

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Metodi 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

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

97/23

Istituto Superiore di Sanità

Metodi 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
1997, ix, 95 p. Rapporti ISTISAN 97/23

Contiene i metodi multiresiduo per residui di antiparassitari nei prodotti vegetali più usati dai laboratori del Servizio sanitario nazionale, dalle Agenzie regionali e provinciali per la protezione dell'ambiente e dall'Istituto superiore di sanità. Fornisce dati sul comportamento analitico di 249 antiparassitari attraverso fasi di estrazione e purificazione, e dati per l'analisi gascromatografica (GC), l'analisi mediante gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC/MS) e l'analisi in cromatografia liquida con rivelatore spettrofotometrico (HPLC/UV).

Parole chiave: Pesticidi, Prodotti vegetali.

Istituto Superiore di Sanità

Multiresidue analytical procedures for pesticides residues in vegetable products.

Gruppo di lavoro per i residui di antiparassitari della Commissione permanente di coordinamento interregionale per i problemi relativi al controllo ufficiale dei prodotti alimentari
1997, ix, 95 p. Rapporti ISTISAN 97/23 (in Italian)

Multiresidue methods for pesticide residues in vegetable products, most frequently used by laboratories of the Italian national health service, by the regional and provincial agencies for environmental protection and by the National health institute. The analytical behaviour is presented for 249 pesticides through the different steps of extraction and cleanup, along with data for the gas chromatography (GC), gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) and high performance liquid chromatography coupled to spectrophotometric detector (HPLC/UV).

Key words: Pesticides, Vegetable products.

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

Daniilo Attard Barbini	ISS (Istituto Superiore di Sanità), Roma
Gino Biancardi	ARPA (Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente) Toscana, Massa Carrara
Bruno Bove	PMP (Presidio Multizonale di Prevenzione), Potenza
Paolo Branca	ARPA (Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente) Piemonte, Torino
Maria Luisa Capuano	PMP (Presidio Multizonale di Prevenzione), Viterbo
Elvira Cecere	Ministero della Sanità, Roma
Claudio Coppi	ARPA (Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente) Toscana, Pistoia
Simona Coppi	ARPA (Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente) Emilia Romagna, Ferrara
Alfonso Di Muccio	ISS (Istituto Superiore di Sanità), Roma
Rodolfo Flego	PMP (Presidio Multizonale di Prevenzione), Udine
Alessandro Franchi	ARPA (Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente) Toscana, Siena
Cristina Gibellino	ARPA (Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente) Valle D'Aosta, Aosta
Michele Lorenzin	APPA (Agenzia Provinciale per la Protezione dell'Ambiente), Trento
Paolo Maschio	ARPA (Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente) Veneto, Belluno
Luciana Menegus	ARPA (Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente) Veneto, Venezia
Leonardo Merlini	PMP (Presidio Multizonale di Prevenzione), Perugia
Gianfranco Pallotti	PMP (Presidio Multizonale di Prevenzione), Roma
Giuseppe Pasquazi	PMP (Presidio Multizonale di Prevenzione), Roma
Elio Sesia	ARPA (Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente) Piemonte, Asti
Sauro Tiraferri	ARPA (Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente) Emilia-Romagna, Rimini
Raffaele Vistocco	APPA (Agenzia Provinciale per la Protezione dell'Ambiente), Bolzano

Coordinamento redazionale e revisione critica del testo: A. Di Muccio, T. Generali e D. Attard Barbini
Elaborazione testo a cura di G. De Merulis

INDICE

Abbreviazioni	viii
Presentazione	ix
PARTE A - PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	1
<i>A.1. Preparazione del campione</i>	3
A.1.1 Scopo e campo di applicazione	3
A.1.2 Riferimenti	3
A.1.3 Definizioni	3
A.1.4 Principio	3
A.1.5 Reattivi, materiali e vetreria	4
A.1.6 Apparecchiature	4
A.1.7 Campionamento	4
A.1.8 Preparazione del campione	4
PARTE B - METODI COMPLETI	5
<i>B.1. Metodo 1</i>	
Estrazione con acetone, ripartizione con diclorometano in imbuto separatore, purificazione su cartuccia di gel di silice.	7
B.1.1 Scopo e campo di applicazione	7
B.1.2 Riferimenti	7
B.1.3 Definizioni	7
B.1.4 Principio	7
B.1.5 Reattivi, materiali e vetreria	8
B.1.6 Apparecchiature	8
B.1.7 Campionamento	8
B.1.8 Preparazione del campione per l'analisi	9
B.1.9 Procedimento	9
B.1.9.1 Estrazione	9
B.1.9.2 Ripartizione	9
B.1.9.3 Purificazione	10
<i>B.2. Metodo 2</i>	
Estrazione con acetone + metanolo, (1 + 1, v + v), purificazione su C₁₈	11
B.2.1 Scopo e campo di applicazione	11
B.2.2 Riferimenti	11
B.2.3 Definizioni	11
B.2.4 Principio	11
B.2.5 Reattivi, materiali e vetreria	11

B.2.6	Apparecchiature	12
B.2.7	Campionamento	12
B.2.8	Preparazione del campione per l'analisi	12
B.2.9	Procedimento	12
B.2.9.1	Estrazione	12
B.2.9.2	Purificazione	13
<i>B.3. Metodo 3</i>		
Estrazione con etile acetato, purificazione mediante GPC mini		14
B.3.1	Scopo e campo di applicazione	14
B.3.2	Riferimenti	14
B.3.3	Definizioni	14
B.3.4	Principio	14
B.3.5	Reattivi, materiali e vetreria	15
B.3.6	Apparecchiature	15
B.3.7	Campionamento	15
B.3.8	Preparazione del campione per l'analisi	16
B.3.9	Procedimento	16
B.3.9.1	Estrazione	16
B.3.9.2	Purificazione	16
<i>B.4. Metodo 4</i>		
Estrazione per dispersione su terre di diatomee, purificazione mediante GPC mini		18
B.4.1	Scopo e campo di applicazione	18
B.4.2	Riferimenti	18
B.4.3	Definizioni	18
B.4.4	Principio	18
B.4.5	Reattivi, materiali e vetreria	19
B.4.6	Apparecchiature	19
B.4.7	Campionamento	19
B.4.8	Preparazione del campione per l'analisi	19
B.4.9	Procedimento	20
B.4.9.1	Estrazione	20
B.4.9.2	Purificazione	20
<i>B.5. Metodo 5</i>		
Estrazione con acetone, purificazione mediante acetone + H₂O/CH₂Cl₂ su Extrelut-20		21
B.5.1	Scopo e campo di applicazione	21
B.5.2	Riferimenti	21
B.5.3	Definizioni	22
B.5.4	Principio	22
B.5.5	Reattivi, materiali e vetreria	22

B.5.6 Apparecchiature	22
B.5.7 Campionamento	23
B.5.8 Preparazione del campione per l'analisi	23
B.5.9 Procedimento	23
PARTE C- PROCEDIMENTI SEPARATI PER ESTRAZIONE, RIPARTIZIONE, PURIFICAZIONE E DETERMINAZIONE	25
C.1 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	27
C.2 ESTRAZIONE	27
<i>C.2.1 Estrazione con acetone o con acetone + metanolo (1+1, v+v)</i>	27
C.2.1.1 Scopo e campo di applicazione	27
C.2.1.2 Riferimenti	27
C.2.1.3 Definizioni	27
C.2.1.4 Principio	28
C.2.1.5 Reattivi, materiali e vetreria	28
C.2.1.6 Apparecchiature	28
C.2.1.7 Campionamento	28
C.2.1.8 Preparazione del campione per l'analisi	28
C.2.1.9 Procedimento	28
<i>C.2.2 Estrazione con etile acetato</i>	30
C.2.2.1 Scopo e campo di applicazione	30
C.2.2.2 Riferimenti	30
C.2.2.3 Definizioni	30
C.2.2.4 Principio	30
C.2.2.5 Reattivi, materiali e vetreria	30
C.2.2.6 Apparecchiature	31
C.2.2.7 Campionamento	31
C.2.2.8 Preparazione del campione per l'analisi	31
C.2.2.9 Procedimento	31
<i>C.2.3 Estrazione per dispersione su terre di diatomee</i>	32
C.2.3.1 Scopo e campo di applicazione	32
C.2.3.2 Riferimenti	32
C.2.3.3 Definizioni	32
C.2.3.4 Principio	32
C.2.3.5 Reattivi, materiali e vetreria	32
C.2.3.6 Apparecchiature	32
C.2.3.7 Campionamento	33

