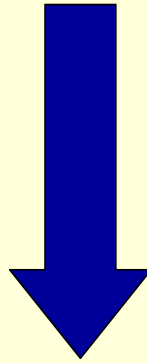
Inoltre il metodo analitico da utilizzare deve essere "adatto allo scopo" ovvero deve rispondere ai criteri di:

- Affidabilità
- Applicabilità
- Praticabilità

Va da sè che l'affidabilità e la applicabilità sono caratteristiche intrinseche di un metodo ovvero ci dicono per quali parametri e con quale accuratezza, precisione... il metodo è utilizzabile.

La praticabilità racchiude in se anche altre considerazioni, come ad esempio il tempo necessario per una analisi, il personale che si ha a disposizione, il costo. Tutte caratteristiche importantissime nell'economia di gestione ma che spesso non vengono considerate nel tentativo di spaccare il "capello in quattro".

Dando il giusto peso ad ognuno dei tre criteri è evidente che la scelta migliore, per laboratori che lavorano su molti campioni ed in cieco su un elevato numero di principi attivi, è quella di utilizzare



Metodi multiresiduo

Ai fini del controllo, l'utilizzo di metodi ottimi per la determinazione di un singolo principio attivo o di una sola classe di sostanze appare totalmente inadeguata e costosissima per tempo, costi e personale.

Da anni la tendenza nel settore è quella di utilizzare metodi multiresiduo in grado cioè di identificare più classi di composti con un'unica determinazione analitica.

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

Rapporti Istisan 97/23 -I.S.S.

Una ulteriore complicazione nasce dalla necessità dell'accreditamento dei laboratori ai sensi della norma ISO 17025 per la quale è richiesto l'uso di metodi normati o ufficiali:

Purtroppo nessuno dei metodi multiresiduo, normalmente utilizzati dai laboratori di controllo, risulta normato o ufficiale.

È quindi necessario per l'accreditamento effettuare la validazione interna delle metodiche multiresiduo che il laboratorio intende utilizzare.

A questo punto sorgono alcuni problemi relativi alla validazione interna di un metodo multiresiduo dovuti ai ben noti parametri di:

- Selettività;
- Limite di rilevabilità;
- Limite di quantificazione;
- Intervallo di lavoro ed intervallo di linearità;
- Precisione (ripetibilità e riproducibilità);
- Accuratezza;
- Sensibilità;
- Robustezza;
- Recupero;
- Incertezza.

In accordo con la 17025 ogni principio attivo ricercato su una singola matrice andrebbe valutato secondo tutti questi parametri.

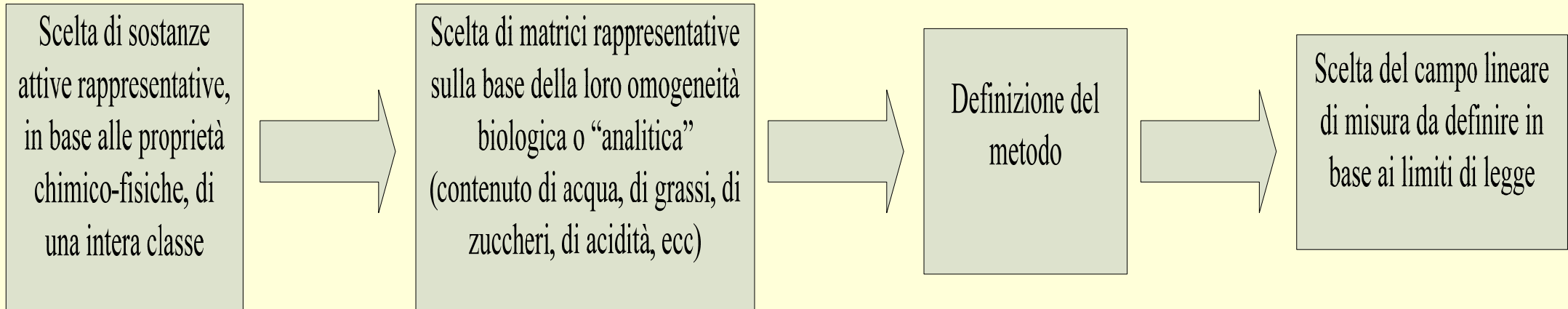
Ma, come ha già più volte fatto rilevare il Gruppo AAAF, ciò è improponibile data l'enorme quantità di dati e la immane mole di lavoro che questo approccio richiederebbe

