DETERMINAZIONE DEI RESIDUI DI PRODOTTI FITOSANITARI (ANTIPARASSITARI). ESTRAZIONE IN FASE SOLIDA (SPE) E ANALISI GASCROMATOGRAFICA CON RIVELATORI SELETTIVI.

Generalità e definizioni

I prodotti fitosanitari sono le sostanze attive o i preparati contenenti una o più sostanze attive utilizzate per la lotta contro i parassiti delle piante e nel controllo delle infestanti nella pratica agronomica.
I residui di questi prodotti (le sostanze attive ed i loro eventuali prodotti di degradazione) possono inquinare le acque superficiali e sotterranee in relazione alla loro solubilità, mobilità nel terreno e persistenza.
Le concentrazioni che vengono generalmente riscontrate nelle acque contaminate sono comprese fra 0,01 μg/L (comunemente considerato come limite di rivelabilità) e 10 μg/L.

1. Campo di applicazione

Il metodo consente l'analisi di un elevato numero di residui di sostanze attive contenute nei prodotti fitosanitari (erbicidi, insetticidi, acaricidi, fungicidi ecc.) nelle acque sotterranee, sorgive, superficiali, destinate o da destinare al consumo umano.
Il metodo è applicabile ad un elevato numero di sostanze attive ed in un ampio intervallo di concentrazione.
In tabella 1 è riportato un elenco indicativo di sostanze attive che possono essere determinate con il presente metodo, il numero CAS, la sensibilità ai rivelatori selettivi, gli ioni più significativi per l'analisi in spettrometria di massa.

2. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla determinazione gascromatografica con rivelatori selettivi (NPD, ECD, MS) delle sostanze attive, dopo che queste sono state estratte dall'acqua con tecnica di estrazione in fase solida (SPE) con cartucce o dischi costituiti da silice legata a catene a 8 o 18 atomi di carbonio (tipo C-8 e tipo C-18), resine stirene divinilbenzene, con cartucce di carbone grafitato.

3. Interferenze e cause di errori

Le maggiori fonti di contaminazione ed interferenze possono derivare dai solventi, dai reagenti, dalla vetreria e dai materiali plastici utilizzati, dalle stesse cartucce o dischi di estrazione in fase solida.
Si raccomanda pertanto l'adozione di particolari precauzioni finalizzate a ridurre questi inconvenienti.
Il materiale plastico delle cartucce di estrazione, dei tappi delle bottiglie di prelievo, dei puntali delle micropipette, dei tappi delle vials ecc. può rilasciare, specialmente a seguito del contatto con i solventi, plastificanti ed altri additivi delle plastiche, come ad esempio ftalati, adipati, zolfo, solfonammidi, alchil- e aril-fostati, cloro-alchil-fosfati, siliconi ecc.; gli stessi composti possono anche derivare da contaminazioni riconducibili alla cessione degli impianti e delle reti di distribuzione.
Tutto il materiale plastico dovrà quindi essere opportunamente testato prima dell'uso.

Se si fa uso di vials per autocampionatore si raccomandano tappi con guarnizione a doppio strato silicone-teflon; una volta forata la guarnizione, è raccomandata la sua sostituzione, se il campione dovesse essere conservato per successive analisi.
Una possibile fonte di contaminazione è rappresentata dall'uso di materiale che sia venuto a contatto con campioni contenenti alte concentrazioni di residui.
Tutta la vetreria utilizzata per l'analisi ed il prelievo deve essere meticolosamente lavata con detergenti per vetreria, risciacquata in successione con acqua, acqua distillata ed acetone.
I gas di trasporto per la gascromatografia e l'azoto utilizzato per l'evaporazione degli estratti devono essere esenti o a bassissimo tenore di ossigeno, acqua e composti organici volatili.
I solventi e gli altri reagenti devono essere di grado di purezza per l'analisi dei residui.
Analisi di bianchi consentono di avere informazioni sulla presenza di eventuali contaminanti o interferenti.
Altre sostanze organiche coestratte insieme ai residui di prodotti fitosanitari, in modo particolare nel caso di acque superficiali, possono rappresentare una causa di interferenze.

4. Campionamento e conservazione dei campioni

I campioni vengono prelevati in recipienti di vetro scuro e sono conservati in frigorifero fino al momento dell'analisi. I tempi di conservazione sono variabili e dipendono dalla sostanza attiva. In linea generale si consiglia di effettuare le determinazioni non oltre i quindici giorni.