C.2.3.8 Preparazione del campione per l'analisi	33
C.2.3.9 Procedimento	33
<i>C.2.4 Estrazione per dispersione su Florisil</i>	34
C.2.4.1 Scopo e campo di applicazione	34
C.2.4.2 Riferimenti	34
C.2.4.3 Definizioni	34
C.2.4.4 Principio	34
C.2.4.5 Reattivi, materiali e vetreria	34
C.2.4.6 Apparecchiature	35
C.2.4.7 Campionamento	35
C.2.4.8 Preparazione del campione per l'analisi	35
C.2.4.9 Procedimento	35
C.3 RIPARTIZIONE	37
<i>C.3.1 Ripartizione acetone + H₂O/CH₂Cl₂ in imbuto separatore</i>	37
C.3.1.1 Scopo e campo di applicazione	37
C.3.1.2 Riferimenti	37
C.3.1.3 Definizioni	37
C.3.1.4 Principio	37
C.3.1.5 Reattivi, materiali e vetreria	37
C.3.1.6 Apparecchiature	38
C.3.1.7 Campionamento	38
C.3.1.8 Preparazione del campione per l'analisi	38
C.3.1.9 Procedimento	38
<i>C.3.2 Ripartizione acetone + H₂O/etere di petrolio + etere etilico (1 : 1) in imbuto separatore</i>	39
C.3.2.1 Scopo e campo di applicazione	39
C.3.2.2 Riferimenti	39
C.3.2.3 Definizioni	39
C.3.2.4 Principio	39
C.3.2.5 Reattivi, materiali e vetreria	39
C.3.2.6 Apparecchiature	39
C.3.2.7 Campionamento	40
C.3.2.8 Preparazione del campione per l'analisi	40
C.3.2.9 Procedimento	40
<i>C.3.3 Acetone + H₂O/CH₂Cl₂ su Extrelut-20</i>	41
C.3.3.1 Scopo e campo di applicazione	41
C.3.3.2 Riferimenti	41
C.3.3.3 Definizioni	41
C.3.3.4 Principio	41

C.3.3.5 Reattivi, materiali e vetreria	41
C.3.3.6 Apparecchiature	42
C.3.3.7 Campionamento	42
C.3.3.8 Preparazione del campione per l'analisi	42
C.3.3.9 Procedimento	42
C.4 PURIFICAZIONI	43
<i>C.4.1 Purificazione di estratti acetonicici di vegetali su C₁₈ o C₈</i>	43
C.4.1.1 Scopo e campo di applicazione	43
C.4.1.2 Riferimenti	43
C.4.1.3 Definizioni	43
C.4.1.4 Principio	43
C.4.1.5 Reattivi, materiali e vetreria	43
C.4.1.6 Apparecchiature	44
C.4.1.7 Campionamento	44
C.4.1.8 Preparazione del campione per l'analisi	44
C.4.1.9 Procedimento	44
<i>C.4.2 Ammina quaternaria</i>	45
C.4.2.1 Scopo e campo di applicazione	45
C.4.2.2 Riferimenti	45
C.4.2.3 Definizioni	45
C.4.2.4 Principio	45
C.4.2.5 Reattivi, materiali e vetreria	45
C.4.2.6 Apparecchiature	45
C.4.2.7 Campionamento	45
C.4.2.8 Preparazione del campione per l'analisi	45
C.4.2.9 Procedimento	46
<i>C.4.3 Purificazione su colonna di gel di silice</i>	47
C.4.3.1 Scopo e campo di applicazione	47
C.4.3.2 Riferimenti	47
C.4.3.3 Definizioni	47
C.4.3.4 Principio	47
C.4.3.5 Reattivi, materiali e vetreria	47
C.4.3.6 Apparecchiature	47
C.4.3.7 Campionamento	47
C.4.3.8 Preparazione del campione per l'analisi	48
C.4.3.9 Procedimento	48
C.4.4 Gel permeazione	49
<i>C.4.4.1 Gel permeazione su colonna macro</i>	49

C.4.4.1.1	Scopo e campo di applicazione	49
C.4.4.1.2	Riferimenti	49
C.4.4.1.3	Definizioni	49
C.4.4.1.4	Principio	49
C.4.4.1.5	Reattivi, materiali e vetreria	49
C.4.4.1.6	Apparecchiature	50
C.4.4.1.7	Campionamento	51
C.4.4.1.8	Preparazione del campione per l'analisi	51
C.4.4.1.9	Procedimento	51
C.4.4.2	<i>Gel permeazione su colonna mini</i>	52
C.4.4.2.1	Scopo e campo di applicazione	52
C.4.4.2.2	Riferimenti	52
C.4.4.2.3	Definizioni	52
C.4.4.2.4	Principio	52
C.4.4.2.5	Reattivi, materiali e vetreria	52
C.4.4.2.6	Apparecchiature	53
C.4.4.2.7	Campionamento	54
C.4.4.2.8	Preparazione del campione per l'analisi	54
C.4.4.2.9	Procedimento	54
C.5	TECNICHE DI DETERMINAZIONE	75
C.5.1	<i>Gas cromatografia</i>	75
C.5.1.1	Sistemi di iniezione	75
C.5.1.2	Colonne cromatografiche	75
C.5.1.3	Rivelatori	75
C.5.1.4	Determinazione quali-quantitativa	76
C.5.1.4.1	Analisi qualitativa	76
C.5.1.4.2	Analisi quantitativa	76
C.5.2	<i>Cromatografia liquida ad alta prestazione</i>	77
C.5.2.1	Colonne cromatografiche	77
C.5.2.2	Rivelatori	77
C.5.2.3	Determinazione quali-quantitativa	77
C.5.2.3.1	Analisi qualitativa	77
C.5.2.3.2	Analisi quantitativa	77
C.5.3	<i>Gas cromatografia/Spettrometria di massa</i>	78
C.5.3.1	Sistemi di iniezione	78
C.5.3.2	Colonne cromatografiche	78
C.5.3.3	Rivelatori	78
C.5.3.4	Determinazione quali-quantitativa	78
C.5.3.4.1	Analisi qualitativa	78

C.5.3.4.2 Analisi quantitativa	78
<i>C.5.4 Conferma analitica</i>	79

ABBREVIAZIONI

APPA	Agenzia Provinciale per la Protezione dell'Ambiente
ARPA	Agenzia Regionale per la Prevenzione e l'Ambiente
°C	grado centigrado
C₈	octil
C₁₈	octadecyl
CAS	Chemical Abstracts Service
cm	centimetro
DANSPV	Dipartimento degli Alimenti e Nutrizione e della Sanità Pubblica Veterinaria
d.i.	diametro interno
DM	Decreto Ministeriale
DPR	Decreto del Presidente della Repubblica
ECD	Electron Capture Detector
FPD/P	Flame Photometric Detector con filtro per composti fosforati
g	grammo
GC	gascromatografia
GC/MS	gascromatografia/spettrometria di massa
GPC	Gel Permeation Chromatography
h	ora
kg	chilogrammo
mg	milligrammo
min	minuto
ml	millilitro
mm	millimetro
NPD	Nitrogen Phosphorus Detector
PMP	Presidio Multizonale di Prevenzione
PTFE	Politetrafluoroetilene
p/v	peso/volume
rpm	giri per minuto
SPE	Solid Phase Extraction
t	temperatura
UV	ultra violetto
USL	Unità Sanitaria Locale
v	volume
µm	micrometro
µl	microlitro

Presentazione

E' con grande soddisfazione che viene presentato questo Manuale di metodi multiresiduo per l'analisi di residui di antiparassitari.