Da queste considerazioni nasce l'esigenza di utilizzare un approccio "semplificato" in cui:

- tenere conto delle caratteristiche delle matrici
- raggruppare in famiglie rappresentative
- cercare dei criteri che, sulla base delle proprietà chimico-fisiche delle molecole da determinare, ne permettano la divisione in classi analitiche
- I componenti di ogni classe, con buona approssimazione, si considerano analoghi rispetto al metodo prescelto.

Anche l'Unione Europea nelle linee guida "Quality Control Procedures for Pesticide residues analysis" (Documenti SANCO 10232/2006) nel capitolo Analytical methods and analytical performances Method Validation, prevede un approccio semplificato al problema della validazione per il metodo multiresiduo, assumendo la possibilità di scegliere e validare solo alcuni p.a. rappresentativi di tutti e solo in alcune matrici rappresentative di tutte.

L'approccio semplificato può essere riassunto nei seguenti punti:

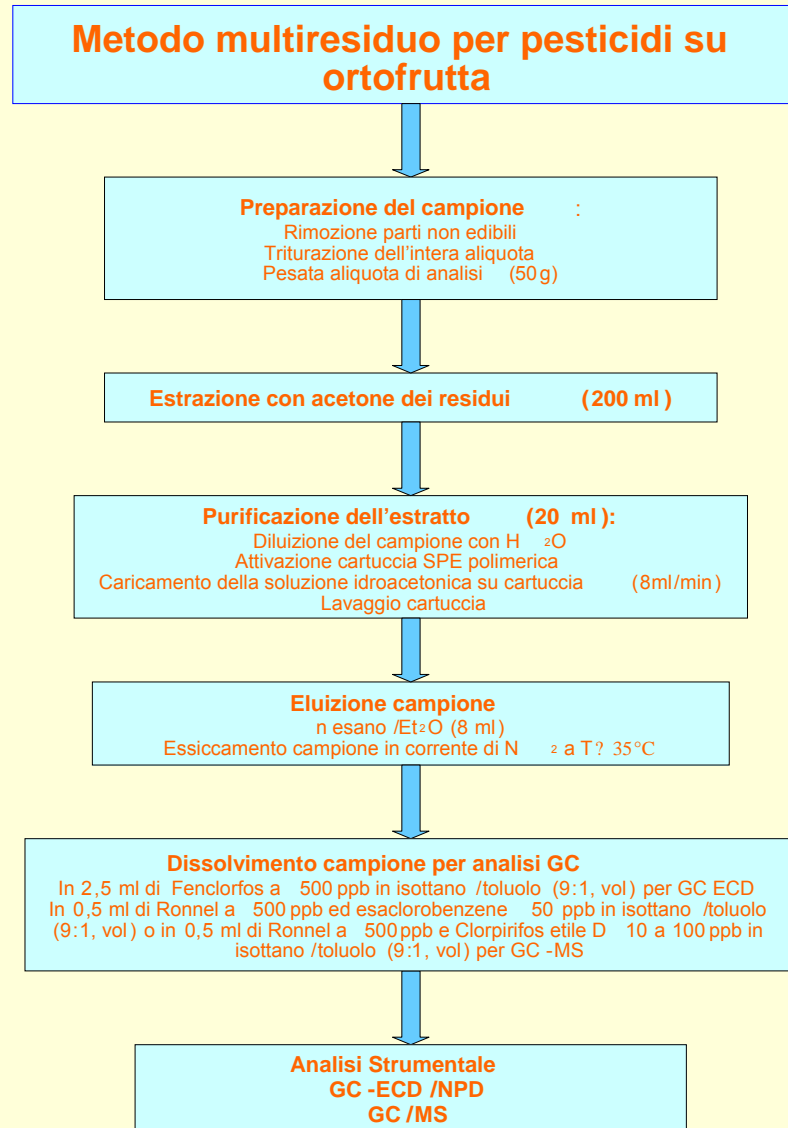


La scelta delle sostanze attive rappresentative di una intera classe è estremamente delicata:

- Deve essere significativa rispetto al metodo prescelto
- Rappresenta il mezzo con cui viene validato il metodo
- Costituisce il mezzo di controllo per valutare nel tempo le performance analitiche del laboratorio

La validazione va fatta, ma va anche mantenuta e ricontrollata nel tempo

Il metodo multiresiduo maggiormente utilizzato nel nostro laboratorio è quello che utilizza le cartucce SPE C18.



Criteri di selezione dei principi attivi

- il primo criterio di selezione dei principi attivi è rappresentato dalla solubilità delle molecole in acqua, un parametro determinante nell'interazione con la fase solida polimerica avendo cura di coprire tutto lo spettro di azione
- Il secondo criterio utilizzato è quello della "gascromatografabilità" delle sostanze e la loro rilevabilità con i rivelatori selettivi e non (MS, ECD, NPD)

Classe	Solubilità
A	$x \leq 1$
B	$1 \leq x \leq 10$
C	$10 \leq x \leq 100$
D	$100 \leq x \leq 1000$
E	$x \geq 1000$

I principi
ricercati
dal
laboratorio...

GRIGLIA PRINCIPI ATTIVI RICERCATI DAL LABORATORIO DETERMINABILI CON IL METODO				
acephate	DDE op	ethafluralin	metamidofos	prometrina
alachlor	DDE pp	ethion	metazaclor	propargite
aldrin	DDT op	etoprofos	metidathion	propazina
azinfos metile	DDT pp	fenarimol	metolaclor	propiconazolo
aziphos ethyl	deltametrina	fenclorfos ronne	metoxyclor	propiconazolo iso
azossistrobina	diazinone	fenitrothion	metribuzim	propizamide
benfluralin	dichlofention	fenpropathrin	monocrotofos	pyrazofos
bifentrina	diclobenil	fenson	myclobutanil	pyridiafenthion
bitertanolo	diclofuanide	fenthion	naled	quinalfos
brompropylate	dicloran	fenvalerate	nuarimol	simazina
bupirimate	diclorvos DDVP	flucitriate	ometoato	tebuconazolo
captafol	dicofol	fluvalinate	oxadixil	terbutilazina
captan	dieldrin	folpet	paraoxon etile	terbutilazina desetil
Cialotrina lambda	Dimetaclor	forate	Paraoxon metile	terbutrina
Cianazina	dimetoato	formothion	parathion	tetraclorvinfos
cipermetrina	Dinitramina	fosalone	parathion metile	tetradifon
Ciprodinil	dinocap	fosdrin	penconazolo	tolclofos metile
clordane cis	Disulfoton	fosfamidone	pendimentalin	tolilfluamide
clordane trans	Ditalinfos	imazalil	permetrine cis	triadimefon
clorfenson	endosulfan α	iprodone	Piperonil butossido	triadimenol
clorfenvinfos	endosulfan β	Isodrin	pirimetanil	triazofos
clorpirifos etile	endosulfan sulfato	isofenfos	pirimicarb	triclorphon
clorpirifos metile	endrin	lindano	pirimifos etile	trifluralin
clortaldimetile	eptacloepox	linuron	pirimifos metile	vinclozolin
clortalonil	eptaclor	malaoxon	procimidone	
clozolate	eptenofos	malathion	procloraz	
DDD op	esaclorobenzene	Mecarbam	profenofos	
DDD pp	esaconazolo	metalaxil	promecarb a	