5. Apparecchiature

5.1. Normale attrezzatura e vetreria di laboratorio.
5.2. Dispositivo per l'aspirazione sottovuoto di cartucce o dischi.
5.3. Dispositivo per l'evaporazione in corrente di azoto.
5.4. Pompa a vuoto.
5.5. Evaporatore rotante
5.6. Bilancia analitica.
5.7. Strumenti analitici e accessori
5.7.1. Sistema gascromatografico con rivelatori selettivi di tipo azoto –fosforo (GC-NPD) e a cattura di elettroni (GC-ECD).
5.7.2. Gascromatografo con rivelatore a selezione di massa (GC-MS).
5.7.3. Colonne gascromatografiche: colonne capillari in silice fusa di lunghezza 25-30 m, diametro interno 0,25-0,32 mm, spessore film della fase stazionaria 0,10-0,25 μm, con fasi stazionarie a base di metilsilicone o metilsilicone con 5% fenilsilicone; altre fasi stazionarie a diversa polarità, impiegabili per la conferma, sono: metilsilicone con 50% fenilsilicone o cianopropilfenilsilicone.
5.8. Kit in vetro per filtrazione sotto vuoto per membrane da 47 mm.
5.9. Filtri
5.9.1. Filtri fibra di vetro diametro 47 mm.
5.9.2. Filtri in esteri di cellulosa, pori di 0,45 μm, diametro 47 mm.
5.10. Cartucce per estrazione in fase solida, ad esempiotipo C-18, da 500 mg o dischi per estrazione in fase solida, ad esempio tipo C-18 da 47 × 0,5 mm.
5.11 Micropipette .

6. Reagenti

6.1. Acqua pura esente da ftalati.
6.2. Etile acetato per analisi di residui.
6.3. Metanolo per analisi di residui.
6.4. Sodio solfato anidro preferibilmente granulare o terra di diatomee.

6.5. Soluzioni di riferimento
Il laboratorio deve disporre di materiale di riferimento delle sostanze attive nel loro stato fisico originale o, se questi non fossero reperibili in commercio, in soluzione a titolo noto.
Tale materiale di riferimento deve essere di elevata purezza, preferibilmente certificato o comunque garantito, conservato secondo le modalità indicate nella scheda tecnica.
Le soluzioni dei materiali di riferimento vengono preparate sciogliendo il composto in un solvente organico appropriato.
Per la preparazione delle soluzioni primarie concentrate si pesano in genere almeno 10 mg di composto e si sciolgono in solventi quali ad esempio toluene, acetone, etanolo, tenendo conto della solubilità degli analiti.
Le soluzioni primarie concentrate (circa 1000 μg/mL) delle sostanze attive sono stabili in linea generale per molti mesi (12-24) se tenute al riparo della luce, a bassa temperatura e in contenitori di vetro ben chiusi per evitare perdite per evaporazione.
Le soluzioni secondarie diluite (circa 10 μg/mL) hanno in genere un periodo di stabilità più breve (3-6 mesi). Le miscele di più sostanze possono essere meno stabili delle soluzioni dei singoli analiti.
Le soluzioni diluite dei materiali di riferimento (concentrazione ≤1 μg/mL), devono essere indicativamente preparate ad ogni ciclo di analisi.
6.6. Standard interno (internal standard)
Lo standard interno è un particolare analita aggiunto all'estratto finale prima della determinazione gascromatografica; non deve essere una sostanza attiva presente nei campioni reali, deve avere elevata stabilità, non deve avere reattività con le sostanze attive da determinare, deve essere sensibile ai detector utilizzati, avere un tempo di ritenzione intermedio ai composti da determinare ed essere risolto gascromatograficamente rispetto alle sostanze attive da determinare.
L'aggiunta di standard interno alla soluzione, prima dell'iniezione nel sistema cromatografico, rende indipendenti dal conoscere esattamente il volume iniettato.
Le modalità di preparazione e i tempi di conservazione sono gli stessi delle soluzioni dei materiali di riferimento (6.5.).
6.7. Standard di processo (surrogate)
Lo standard di processo è un particolare analita che può essere aggiunto al campione prima dell'estrazione per segnalare la presenza di errori grossolani verificatisi durante l'analisi di ogni campione; non deve essere una sostanza attiva presente nei campioni reali , deve avere un comportamento chimico analogo alle sostanze attive da determinare, avere elevata stabilità, non deve avere reattività con le sostanze attive da determinare, deve essere sensibile ai detector utilizzati e deve essere risolto gascromatograficamente rispetto alle sostanze attive da determinare.
Le modalità di preparazione e i tempi di conservazione sono gli stessi delle soluzioni dei materiali di riferimento (6.5.).
6.8. Soluzione per il controllo della performance strumentale
Allo scopo di verificare la performance strumentale, possono essere preparate soluzioni di varie sostanze attive a concentrazione nota, scelte in modo opportuno, ad esempio fra quelle riscontrate più frequentemente e fra quelle analiticamente più critiche.
L'iniezione di questa soluzione consente di verificare il buon funzionamento e il grado di prestazione analitica dell'apparecchiatura sotto l'aspetto ad esempio della sensibilità, della ripetibilità, della risoluzione, della linearità , della reattività nei confronti di particolari analiti.
Questa operazione deve essere condotta preliminarmente alle analisi sui campioni.
Le modalità di preparazione e i tempi di conservazione sono gli stessi delle soluzioni dei materiali di riferimento (6.5.).