Questo Manuale è il prodotto del Gruppo di lavoro per i residui di antiparassitari della commissione interregionale permanente di coordinamento per i problemi relativi al controllo ufficiale dei prodotti alimentari.

Il Gruppo di lavoro è composto di esperti dei laboratori del servizio sanitario nazionale e delle Agenzie regionali e provinciali per la protezione dell'ambiente, coordinati dall'Istituto superiore della sanità – Roma, il che testimonia della buona collaborazione tra gli enti pubblici preposti al controllo dei residui di antiparassitari negli alimenti.

La preoccupazione dei consumatori e l'attenzione delle autorità riguardo alla salubrità degli alimenti in generale e alla presenza di residui di antiparassitari in particolare hanno portato a mettere in atto piani di controllo per la ricerca e determinazione di questi residui negli alimenti di origine vegetale ed animale, al fine di stimare l'esposizione del consumatore e verificare il rispetto dei limiti massimi di residui stabiliti con Decreti e Ordinanze del Ministro della sanità.

Questo Manuale rappresenta uno strumento utile alla realizzazione delle azioni di controllo da parte degli Enti preposti.

Il Gruppo sarà grato a quanti vorranno contribuire al miglioramento della qualità di questo Manuale con specifiche proposte e con la segnalazione di eventuali errori.

Roma, 30 Settembre 1997

Il Coordinatore del Gruppo di lavoro

Alfonso Di Muccio

PARTE A

Preparazione del Campione

A.1. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

A.1.1 Scopo e campo di applicazione

La preparazione del campione ha lo scopo di ottenere un'aliquota di campione pronta per la fase di estrazione.

A.1.2 Riferimenti

- DM 20 dicembre 1980. - Modalità di prelevamento dei campioni per il controllo dei residui di antiparassitari negli e sugli ortofrutticoli. *GU n. 8 del 9.1.1981.*
- DM 9 agosto 1995. All.1 - Parte A Limiti massimi di residui di sostanze attive dei prodotti fitosanitari tollerate in prodotti di origine vegetale (recepimento della direttiva n.94/39/CE) e in cereali e prodotti di origine animale (recepimento della direttiva n. 94/29/CE). Suppl. Ord. *GU n.252 del 27.10.1995.*
- DPR 26.03.1980, n.327. Regolamento di esecuzione della legge 30 aprile 1962, n.283, e successive modificazioni, in materia di disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande. *GU n. 193 del 16.07.1980.*

A.1.3 Definizioni

- Partita da campionare. Quantità identificabile di prodotti avente caratteristiche che si presumono uniformi. Campione elementare. Quantità prelevata da un singolo punto della partita.
- Campione globale. Insieme di campioni elementari prelevati da una stessa partita.
- Campione finale. Campione globale, o parte rappresentativa del campione globale, ottenuta mediante riduzione di quest'ultimo.
- Campione di laboratorio. Campione destinato al laboratorio, costituito da un'aliquota rappresentativa del campione finale.
- Campione di analisi. Parte del campione di laboratorio destinata all'analisi.
- Aliquota da saggio. Porzione rappresentativa del campione di analisi.

A.1.4 Principio

La preparazione del campione di analisi include essenzialmente due fasi:

- a) rimozione di parti di vegetale per ottenere la porzione alla quale si applica il limite di residui.

b) triturazione, macinatura, omogeneizzazione della massa del vegetale.

A.1.5 Reattivi, materiali e vetreria

In linea di principio nessun materiale dovrebbe essere aggiunto nella preparazione del campione. Se si adoperano materiali per facilitare l'omogeneizzazione, ad esempio acqua o ghiaccio secco, deve esserne verificata la compatibilità e la qualità rispetto allo specifico quesito analitico.

A.1.6 Apparecchiature

- Mulini
- Trituratori a coltelli tipo Hobart-Food-Cutter, Robot Coupe o equivalenti
- Frullatori a lame, Waring Blendor o equivalenti

A.1.7 Campionamento

Il campione di laboratorio dovrebbe essere stato ottenuto dal campione finale, a sua volta derivante dal campione globale, prelevando individui e/o aliquote secondo norme di prelevamento riconosciute.

A.1.8 Preparazione del campione

Per ottenere il Campione di analisi, rimuovere dal Campione di laboratorio le porzioni non incluse nella definizione di parti di prodotto alla quale si applicano i limiti dei residui, seguendo le indicazioni riportate nel Decreto 9 agosto 1995.

Il campione di analisi, in linea generale, dovrebbe essere adeguatamente sminuzzato, rimescolato e/o omogeneizzato *in toto* in modo che se ne possa utilizzare una porzione rappresentativa ridotta per l'analisi (aliquota di analisi).

Nel caso di campioni di laboratorio di massa e/o volumi notevoli, si farà ricorso a tecniche di quartatura (suddivisione di ogni individuo in 4 o 8 parti e utilizzo di quarti o ottavi simmetrici) che assicurino il rispetto del rapporto massa/superficie e la simmetria del vegetale, nel campione di analisi ridotto.

Per l'omogeneizzazione del campione di analisi o del campione di analisi ridotto si usano macchine a coltelli o mulini di grandezza adeguata alla massa del campione di analisi, quali ad esempio Hobart Food Cutter, Robot Coupe, Waring Blendor etc.

PARTE B

Metodi Completi

B.1. METODO 1

Estrazione con acetone, ripartizione con diclorometano in imbuto separatore, purificazione su cartuccia di gel di silice

B.1.1 Scopo e campo di applicazione

Il metodo ha lo scopo di estrarre residui di antiparassitari, con un ampio spettro di polarità, da prodotti vegetali.

Per il campo di applicazione vedi tabella 2.

B.1.2 Riferimenti

- AMBRUS, A., J. LANTOS, E. VISI, I. CSATLOS, L. SARVARI. 1981. General Method for Determination of Pesticide Residues in Samples of Plant Origin, Soil, and Water. I. Extraction and Cleanup. *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 64: 733 – 742.
- BECKER, G. 1979. Eine Multimethode zur gleichzeitigen Erfassung von 75 Pflanzenbehandlungsmitteln auf pflanzlichem Material. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 75: 148 - 152.
- BRANCA, P. e P. QUAGLINO. 1989. Determinazione rapida di pesticidi organofosforati e diserbanti triazinici in acque e alimenti. *Boll. Chim. Igien.*, 40: 71-78.
- QUAGLINO, P. e P. BRANCA. 1992. Tecnica multiresiduo per la determinazione di principi attivi termolabili. *Boll. Chim. Igien.*, 43: 399-409.
- SPECHT, W, and M. TILLKES. 1985. Gas-chromatographische Bestimmung von Rückständen an Pflanzenbehandlungsmitteln nach Clean-up über Gel-Chromatographie und Mini-Kieselgel-Säulen-Chromatographie. *Fresenius Z.Anal.Chem.*, 322:443-445.

B.1.3 Definizioni

Vedi A.1.3.

B.1.4 Principio

Una porzione del campione vegetale sminuzzato viene omogeneizzato in presenza di acetone, che viene separato mediante filtrazione.

I residui presenti nella soluzione costituita da acetone acquoso vengono recuperati mediante ripartizione in diclorometano, dopo diluizione con acqua per diminuire la solubilità dei residui nella fase acquosa.

L'estratto può essere purificato mediante cromatografia su gel di silice.