Sono stati suddivisi
secondo le classi
di solubilità
riportate
precedentemente

Solubilità <1mg/l			
Principio Attivo	Tecnica strumentale		Solubilità
acrintrina		ECD	0,02
benfluralin	GC-MS	ECD	0,1
brompropylate	GC-MS	ECD	0,5
cialotrina - I	GC-MS	ECD	0,005
clordane cis	GC-MS	ECD	0,1
clordane trans	GC-MS	ECD	0,1
clorotalonil	GC-MS	ECD	0,81
clortaldimetile	GC-MS	ECD	0,5
cypermetrina_zeta	GC-MS	ECD	0,004
cypermetrina_alfa	GC-MS	ECD	0,004
deltametrina		ECD	0,0002
dicofol	GC-MS	ECD	0,8
dicofol_2,4		ECD	0,8
dinitramina		ECD	1
endosulfan_sulfate	GC-MS	ECD	0,32
endosulfan_alfa	GC-MS	ECD	0,32
endosulfan_beta	GC-MS	ECD	0,33
eptaclor	GC-MS	ECD	0,056
eptacloro_epox_cis	GC-MS	ECD	0,056
eptacloro_epox_trans	GC-MS	ECD	0,056
esaclorobenzene	GC-MS	ECD	0,005
etafluralin	GC-MS	ECD	0,3
fenpropathrin		ECD	0,014
fenvalerate	GC-MS	ECD	0,01
flucitrate	GC-MS	ECD	0,5
fluvalinate_tau	GC-MS	ECD	0,01
folpet	GC-MS	ECD	0,08
metoxyclor	GC-MS	ECD	0,1
oxifluorfen		ECD	0,116
pendimetalin	GC-MS	ECD	0,3
permetrine_cis	GC-MS	ECD	0,2
permetrine_trans	GC-MS	ECD	0,2
tetradifon	GC-MS	ECD	0,078
trifluralin	GC-MS	ECD	0,2

1<Solubilità<10				
Principio Attivo	Tecnica strumentale			Solubilità
anilazina		ECD		8
azinfos ethyl	GC-MS	ECD	NPD	4,5
azossistrobina	GC-MS	ECD		6
bitertanolo	GC-MS	ECD		2,9
captafol	GC-MS	ECD		1,4
captan	GC-MS	ECD		3,3
clorpirifos etile	GC-MS	ECD	NPD	1,4
clorpirifos metile	GC-MS	ECD	NPD	2,6
clozolate	GC-MS	ECD		2
diclofuanide	GC-MS	ECD		1,3
dicloran	GC-MS	ECD		7
dimetaclor	GC-MS	ECD		2,1
dinitramina		ECD		1
ethion	GC-MS	ECD	NPD	2
fosalone	GC-MS	ECD	NPD	3,05
HCH d	GC-MS	ECD		7,3
HCH α	GC-MS	ECD		7,3
HCH β	GC-MS	ECD		7,3
lindano	GC-MS	ECD		7,3
procimidone	GC-MS	ECD		4,5
pyrazofos	GC-MS	ECD	NPD	4,2
tolclofos metile	GC-MS	ECD	NPD	1,1
vinclozolin	GC-MS	ECD		2,6

100<Solubilità<1000				
Principio Attivo	Tecnica strumentale			Solubilità
alachlor	GC-MS	ECD		242
clorfenvinfos_mix	GC-MS	ECD	NPD	145
clorfenvinfos_cis	GC-MS	ECD	NPD	145
clorfenvinfos_trans	GC-MS	ECD	NPD	145
cyanazina		ECD		171
etoprofos	GC-MS	ECD	NPD	700
formothion	GC-MS	ECD		260
imazalil	GC-MS	ECD	NPD	180
malathion	GC-MS	ECD	NPD	145
metazaclor	GC-MS	ECD		430
metidathion	GC-MS	ECD	NPD	200
myclobutanil	GC-MS	ECD	NPD	142
propiconazolo	GC-MS	ECD	NPD	100