7. Procedimento

7.1 Estrazione delle sostanze attive

Nel caso di estrazione su cartuccia o disco tipo C-18 la procedura è la seguente.

Il campione di acqua (500-1000 mL) eventualmente filtrato sotto vuoto su filtro in fibra di vetro e/o in esteri di cellulosa, viene addizionato di metanolo (0,5 mL ogni 100 mL di acqua) e dello standard di processo (6.7.).

- La soluzione così ottenuta viene passata attraverso una cartuccia C-18 da 500 mg lavata e condizionata per passaggio in successione di 5 mL di etile acetato, 5 mL di metanolo, 10 mL di acqua pura lasciando infine un battente di alcuni mm, ad una velocità di circa 500 mL/ora.
- oppure: un disco C-18 47 × 0,5 mm lavato e condizionato per passaggio con 5 mL di etile acetato, 5 mL di metanolo, 10 mL di acqua pura, ad una velocità di circa 50 mL/min.

Dopo il completo passaggio del campione, la cartuccia o il disco vengono lavati con 10 mL di acqua pura; la maggior parte dell'acqua residua viene eliminata mediante aspirazione o passaggio di azoto.
La cartuccia viene eluita con 3-5 mL di etile acetato. L'eluato può essere anidrificato ponendo in serie una cartuccia contenente sodio solfato anidro o terra di diatomee; in questo caso sarà necessario un maggior volume di eluente (circa 10 mL).
Il disco viene eluito con 20 mL di etile acetato.
L'eluato raccolto viene evaporato cautamente fino a secchezza in evaporatore rotante e/o sotto corrente di azoto a temperatura ≤ 40°C.
Il residuo, indicativamente, si riprende con 0,5 –1,0 mL di soluzione contenente lo standard interno.

7.2. Identificazione e dosaggio delle sostanze attive

La soluzione ricostruita dell'estratto viene analizzata mediante gascromatografia capillare con rivelatori selettivi: ECD, NPD, MS.
Le condizioni gascromatografiche devono essere adeguate ai composti che si vogliono determinare. In Tab. 1, per ogni sostanza, sono riportate le sensibilità nei confronti dei rivelatori selettivi ed indicati gli ioni più significativi per l'analisi mediante spettrometria di massa.Le soluzioni ricostruite in solvente sono stabili in linea generale per alcuni giorni. Tuttavia, in soluzione diluita alcune sostanze attive possono essere adsorbite alle pareti in vetro del contenitore in modo irreversibile o degradarsi; in questi casi è consigliabile procedere all'analisi gascromatografica nel più breve tempo possibile.
L'identificazione degli analiti viene fatta per confronto dei tempi di ritenzione relativi con quelli delle soluzioni di riferimento degli analiti da determinare.
Considerata la presenza di possibili interferenti, l'identificazione degli analiti deve essere confermata; la combinazione di tecniche diverse come l'uso di una colonna a diversa polarità, l'analisi con un diverso rivelatore, l'analisi GC-MS in modalità select ion monitoring (SIM), l'analisi GC-MS in modalità full scan, rappresentano metodi di conferma qualitativa con gradi di affidabilità crescente.
Prima dell'uso, ogni apparecchiatura deve essere opportunamente tarata e controllata.
Particolari accorgimenti consentono di prolungare e mantenere costante l'efficienza analitica degli strumenti: uso di pre-colonne e post-colonne, pulizia e silanizzazione dei liner di iniezione, uso di setti a basso spurgo, regolare pulizia dei rivelatori e delle sorgenti, filtrazione dei gas di trasporto ecc.