B.1.5 Reattivi, materiali e vetreria

- Acetone, diclorometano, etere etilico, etere di petrolio 40-60°C, n-esano e acqua puri per analisi di residui.
- Acqua distillata di qualità adeguata può essere ottenuta per estrazione in imbuto separatore: 4 litri di acqua con 2 x 100 ml di CH₂Cl₂
- Celite 545 lavata con acidi, pura per l'analisi dei residui, riscaldata a 500 °C per almeno 6 h.
- Dischi di carta da filtro, diametro 70 mm, Schleicher e Schuell, 589 fascia nera, Ref. n. 300008, o equivalenti.
- Cilindro graduato da 500 ml con divisione ± 5 ml e con cono a smeriglio.
- Imbuto Büchner con piastra in vetro a fessure, 70 mm di diametro e volume dell'imbuto di ca. 250 ml, munito di raccordo per il vuoto su cono smeriglio 29/32.
- Imbuto separatore da 1 litro con rubinetto in PTFE.
- Tubo in vetro, 200 x 20 mm d.i., con gambo 55 x 4 d. i., per sodio solfato anidro.
- Cotone idrofilo sgrassato per estrazione in Soxhlet con etere di petrolio 40-60°+ acetone, 1+1, V+V, per 6 h.
- Sodio cloruro puro per analisi, riscaldato a 500 °C per almeno 6-8 h.
- Colonna Silica gel (SIOH) da 3 ml Baker (cod. 7086-03)

B.1.6 Apparecchiature

- Bilancia tecnica a ± 0.1 g.
- Trituratore: Hobart food cutter; Robot Coupe o equivalenti.
- Omogeneizzatore: Ultra Turrax T25 o altri turboestrattori equivalenti.
- Evaporatore rotante sottovuoto.
- Bagno ad ultrasuoni: Branson o equivalente.
- Pompa da vuoto ad acqua o equivalente.
- Sistema di estrazione sottovuoto

B.1.7 Campionamento

Vedi A 1.7.

B.1.8 Preparazione del campione per l'analisi

Vedi A.1.8.

B.1.9 Procedimento

B.1.9.1 Estrazione

Dalla massa del campione di analisi, preparato come in 1.8, pesare in un becker a forma alta da 500 ml un'aliquota di analisi di 100 g (per campioni secchi, ad esempio cereali in granella e mangimi in pellets, è consigliabile aggiungere 10 ml di acqua per ottenere un rigonfiamento della massa).

Aggiungere 200 ml di acetone e sottoporre a turboestrazione per 2 minuti. Nel caso di campioni già omogeneizzati si può in alternativa tenere il contenitore in bagno ad ultrasuoni per 30 minuti.

Aggiungere 5 g di Celite e rimescolare. Trasferire la miscela su un imbuto büchner contenente un filtro di carta inumidito con il solvente di estrazione e filtrare sotto aspirazione in un cilindro graduato da 500 ml.

Lavare l'asta dell'omogeneizzatore e il recipiente di estrazione con porzioni (2 x 50 ml) del solvente di estrazione e trasferire il solvente di lavaggio sull'imbuto büchner.

Registrare il volume del filtrato.

B.1.9.2 Ripartizione

Trasferire in un imbuto separatore da un litro un volume di filtrato, equivalente a 20 g di campione, della soluzione acetone + acqua derivante dall'estrazione di cui al punto B.1.9.1. Aggiungere 250 ml d'acqua, 25 ml di soluzione satura di cloruro di sodio e 50 ml di diclorometano.

Agitare per almeno due minuti e lasciar separare lo strato di diclorometano.

Filtrare la fase organica inferiore attraverso una colonnina contenente 25 g di sodio solfato anidro.

Ripetere l'estrazione con altri 50 ml di diclorometano.

Concentrare gli estratti riuniti a piccolo volume mediante evaporatore rotante ($t= 40$ °C; pressione ridotta) e poi portare a secco per rotazione manuale del recipiente.

Ridisciogliere il residuo in un idoneo volume di solvente per il successivo stadio di purificazione.

B.1.9.3 Purificazione

Attivare la cartuccia di gel di silice con 3 ml di etere etilico seguiti da 3 ml di etere di petrolio.

Trasferire il campione disciolto in 5 ml di esano sulla colonna.

Dopo l'applicazione del campione, lavare la fase stazionaria con 1 ml di etere di petrolio e scartare.

Seccare la colonnina lasciandola 3 min circa sotto aspirazione, quindi eluire con 3 ml di miscela etere etilico-esano (1+1, v + v).

Concentrare a piccolo volume con evaporatore rotante e poi portare a secco l'eluato mediante rotazione manuale del recipiente. Ridisciogliere con un opportuno volume di solvente per la successiva determinazione.

B.2. METODO 2

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

B.2.1 Scopo e campo di applicazione

Il metodo ha lo scopo di estrarre residui di antiparassitari, con un ampio spettro di polarità, da prodotti vegetali e di rimuovere i coestrattivi.

Per il campo di applicazione vedi tabella 2.

B.2.2 Riferimenti

- BRANCA, P. e P. QUAGLINO. 1989. Determinazione rapida di pesticidi organofosforati e diserbanti triazinici in acque e alimenti. *Boll. Chim. Igien.*, 40: 71-78.
- QUAGLINO, P. e P. BRANCA. 1992. Tecnica multiresiduo per la determinazione di principi attivi termolabili. *Boll. Chim. Igien.*, 43: 399-409.

B.2.3 Definizioni

Vedi A.1.3.

B.2.4 Principio

Una porzione del campione vegetale sminuzzato viene omogeneizzato in presenza della miscela acetone + metanolo (1 + 1, v + v), che viene separata mediante filtrazione.

La purificazione si basa su una cromatografia a fase inversa su cartuccia C₁₈ previa diluizione dell'estratto con acqua.

B.2.5 Reattivi, materiali e vetreria

- Acetone, metanolo, n-esano, etere etilico, acqua, prodotti puri per analisi di residui. Acqua di qualità adeguata può essere ottenuta mediante estrazione di acqua distillata in imbuto separatore (4 litri di acqua con 2 x 100 ml di diclorometano).
- Celite 545 lavata con acidi, pura per l'analisi dei residui, riscaldata a 500 °C per almeno 2 h.

- Dischi di carta da filtro, diametro 70 mm, Schleicher e Schuell, 589 fascia nera, Ref. n. 300008, o equivalenti.
- Cilindro graduato da 500 ml con divisione ± 5 ml e con cono a smeriglio.
- Imbuto Büchner con piastra in vetro a fessure, 70 mm di diametro e volume dell'imbuto di ca. 250 ml, munito di raccordo per il vuoto su cono smeriglio 29/32.
- Colonne SPE C18 da 3 ml, 500 mg (Baker, cod. 7020-03).
- In alternativa preparare le colonnine con:
 - 1 g di resina octadecil C18 (Baker cod. 7025-00)
 - Recipiente di carica con adattatore (Baker cod. 4528)
 - Frits in PTFE (Baker cod. 7329-06)
 - Colonna in vetro da 8 ml (Baker cod. 7326-06)

B.2.6 Apparecchiature

- Bilancia tecnica a ± 0.1 g.
- Trituratore: Hobart food cutter; Robot Coupe o equivalenti.
- Omogeneizzatore: Ultra Turrax T25 o altri turboestrattori equivalenti.
- Bagno ad ultrasuoni: Branson o equivalenti.
- Pompa da vuoto ad acqua o equivalente.
- Sistema di estrazione sottovuoto.
- Evaporatore rotante sottovuoto.

B.2.7 Campionamento

Vedi A.1.7.

B.2.8 Preparazione del campione per l'analisi

Vedi A.1.8.

B.2.9 Procedimento

B.2.9.1 Estrazione

Dalla massa del campione di analisi, preparato come in A.1.8, pesare in un becker a forma alta da 500 ml un'aliquota di analisi di 100 g (per campioni secchi, ad esempio cereali in granella, mangimi in pellets è consigliabile aggiungere 10 ml di acqua per ottenere un rigonfiamento della massa).

Aggiungere 200 ml di miscela acetone + metanolo, (1 + 1, v + v), ed omogeneizzare per 2 minuti o tenere il contenitore in bagno ad ultrasuoni per 30 minuti.

Aggiungere 5 g di Celite e rimescolare. Trasferire la miscela su un imbuto büchner contenente un filtro di carta inumidito con il solvente di estrazione e filtrare sotto aspirazione in un cilindro graduato da 500 ml.