10<Solubilità<100				
Principio Attivo	Tecnica strumentale			Solubilità
azinfos metile	GC-MS	ECD	NPD	28
bupirimate	GC-MS	ECD	NPD	22
diazinone	GC-MS	ECD	NPD	60
diclobenil	GC-MS	ECD		14,6
disulfoton	GC-MS	ECD		12
esaconazolo		ECD		17
fenarimol	GC-MS	ECD	NPD	13,7
fenitrotion	GC-MS	ECD	NPD	21
forate	GC-MS	ECD	NPD	50
iprodone	GC-MS	ECD		13
isofenfos	GC-MS	ECD	NPD	18
linuron	GC-MS	ECD		81
nuarimol	GC-MS	ECD		26
parathion	GC-MS	ECD	NPD	11
parathion metile	GC-MS	ECD	NPD	55
penconazolo	GC-MS	ECD	NPD	73
procloraz	GC-MS	ECD		34,4
profenofos	GC-MS	ECD	NPD	28
propizamide	GC-MS	ECD	NPD	15
pyridiafenthion	GC-MS	ECD	NPD	74
quinalfos	GC-MS	ECD	NPD	17,8
tetraclorvinfos	GC-MS	ECD	NPD	11
triadimefon	GC-MS	ECD		64

Solubilità>1000				
Principio Attivo	Tecnica strumentale			Solubilità
diclorvos	GC-MS	ECD		18000
dimetoato	GC-MS	ECD	NPD	25000
eptenofos	GC-MS	ECD	NPD	2200
metribuzim	GC-MS	ECD		1050
tolifluanide	GC-MS	ECD		4000

Il terzo criterio è stato quello di utilizzare tra i principi attivi "papabili" quelli che presentavano un maggior numero di ritrovamenti, perché, a nostro giudizio, rappresentano i parametri da verificare più frequentemente. In altri termini quelli che, da un punto di vista tecnico-analitico, devono essere più efficienti in termini di risposta del metodo ma anche e soprattutto delle apparecchiature.

- Inizialmente avevamo pensato di lavorare solo sui dati interni, ovvero solo su quelli del laboratorio.
- Successivamente ci siamo resi conto che i prodotti ortofrutticoli analizzati non sono tutti provenienti dalla nostra regione, ma spesso è difficile individuarne l'origine
- Inoltre, dato il gran numero di principi attivi non era detto che la nostra griglia fosse la più adeguata per questo scopo.

- Grazie allo spirito collaborativo dei colleghi delle ARPA ed al Gruppo AAAF, abbiamo richiesto i dati analitici del biennio 2004-2005 relativamente all'ortofrutta.
- I dati, provenienti da 20 laboratori, sono stati raccolti ed assemblati in una unica tabella dove sono stati riportati, laboratorio per laboratorio, i principi attivi ricercati ed il numero di positività per ognuno di essi.

In tabella sono stati riportati i 40 principi attivi maggiormente ritrovati sui campioni di ortofrutta, su un totale di 200.

Principio Attivo	Totale	Principio Attivo	Totale
clorpirifos etile	807	carbendazim	59
procimidone	470	clorotalonil	58
endosulfan	249	fosalone	55
imazalil	245	diclofuanide	54
captan	214	pirimifos metile	52
azinfos metile	202	ortofenilfenolo	46
difenilammina	193	fenhexamide	44
clorpirifos metile	154	metalaxil	42
iprodione	120	cipermetrina	38
fenitrothion	119	dicloran	35
cyprodinil	101	tetradifon	34
dimetoato	98	carbaril	34
thiabendazolo	95	azossistrobina	34
malathion	92	tolclofos metile	32
clorprofam	87	parathion	32
tolilfluanide	81	monocrotofos	32
pirimetanil	81	etossichina	31
brompropilato	77	fenthion	29
vinclozolin	70	fludioxonil	27
metidathion	65	dieldrin	27

Ed è stato riportato anche il numero di regioni che li hanno ritrovati. Come era da attendersi i più ritrovati sono anche quelli più ricercati (almeno il 50% delle regioni)