8. Calcolo ed espressione dei risultati

8.1 Analisi quantitativa

E' necessario disporre di un sistema in grado di misurare accuratamente le aree dei picchi cromatografici; è pertanto consigliato l'uso di sistemi di acquisizione su personal computer.
Per ogni analita identificato viene calcolato il valore dell'area relativa che è uguale al rapporto fra il valore dell'area del picco dell'analita d'interesse e il valore dell'area dello standard interno.
Per ogni analita da quantificare vengono preparate soluzioni di taratura a concentrazione nota da utilizzare nel calcolo.
La taratura sarà effettuata su un unico livello, ad una concentrazione molto vicina a quella degli analiti da quantificare oppure costruendo una curva di taratura multilivello.

8.2 Espressione dei risultati

I risultati sono espressi in μg/L con due cifre significative per concentrazioni ≥ 0,10 μg/L e con una cifra significativa per valori < 0,10 μg/L.

8.3. Criteri di confronto con valori di riferimento

Se il valore riscontrato di un principio attivo è in prossimità di un valore di riferimento, ad esempio il valore parametrico previsto per le acque destinate al consumo umano, deve essere considerata l'incertezza stimata e dichiarata dal laboratorio nell'analisi di quel principio attivo.
L'intervallo di confidenza associato al risultato, e calcolato dal valore dell'incertezza dichiarata dal laboratorio, deve essere collocato interamente al di sopra o al di sotto del valore di riferimento per esprimere una valutazione rispettivamente di "non conformità" o di "conformità".

9. Prestazioni del metodo

Il laboratorio dovrà condurre la messa a punto e la validazione interna del metodo prima di eseguire analisi su campioni. La valutazione dovrà essere condotta verificando i parametri di qualità di cui ai paragrafi successivi. (9.1. ÷ 9.4.)

9.1. Precisione

La precisione del metodo di prova, , è riferita agli errori casuali e viene stimata effettuando una serie definita di prove non inferiore a 6, a vari livelli di concentrazione compresi nel campo di misura.
Indicativamente, i valori raccomandati di precisione espressa come scarto tipo relativo percentuale, nel campo di misura compreso fra 0,01 μg/L e 1,0 μg/L, sono del 15%. Tale valore è dedotto dalla funzione di Thompson (Thompson, 2000) che corregge, per concentrazioni nferiori a 0,12 ppm, l'equazione di Horwitz (Horwitz, 1982).

$CV_R\% = 22\%\ C$

$CV_r\% = 0{,}66\ CV_R\% = 15\%$

dove

C = concentrazione dell' analita

$CV_r\%$ = coefficiente di variazione percentuale di ripetibilità

$CV_R\%$ = coefficiente di variazione percentuale di riproducibilità

9.2. Esattezza

E' la differenza fra il valore medio di un certo numero di misure e il valore "vero" o " accettato come tale". La sua misura è considerata come errore sistematico.
L'estrazione incompleta degli analiti rappresenta la causa più ricorrente di errore sistematico, che il laboratorio dovrà verificare.
Le prove di recupero dovranno essere condotte per ogni analita a diversi livelli di concentrazione compresi nel campo di misura, su campioni di acqua additivati, in numero non inferiore a 6.
Sono considerati ottimali recuperi superiori al 75%. Per specifiche sostanze attive o metaboliti possono essere accettati recuperi inferiori in mancanza di metodi di prova più efficienti.

9.3. Limite di determinazione

Per ogni sostanza attiva deve essere misurato il limite di determinazione (quantification limit) cioè la minima quantità di analita misurabile con un accettabile grado di precisione.

Salvo diversa indicazione, il limite di determinazione dovrà essere almeno la metà del valore parametrico di riferimento (8.3.).
Il limite di determinazione deve essere riportato nel rapporto di prova per ogni principio attivo.

9.4. Intervallo di linearità

Per ogni sostanza attiva si dovrà accertare l'intervallo di linearità della risposta strumentale. Per fare questo, si costruiscono curve di taratura dopo aver iniettato soluzioni diluite degli analiti, anche in miscela fra loro, a varie concentrazioni, indicativamente comprese fra 0,05 e 2 μg/L. Le modalità di preparazione delle soluzioni sono riportate ai punti 6.5. e 6.6.

9.5. Controllo di qualità intralaboratorio

Ha lo scopo di valutare il verificarsi di variazioni della precisione e dell'accuratezza, e quindi di valutare l'attendibilità dei risultati analitici di una serie di campioni.
Consente il monitoraggio delle proprie prestazioni nel tempo garantendo il rispetto dei livelli di qualità prestabiliti.
A titolo di esempio si riportano alcune modalità di controllo interno di qualità.