Lavare l'asta dell'omogeneizzatore e il recipiente di estrazione con porzioni (2 x 50 ml) del solvente di estrazione e trasferire il solvente di lavaggio sull'imbuto büchner.

Registrare il volume del filtrato.

B.2.9.2 Purificazione

Prelevare un volume del filtrato pari a 10 g di campione e trasferirli in un cilindro graduato da 1 litro. Diluire con acqua fino ad ottenere una concentrazione di acetone minore o uguale al 5 % (di solito fino a circa 400 ml).

Predisporre le colonnine SPE C₁₈ sul sistema da vuoto e attivarle facendo passare 3 ml di metanolo e 3 ml di acqua, aspirando e scartando ogni volta gli eluati, avendo cura di non mandare a secco le colonnine.

Riempire le colonnine con acqua distillata, collegare il recipiente di carica per mezzo dell'opportuno adattatore e riempire con l'estratto come sopra diluito.

Collegare la pompa da vuoto e regolare il flusso a circa 10 ml/min.

Reintegrare il campione nel recipiente di carica fino ad esaurimento dello stesso, avendo cura che il battente sulla colonnina non venga alterato.

Terminato il passaggio del campione, staccare il recipiente di carica e lavare le colonnine prima con 3 ml di una soluzione al 3% di metanolo in acqua e, quindi, con 3 ml di acqua distillata. Scartare questi lavaggi.

Asciugare le colonnine tenendole sotto aspirazione per circa 30 minuti.

Eluire i residui di antiparassitari con porzioni (2 x 3 ml) di miscela n-esano + etere etilico, 1 + 1, v + v. Le due frazioni riunite sono portate a piccolo volume mediante debole flusso di azoto.

B.3 METODO 3

Estrazione con etile acetato, purificazione mediante GPC mini

B.3.1 Scopo e campo di applicazione

Il metodo consente di estrarre residui di antiparassitari con ampio spettro di polarità da vegetali senza apprezzabile trascinarsi di acqua nel solvente di estrazione.

La purificazione mediante GPC ha lo scopo di separare i residui di antiparassitari dai coestrattivi presenti negli estratti vegetali.

Per il campo di applicazione vedi tabella 2.

B.3.2 Riferimenti

- COPPI C., e MANCINI P. 1996. Acidità delle Matrici Ortofrutticole e sua Neutralizzazione prima di Procedere alla Estrazione dei Residui di Antiparassitari con Metodiche Multiresiduo. *Boll. Chim. Ig. (in corso di pubblicazione)*
- PATTERSON, J.P. 1991. Reducing Solvent Consumption in automated gel Permeation Chromatographic cleanup for pesticides residues analysis: a modified GPC autoprep 1002. *J. Assoc. Off. Anal. Chem., 74: 1016-1018*
- ROOS, A.H., A. J. VAN MUNSTEREN, F. M. NAB and L. G. M. Th . TUINSTRAN. 1987. Universal Extraction/Clean-up Procedure for Screening of Pesticides by Extraction with Ethyl Acetate and Size Exclusion Chromatography. *Anal. Chim. Acta, 196: 95 - 102.*

B.3.3 Definizioni

Vedi A.1.3.

B.3.4 Principio

Una porzione del campione vegetale sminuzzato viene omogeneizzato in presenza di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ e di solvente di estrazione, che viene poi separato mediante filtrazione.

La successiva purificazione mediante cromatografia di gel permeazione permette la separazione delle molecole a basso peso molecolare dalle molecole di coestrattivi (lipidi, pigmenti vegetali etc.) che hanno generalmente pesi molecolari più elevati

B.3.5 Reattivi, materiali e vetreria

- Solventi puri per analisi dei residui: cicloesano, diclorometano, etile acetato, prodotti puri per analisi o ridistillati da apparecchio in vetro.
- Miscele Eluenti
 - A) Diclorometano + cicloesano (1 + 1, v + v), per estratti vegetali ad elevato contenuto lipidico;
 - B) Cicloesano + etile acetato (1 + 1, v + v), per estratti vegetali a basso contenuto lipidico;
- Resina stirene - divinilbenzene Bio-Beads SX-3, 200 - 400 mesh, Bio-Rad (cod. 152-2750);
- Colonna di gel permeazione: colonna in vetro, 35 cm x 1 cm d.i., riempita con Bio Beads SX-3, da usare con eluente A) per purificazione di estratti vegetali ad alto contenuto lipidico; B) per purificazione di estratti vegetali a basso contenuto lipidico. Preparazione della colonna di gel permeazione e controllo dei volumi di eluizione (vedi p.to C 4.4.2).
- Tubo da centrifuga da 250 ml con tappo a vite e guarnizione in gomma rivestita in PTFE;
- Celite 545 - riscaldato a 500 °C per almeno 6-8 h;
- Sodio solfato anidro puro per analisi, riscaldato a 500°C per almeno 6-8 h;
- Na₂HPO₄ · 12 H₂O puro per analisi.

B.3.6 Apparecchiature

- Bilancia tecnica (± 0.1 g)
- Trituratore Hobart Food Cutter; Robot Coupe o equivalenti
- Omogeneizzatore: Ultra-Turrax T25 o turboestrattori equivalenti
- Centrifuga con rotore per tubi da 250 ml
- Evaporatore rotante sottovuoto o equivalenti
- Bagno ad ultrasuoni
- Sistema di GPC composto almeno da:
 - Pompa in grado di fornire un flusso di 1 ml/min.
 - Iniettore con "loop" da 1 ml.

B.3.7 Campionamento

Vedi A.1.7.

B.3.8 Preparazione del campione per l'analisi

Vedi A.1.8.

B.3.9 Procedimento

B.3.9.1 Estrazione

Dalla massa del campione di analisi, preparato come in A.1.8, pesare nel tubo da centrifuga 50 g di campione e la prescritta quantità di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (vedi Tabella 1) per facilitare l'estrazione di principi attivi a carattere basico. Aggiungere 100 ml di etile acetato. Omogeneizzare con Ultra Turrax T25 per 2 minuti a velocità di circa 9500 giri/min. Aggiungere un cucchiaino di Celite (5 g), rimescolare con una bacchetta di vetro e poi, poco alla volta e rimescolando, 25 g di sodio solfato anidro.

Tappare il tubo da centrifuga e agitare per sbattimento. Centrifugare a $1500 \div 1800$ r.p. m. per 5 minuti. Trasferire l'etile acetato in una beuta da 250 ml prelevandolo dal tubo da centrifuga con una pipetta. Se necessario filtrare attraverso un batuffolo di cotone idrofilo sgrassato mantenuto in un imbuto.

Ripetere l'estrazione con porzioni (2 x 50 ml) di etile acetato tenendo il recipiente ogni volta in bagno ad ultrasuoni per 5 minuti.

Riunire gli estratti e concentrare a piccolo volume mediante evaporatore rotante sottovuoto ($40 \div 50$ °C; pressione ridotta) e poi a secco manualmente.

Ridisciogliere il residuo con un opportuno volume di solvente.

B.3.9.2 Purificazione

Il residuo derivante dall'estrazione di vegetali viene disciolto nella miscela eluente B) cicloesano + etile acetato in modo da avere una concentrazione equivalente di matrice non superiore a 10 g/ml. Filtrare e iniettare il filtrato nel sistema GPC.

Per purificare estratti provenienti da vegetali ad elevato tenore di lipidi, disciogliere l'estratto lipidico nella miscela eluente A) Diclorometano + cicloesano in modo da non superare 0.1 mg/ml, portare al volume di 10.0 ml con la miscela eluente. Filtrare e iniettare il filtrato.

Eluire la colonna di gel permeazione con la miscela eluente selezionata con un flusso di 1.0 ml/min.

Raccogliere la frazione utile con i volumi individuati come al p.to C 4.4.2.5.

Concentrare la frazione raccolta a piccolo volume mediante evaporatore rotante ($t = 40 - 50$ °C; pressione ridotta) e poi a secco per rotazione manuale del recipiente.

Ridisciogliere il residuo con un adatto volume di solvente.