Principio Attivo	Regioni	Totale	Principio Attivo	Regioni	Totale
clorpirifos etile	20	807	metalaxil	11	42
procimidone	17	470	metidathion	10	65
fenitrothion	17	119	fenthion	10	29
azinfos metile	15	202	pirimifos metile	9	52
difenilammina	15	193	azossistrobina	9	34
imazalil	14	245	cyprodinil	8	101
clorpirifos metile	14	154	tolclofos metile	8	32
malathion	14	92	carbaril	8	34
tolilfluanide	14	81	clorprofam	7	87
brompropilato	14	77	pirimetanil	7	81
fosalone	14	55	diclofuanide	7	54
endosulfan	13	249	dicloran	6	35
iprodione	13	120	ortofenilfenolo	4	46
dimetoato	13	98	fenhexamide	4	44
vinclozolin	13	70	cipermetrina	4	38
clorotalonil	13	58	tetradifon	4	34
parathion	12	32	fludioxonil	3	27
captan	11	214	monocrotofos	1	32

Ma si osserva anche che:

- Ciprodinil è tra i primi 15 posti come ricorrenza ma è ritrovato solo in 7 laboratori distribuiti lungo tutto il territorio
- Monocrotofos e fluodioxonil sono ritrovati, rispettivamente, in 1 sola regione ed in 3

Questo potrebbe indicare che una più capillare ricerca di tali principi attivi cambierebbe un po' le posizioni rispetto ai ritrovamenti

Sulla scorta dei criteri utilizzati per la selezione, e dei dati ottenuti qui vediamo riportata la griglia dei principi attivi tra i quali selezionare quelli da utilizzare come griglia di riferimento. Tenendo presente che, nelle classi di solubilità in cui sono presenti in maggiori quantità, va effettuata una ulteriore selezione scegliendo sempre quelli a più bassa, a media e ad alta solubilità

cypermotrina	GC-MS	ECD		0,004
parathion	GC-MS	ECD	NPD	0,014
tetradifon	GC-MS	ECD		0,078
endosulfan sulfate	GC-MS	ECD		0,32
endosulfan alfa	GC-MS	ECD		0,32
brompropylate	GC-MS	ECD		0,5
clorotalonil	GC-MS	ECD		0,81
tolclofos metile	GC-MS	ECD	NPD	1,1
diclofuanide	GC-MS	ECD		1,3
clorpirifos etile	GC-MS	ECD	NPD	1,4
Fluodioxonil	GC-MS	ECD	NPD	1,8
clorpirifos metile	GC-MS	ECD	NPD	2,6
vinclozolin	GC-MS	ECD		2,6
fosalone	GC-MS	ECD	NPD	3,05
captan	GC-MS	ECD		3,3
fention	GC-MS		NPD	4,2
procimidone	GC-MS	ECD		4,5
azossistrobina	GC-MS	ECD		6
dicloran	GC-MS	ECD		7
pirimifos metile	GC-MS	ECD	NPD	9
iprodione	GC-MS	ECD		13
Ciprodinil	GC-MS		NPD	18
Fenexamide	GC-MS	ECD	NPD	20
fenitroton	GC-MS	ECD	NPD	21
azinfos metile	GC-MS	ECD	NPD	28
difenilammia	GC-MS		NPD	68
pirimetanil	GC-MS	ECD	NPD	121
malathion	GC-MS	ECD	NPD	145
imazalil	GC-MS	ECD	NPD	180
metidathion	GC-MS	ECD	NPD	200
tolifluanide	GC-MS	ECD		4000
Metalaxil	GC-MS		NPD	8400
dimetoato	GC-MS	ECD	NPD	25000

- La costruzione di questa griglia non è che un piccolo contributo al lavoro che il gruppo AAAF sta portando avanti circa la definizione di metodi di riferimento ufficiali, e visto anche il breve periodo temporale preso in considerazione, sarebbe auspicabile una ulteriore implementazione introducendo dati ancora più recenti

Infine desideriamo ringraziare i
laboratori che ci hanno gentilmente
inviato i loro dati ed un
ringraziamento particolare al dott.
Lorenzin che ci ha aiutato a
raccolgerli.

Grazie per l'attenzione