9.5.1. Campione di controllo

Ad intervalli prestabiliti, durante la serie analitica, viene parallelamente eseguita una analisi su un "campione di controllo".Come campione di controllo può essere utilizzato materiale di riferimento certificato oppure preparato in laboratorio, ottenuto dall'aggiunta ad acqua pura (6.1.) di una miscela di analiti a concentrazione nota scelti in modo opportuno.
In questo modo è possibile valutare il grado di recupero e, nel tempo,.la precisione.
I risultati dell'analisi sul campione di controllo sono riportati sulla carta di controllo che consente di visualizzarne graficamente la dispersione e la tendenza, di intervenire in caso di situazione 'anomala'.
Nel caso che i risultati analitici del controllo non rientrino nei limiti di accettabilità stabiliti, saranno ripetute le prove sui campioni ai quali il controllo si riferisce.

9.5.2. Bianco

Il bianco è costituito da acqua pura (6.1.), analizzata secondo la metodica con lo scopo di evidenziare eventuali contaminazioni provocate da solventi, vetreria o altro materiale utilizzato. Se l'analisi del bianco non rispetta i criteri di accettabilità stabiliti, dovranno essere ripetute le prove relative alla serie a cui esso si riferisce.
Di norma sarà condotta una analisi del bianco, ogni serie analitica.

9.5.3 Analisi in duplicato

Consente di verificare la propria ripetibilità. Ad intervalli prestabiliti, un campione della serie in analisi o un campione di controllo viene analizzato in doppio. La differenza dei risultati ottenuti è correlata alla propria ripetibilità. I risultati sono riportati sulla carta di controllo.

9.5.4. Standard di processo (surrogate) (6.7.)

Consente di segnalare la presenza di errori grossolani verificatisi nel corso delle analisi su ciascun campione.
Nel caso di analisi in GC-MS possono essere usati come standard di processo opportuni derivati isotopici delle sostanze che devono essere determinate. In questo caso può essere usata la tecnica della diluizione isotopica per l'analisi quantitativa.

9.6. Controllo di qualità interlaboratorio

E' opportuno che il laboratorio partecipi ad un programma di controllo di qualità interlaboratorio in circuiti locali o nazionali, per una valutazione obiettiva dell'affidabilità delle proprie prestazioni.
Lo scopo è valutare e migliorare la propria accuratezza e verificare nel tempo la comparabilità dei propri risultati con quelli forniti da laboratori che eseguono lo stesso tipo di prova.
Se i risultati ottenuti non soddisfano i criteri minimi di accettabilità, il laboratorio dovrà adottare le necessarie azioni correttive prima di riprendere il normale ciclo analitico.
La frequenza ottimale per questi controlli è semestrale.

10. Precauzioni di sicurezza

Il metodo deve essere preventivamente valutato sotto l'aspetto del rischio di tipo chimico, cancerogeno, fisico e infortunistico.
Le operazioni potenzialmente pericolose dovranno essere segnalate nel metodo o nelle istruzioni operative.
Il personale addetto alle analisi deve essere messo a conoscenza dei rischi, addestrato e costantemente aggiornato.
Devono essere disponibili e prontamente consultabili le schede di sicurezza, in lingua italiana, di ogni prodotto o reattivo utilizzato.
I dispositivi individuali di protezione (DPI) come guanti, maschere, occhiali ecc. devono essere presenti sul luogo di lavoro e facilmente accessibili.
Nel metodo qui riportato le operazioni potenzialmente più pericolose per l'operatore riguardano l'uso dei solventi e la manipolazione dei prodotti fitosanitari.
Nella preparazione delle soluzioni primarie devono essere adottate, da parte degli operatori, tutte le precauzioni previste nei casi di manipolazione di sostanze tossiche o nocive descritte nelle istruzioni operative e nelle schede di sicurezza e indossare se richiesto appropriati DPI (guanti, maschere).

11. Bibliografia

Metodo EPA 525.2 (EPA – 500, supplent III, Revision 1.1 august 1995)

"Determination of organic compounds in drinking water by liquid- solid extraction and capillary columnn gas chromatography/mass spectrometry".

Rapporto ISTISAN 97/23, 1997

"Metodo multiresiduo per l'analisi di residui di antiparassitari in prodotti vegetali"

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

Rapporto ISTISAN 97/24, 1997

"Linee guida per l'applicazione delle buone pratiche di laboratorio e l'assicurazione e il controllo della qualità nell'analisi di residui di prodotti fitosanitari"

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

W.Horwitz (1982); Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs; Anal. Chem., 54, 1, 67A-76A.

M. Thompson (2000); Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing; Analyst, 125, 385-386.