Tabella 1 - *Quantità di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (espressa in grammi) da aggiungere a 50 g di matrice vegetale per l'estrazione con etile acetato secondo il metodo 3*

MATRICE	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (g)	MATRICE	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (g)
ALBICOCCA	4.00	KAKI	0.50
ANANAS	3.50	KIWI	4.00
ARANCIA	2.50	LATTUGA	0
ASPARAGO	0.50	LIMONE	11.0
BANANA	0.50	MANDARINO	2.00
BARBABIETOLA ROSSA	0	MELA	2.00
BIETOLA	0	MELANZANA	0.50
BROCCOLO	0	MELONE	0
CARCIOFO	0.30	MIAGAWA	3.50
CARDO	0.30	MIRTILLO	8.00
CAROTA	0	OLIVA	1.00
CASTAGNA	0	PATATA	0
CAVOLFIORE	0	PEPERONE	1.00
CAVOLINO DI BRUXELLES	0	PERA	0.50
CAVOLO	0	PESCA	2.50
CETRIOLINO	4.50	PISELLO	0
CETRIOLO	0.20	POMODORO	2.00
CICORIA	0	POMPELMO	3.00
CILIEGIA	3.00	PORRO	0.30
CIPOLLA	0.30	PRUGNA	2.50
CLEMENTINA	2.50	RADICCHIO	0
COCOMERO	0.40	RAPA	0
COTOGNA	2.00	RAPINO	0
FAGIOLINO	0	RAVANELLO	0
FAGIOLO	0	RUCOLA	0
FAVA	0	SCAROLA	0
FINOCCHIO	0	SEDANO	0
FRAGOLA	3.50	SPINACIO	0
FUNGO	0	SUSINA	4.00
GRANTURCO	0	UVA	2.00
INDIVIA	0	ZUCCHINA	0
INSALATA	0		

Nota: 0 indica che per la matrice considerata non è richiesto l'uso di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

B.4 METODO 4

Estrazione per dispersione su terre di diatomee, Purificazione mediante GPC mini

B.4.1 Scopo e campo di applicazione

Il metodo consente di estrarre residui di antiparassitari con ampio spettro di polarità da vegetali senza apprezzabile trascinarsi di acqua nel solvente di estrazione.

La purificazione mediante GPC ha lo scopo di separare i residui di antiparassitari dalla massa dei coestrattivi presenti negli estratti vegetali.

Per il campo di applicazione vedi tabella 2.

B.4.2 Riferimenti

- DAGNA, L., G. GASPARINI, M. L. ICARDI e E. SESIA. 1993 Metodo multiresiduo di estrazione su colonna per la determinazione di residui di fitofarmaci in matrici vegetali e liquide. *Boll. Chim. Igien.*, 44: 383-397.
- PATTERSON, J.P. 1991 Reducing Solvent Consumption in automated gel Permeation Chromatographic cleanup for pesticides residues analysis: a modified GPC autoprep 1002. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74: 1016-1018.
- ROOS, A.H., A. J. VAN MUNSTEREN, F. M. NAB and L. G. M. Th. TUINSTRAN. 1987 Universal Extraction/Clean-up Procedure for Screening of Pesticides by Extraction with Ethyl Acetate and Size Exclusion Chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 196: 95 - 102.

B.4.3 Definizioni

Vedi A.1.3.

B.4.4 Principio

Una porzione del campione vegetale viene impastato insieme a terra di diatomee speciale. La miscela è trasferita in una colonna di vetro ed eluita con solvente.

La successiva purificazione mediante cromatografia di gel permeazione permette la separazione delle molecole a basso peso molecolare dalle molecole di coestrattivi (lipidi, pigmenti vegetali etc.) che hanno per la maggior parte pesi molecolari più elevati.

B.4.5 Reattivi, materiali e vetreria

- Solventi puri per analisi dei residui: cicloesano, diclorometano, etile acetato, acqua, prodotti puri per analisi o ridistillati da apparecchio in vetro.
- Acido citrico, puro per analisi.
- Extrelut Merck bustine cod. 11738, oppure in confezione cod. 113076 o equivalenti.
- Colonne cromatografiche con frit di tenuta in vetro 200 x 20 mm d.i. con rubinetto in PTFE
- Lana di vetro sgrassata.
- Miscele eluenti:
 - A) Diclorometano + cicloesano (1 + 1, v + v), per estratti vegetali ad elevato contenuto lipidico;
 - B) Cicloesano + etile acetato (1 + 1, v + v), per estratti vegetali a basso contenuto lipidico;
- Resina stirene - divinilbenzene Bio-Beads SX-3, 200 - 400 mesh Bio - Rad (cod.152-2750), da usare con eluente A) per purificazione di estratti vegetali ad alto contenuto lipidico; B) per purificazione di estratti vegetali a basso contenuto lipidico.
- Colonna di gel permeazione : colonna in vetro 35 cm x 1 cm d.i. riempita con Bio-Beads SX-3. Preparazione della colonna di gel permeazione e controllo dei volumi di eluizione (vedi punto C 4.4.2.5).

B.4.6 Apparecchiature

- Bilancia tecnica a ± 0.1 g.
- Trituratore: Hobart food cutter, Robot Coupe, o equivalenti.
- Sistema di GPC composto almeno da:
 - Pompa in grado di fornire un flusso di 1 ml/min.
 - Iniettore con "loop" da 1 ml.
- Evaporatore rotante sotto vuoto.

B.4.7 Campionamento

Vedi A.1.7.

B.4.8 Preparazione del campione per l'analisi

La dispersione dell'aliquota di analisi sulla terra di diatomee è preferibilmente effettuata partendo dal campione surgelato.

B.4.9 Procedimento

B.4.9.1 Estrazione

Dalla massa del campione di analisi, pesare 10 g in un becker.

Solo per gli ortaggi aggiungere 1 ml di soluzione di Acido citrico 20% p/v.

Mescolare il campione con il contenuto di una bustina di Extrelut, con una bacchetta di vetro, fino al completo inglobamento del campione con la fase che non deve presentare grumi.

Il campione disperso sulla fase è trasferito nella colonna di estrazione. Assestare la massa con una leggera battitura sull'esterno della colonna, senza comprimere. Coprire con un batuffolo di lana di vetro e, dopo circa 10 minuti, eluire con 4 x 25 ml di diclorometano o etile acetato.

Terminata l'eluizione (circa 20 min.) l'estratto è evaporato, senza alcuna anidificazione, su evaporatore rotante sottovuoto ($t = 40-50\text{ }^{\circ}\text{C}$; pressione ridotta) fino a piccolo volume e poi a secco per rotazione manuale del recipiente.

Ridisciogliere il residuo in un appropriato volume di solvente.

B.4.9.2 Purificazione

Il residuo derivante dall'estrazione di vegetali viene disciolto nella miscela eluente B) cicloesano + etile acetato in modo da avere una concentrazione equivalente di matrice non superiore a 10 g/ml. Filtrare e iniettare il filtrato nel sistema GPC.

Per purificare estratti provenienti da vegetali ad elevato tenore di lipidi, disciogliere l'estratto lipidico nella miscela eluente A) diclorometano + cicloesano, in modo da non superare 0.1 mg/ml. Filtrare e iniettare il filtrato.

Eluire la colonna di gel permeazione con la miscela eluente selezionata con un flusso di 1.0 ml/min.

Raccogliere la frazione utile con i volumi individuati come al punto C.4.4.2.5.

Concentrare la frazione raccolta a piccolo volume mediante evaporatore rotante ($t = 40 - 50^{\circ}\text{C}$; pressione ridotta) e poi a secco per rotazione manuale del recipiente.

Ridisciogliere il residuo in un adatto volume di solvente.

B.5 METODO 5

Estrazione con acetone, ripartizione in diclorometano su Extrelut - 20

B.5.1 Scopo e campo di applicazione

Il metodo ha lo scopo di estrarre residui di composti, con un ampio spettro di polarità, da prodotti vegetali.

Il metodo consente di trasferire residui di antiparassitari da acetone acquoso in diclorometano allo scopo di eliminare coestrattivi idrofili e di realizzare anche una blanda purificazione per adsorbimento. Il metodo è anche indicato per substrati che possono causare emulsioni nel procedimento di ripartizione in imbuto separatore di cui in punto C 3.1.

Per il campo di applicazione vedi tabella 2.

B.5.2 Riferimenti

- AMBRUS, A., J. LANTOS, E. VISI, I. CSATLOS, L. SARVARI. 1981. General Method for Determination of Pesticide Residues in Samples of Plant Origin, Soil, and Water. I. Extraction and Cleanup. *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 64: 733-742.
- BECKER, G. 1979. Eine Multimethode zur gleichzeitigen Erfassung von 75 Pflanzenbehandlungsmitteln auf pflanzlichem Material. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 75: 149 - 152.
- DI MUCCIO, A., R. DOMMARCO, D. ATTARD BARBINI, A. SANTILIO, S. GIROLIMETTI, A. AUSILI, M. VENTRIGLIA, T. GENERALI, L. VERGORI 1993. Application of solid-phase partition cartridges in the determination of fungicide residues in vegetable samples. *J. Chromatogr.*, 643:363-368.
- SPECHT, W. and M. TILLKES. 1985. Gas-chromatographische Bestimmung von Rückständen an Pflanzenbehandlungsmitteln nach Clean-up über Gel-Chromatographie und Mini-Kieselgel-Säulen-Chromatographie. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 322: 443 - 455.

B.5.3 Definizioni

Vedi A.1.3.

B.5.4 Principio

Una porzione del campione vegetale sminuzzato viene omogeneizzato in presenza di acetone, che viene separato mediante filtrazione.

La soluzione acetone + acqua derivante dal procedimento di estrazione viene fatta assorbire su un materiale siliceo macroporoso contenuto in una colonna. Parte dell'acetone viene rimosso con un flusso di azoto. I residui di antiparassitari sono recuperati eluendo la colonna con diclorometano.

B.5.5 Reattivi, materiali e vetreria

- Acetone , diclorometano puri per analisi di residui.
- Celite 545 lavata con acidi, pura per l'analisi dei residui, riscaldata a 500 °C per almeno 6 h.
- Dischi di carta da filtro, diametro 70 mm, Schleicher e Schuell, 589 fascia nera, Ref. n. 300008, o equivalenti.
- Cilindro graduato da 500 ml con divisione ± 5 ml e con cono a smeriglio.
- Imbuto Büchner con piastra in vetro a fessure, 70 mm di diametro e volume dell'imbuto di ca. 250 ml, munito di raccordo per il vuoto su cono smeriglio 29/32.
- Cartucce Extrelut-20 Merck, cod. N. 11737 e ago 0.60 x 30 mm cod. N. 15373
- Acido cloridrico 6 N

B.5.6 Apparecchiature

- Bilancia tecnica a ± 0.1 g.
- Trituratore: Hobart food cutter; Robot Coupe o equivalenti.
- Omogeneizzatore: IKA, Ultra Turrax T25 con attrezzo di dispersione S25N - 18G oppure S25N - 25GM o altri turboestrattori equivalenti.
- Pompa da vuoto ad acqua o equivalente.
- Fonte di azoto in grado di fornire gas ad un flusso di 1 l/min (usare un rotometro per la misura)
- Evaporatore rotante sottovuoto.

B.5.7 Campionamento

Vedi A.1.7.

B.5.8 Preparazione del campione per l'analisi

Vedi A.1.8.

B.5.9 Procedimento

Dalla massa del campione di analisi, preparato come in A.1.8, pesare in un becker a forma alta da 500 ml un'aliquota di analisi di 100 g (per campioni secchi, ad esempio cereali in granella e mangimi in pellets, è consigliabile aggiungere 10 ml di acqua per ottenere un rigonfiamento della massa).

Aggiungere 200 ml di acetone ed omogeneizzare per 2 minuti.

Aggiungere 5 g di Celite e rimescolare. Trasferire la miscela su un imbuto büchner contenente un filtro di carta inumidito con il solvente di estrazione e filtrare sotto aspirazione in un cilindro graduato da 500 ml.

Lavare l'asta dell'omogeneizzatore e il recipiente di estrazione con porzioni (2 x 50 ml) del solvente di estrazione e trasferire, ogni volta, il solvente di lavaggio sull'imbuto büchner. Continuare il lavaggio con acetone del materiale sul büchner fino a portare il volume a 400 ml.

Prelevare un'aliquota di 20 ml (pari a 5 g di matrice) della soluzione acetone + acqua derivante dalla estrazione e trasferirla sulla colonna di Extrelut-20.

Lasciar assorbire il liquido ed attendere 10 min per consentire un'omogenea distribuzione dell'estratto nel materiale di riempimento della colonna. Far passare attraverso la colonna un flusso di azoto dal basso verso l'alto di 1 l/min per 20 min. Staccare la colonna di Extrelut-20 dal flusso di azoto, connettere all'uscita della colonna un ago con attacco Luer come restrittore di flusso ed eluire con 5 x 20 ml porzioni di diclorometano. Concentrare a piccolo volume usando un evaporatore rotante ($t= 40\text{ }^{\circ}\text{C}$; pressione ridotta) e portare, quindi, a secco per rotazione manuale del recipiente.

Ridisciogliere il residuo in un idoneo volume di solvente per un successivo stadio di purificazione o di analisi.

Nota. Nel caso l'analisi riguardi Folpet, Captan e Captafol condizionare le colonne Extrelut-20 come segue: lavare per percolazione con HCL 6 N fino a scomparsa di colore giallo, poi con acqua distillata fino a neutralità, rimuovere l'acqua che rimane in colonna con 100 ml di acetone e rimuovere a sua volta l'acetone con un flusso di azoto, dal basso verso l'alto, di 1 litro/min.

PARTE C

Procedimenti separati per estrazione,
ripartizione, purificazione e determinazione

C.1 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Vedi A.1.

C.2 ESTRAZIONE

C.2.1 Estrazione con Acetone o con Acetone + metanolo, (1 +1, v+v).

C.2.1.1 Scopo e campo di applicazione

Il metodo ha lo scopo di estrarre residui di composti, con un ampio spettro di polarità, da prodotti vegetali.

C.2.1.2 Riferimenti

- AMBRUS, A., J. LANTOS, E. VISI, I. CSATLOS, L. SARVARI. 1981. General Method for Determination of Pesticide Residues in Samples of Plant Origin, Soil, and Water. I. Extraction and Cleanup. *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 64: 733-742.
- BECKER, G. 1979. Eine Multimethode zur gleichzeitigen Erfassung von 75 Pflanzenbehandlungsmitteln auf pflanzlichem Material. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 75: 149 - 152.
- BRANCA, P. e P. QUAGLINO. 1989. Determinazione rapida di pesticidi organofosforati e diserbanti triazinici in acque e alimenti. *Boll. Chim. Igien.*, 40: 71-78.
- QUAGLINO, P. e P. BRANCA. 1992. Tecnica multiresiduo per la determinazione di principi attivi termolabili. *Boll. Chim. Igien.*, 43: 399-409.
- SPECHT, W. and M. TILLKES. 1985. Gas-chromatographische Bestimmung von Rückständen an Pflanzenbehandlungsmitteln nach Clean-up über Gel-Chromatographie und Mini-Kieselgel-Säulen-Chromatographie. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 322: 443 - 455.

C.2.1.3 Definizioni

Vedi A.1.3.

C.2.1.4 Principio

Una porzione del campione vegetale sminuzzato viene omogeneizzato in presenza di solvente di estrazione, che viene separato mediante filtrazione o diversamente utilizzato per recuperare i composti di interesse.

C.2.1.5 Reattivi, materiali e vetreria

- Acetone o Acetone + metanolo (1 + 1, v+v), puri per analisi di residui.
- Celite 545 lavata con acidi, pura per l'analisi dei residui, riscaldata a 500 °C per almeno 6 h.
- Dischi di carta da filtro, diametro 70 mm, Schleicher e Schuell, 589 fascia nera, Ref. n. 300008, o equivalenti.
- Cilindro graduato da 500 ml con divisione ± 5 ml e con cono a smeriglio.
- Imbuto Büchner con piastra in vetro a fessure, 70 mm di diametro e volume dell'imbuto di ca. 250 ml, munito di raccordo per il vuoto su cono smeriglio 29/32.

C.2.1.6 Apparecchiature

- Bilancia tecnica a ± 0.1 g.
- Trituratore: Hobart food cutter; Robot Coupe o equivalente.
- Omogeneizzatore: Ultra Turrax T25 o altri turboestrattori equivalenti.
- Bagno ad ultrasuoni: Branson o equivalente.
- Pompa da vuoto ad acqua o equivalente.

C.2.1.7 Campionamento

Vedi A.1.7.

C.2.1.8 Preparazione del campione per l'analisi

Vedi A.1.8.

C.2.1.9 Procedimento

Dalla massa del campione di analisi, preparato come in 1.8, pesare in un adatto recipiente in vetro (becker o provettone) un'aliquota di analisi di 100 g (per campioni

secchi, ad esempio cereali in granella e mangimi in pellets, è consigliabile aggiungere 10 ml di acqua per ottenere un rigonfiamento della massa)

Aggiungere 200 ml di solvente di estrazione (acetone oppure miscela acetone + metanolo, 1 + 1, v+v;) ed omogeneizzare per 2 minuti o tenere il contenitore in bagno ad ultrasuoni per 30 minuti.

Aggiungere 5 g di Celite e rimescolare. Trasferire la miscela su un imbuto büchner contenente un filtro di carta inumidito con il solvente di estrazione e filtrare sotto aspirazione in un cilindro graduato da 500 ml.

Lavare l'asta dell'omogeneizzatore e il recipiente di estrazione con porzioni (2 x 50 ml) del solvente di estrazione e trasferire il solvente di lavaggio sull'imbuto büchner.

Registrare il volume del filtrato.

Continuare con una delle tecniche di ripartizione di cui al punto C.3 o di purificazione di cui al punto C.4.1.

C.2.2 Estrazione con etile acetato

C.2.2.1 Scopo e campo di applicazione

Il metodo consente di estrarre residui di antiparassitari con ampio spettro di polarità da vegetali senza apprezzabile trascinarsi di acqua nel solvente di estrazione. Per il campo di applicabilità vedi tabelle allegate.

C.2.2.2 Riferimenti

- COPPI, C. e P. MANCINI. Acidità delle Matrici Ortofrutticole e sue Neutralizzazione prima di procedere alla Estrazione dei Residui di Antiparassitari con Metodiche Multiresiduo. *Boll. Chim. Ig. (in corso di pubblicazione)*.
- ROSS, H., A. J. VAN MUNSTEREN, F. M. NAB and L. G. M. Th. TUINSTRAN. 1987. Universal Extraction/Cleanup Procedure for Screening of Pesticides by Extraction with EthylAcetate and Size Exclusion Chromatography. *Anal. Chim. Acta, 196: 95-102*.

C.2.2.3 Definizioni

Vedi A.1.3.

C.2.2.4 Principio

Una porzione del campione vegetale sminuzzato viene omogeneizzato in presenza di solvente di estrazione, che viene separato mediante filtrazione o diversamente utilizzato per recuperare i composti di interesse.

C.2.2.5 Reattivi, materiali e vetreria

- Tubo da centrifuga da 250 ml con tappo a vite e guarnizione in gomma rivestita in PTFE.
- Solvente di estrazione: Etile acetato puro per analisi di residui.
- Celite 545 - riscaldato a 500 °C per almeno 6-8 h
- Sodio solfato anidro, puro per analisi, riscaldato a 500°C per almeno 6-8 h.
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ puro per analisi.

C.2.2.6 Apparecchiature

- Bilancia tecnica (± 0.1 g).
- Trituratore Hobart Food Cutter; Robot Coupe o simili.
- Omogeneizzatore: Ultra-Turrax T25 o turboestrattori simili.
- Centrifuga con rotore per provettoni da 250 ml.
- Evaporatore rotante sottovuoto o equivalente.
- Bagno ad ultrasuoni.

C.2.2.7 Campionamento

Vedi A.1.7.

C.2.2.8 Preparazione del campione per l'analisi

Vedi A.1.8.

C.2.2.9 Procedimento

Dalla massa del campione di analisi, preparato come in A.1.8, pesare nel tubo da centrifuga 50 g di campione e la prescritta quantità di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (vedi B.3.9.1, Tabella I) per facilitare l'estrazione dei principi attivi a carattere basico. Aggiungere 100 ml di etile acetato. Omogeneizzare con Ultra Turrax T25 per 2 minuti a velocità di circa 9500 giri/min. Aggiungere un cucchiaino di Celite (5g), rimescolare con una bacchetta di vetro e poi, poco alla volta e rimescolando, 25 g di sodio solfato anidro.

Tappare il tubo da centrifuga e agitare per sbattimento. Centrifugare a $1500 \div 1800$ r.p. m. per 5 minuti. Trasferire l'etile acetato in una beuta da 250 ml prelevandolo dal tubo da centrifuga con una pipetta. Se necessario filtrare attraverso un batuffolo di cotone idrofilo sgrassato mantenuto in un imbuto. Ripetere l'estrazione con porzioni (2 x 50 ml) di etile acetato tenendo il recipiente ogni volta in bagno ad ultrasuoni per 5 minuti.

Riunire gli estratti e concentrare a piccolo volume mediante evaporatore rotante sottovuoto ($40 \div 50$ °C, pressione ridotta) e poi a secco manualmente.

Ridisciogliere il residuo in modo appropriato (natura e volume del solvente) ai successivi passaggi analitici.

C.2.3 Estrazione per dispersione su terre di diatomee

C.2.3.1 Scopo e campo di applicazione

Il metodo consente di estrarre residui di antiparassitari con ampio spettro di polarità da vegetali senza apprezzabile trascinamento di acqua nel solvente di estrazione.

C.2.3.2 Riferimenti

- DAGNA, L., G. GASPARINI, M. L. ICARDI e E. SESIA.1993. Metodo multiresiduo di estrazione su colonna per la determinazione di residui di fitofarmaci in matrici vegetali e liquide. *Boll. Chim. Igien.*, 44: 383-397.

C.2.3.3 Definizioni

Vedi A.1.3.

C.2.3.4 Principio

Una porzione del campione vegetale viene impastato insieme a terra di diatomee speciale. La miscela è trasferita in una colonna di vetro ed eluita con solvente.

C.2.3.5 Reattivi, materiali e vetreria

- Extrelut: Merck bustine cod. 11738, oppure in confezione cod. 113076 o equivalenti.
- Solvente di estrazione: diclorometano o etile acetato, puri per analisi di residui.
- Acido citrico, puro per analisi.
- Colonne cromatografiche con frit di tenuta in vetro, 200 x 20 mm d. i. con rubinetto in PTFE.
- Lana di vetro.

C.2.3.6 Apparecchiature

- Bilancia tecnica a ± 0.1 g.
- Trituratore: Hobart food cutter, Robot Coupe, o equivalente.
- Evaporatore rotante sottovuoto.

C.2.3.7 Campionamento

Vedi A.1.7.

C.2.3.8 Preparazione del campione per l'analisi

La dispersione dell'aliquota di analisi sulla terra di diatomee è preferibilmente effettuata partendo dal campione surgelato. Vedi A.1.8.

C.2.3.9 Procedimento

Dalla massa del campione di analisi, preparato come in C.2.3.8, pesare 10 g in un becker.

Solo per gli ortaggi aggiungere 1 ml di soluzione di Acido citrico 20% p/v.

Mescolare il campione con il contenuto di una bustina, con una bacchetta di vetro, fino al completo inglobamento del campione con la fase che non deve presentare grumi.

Il campione disperso sulla fase è trasferito nella colonna di estrazione. Assestare la massa con una leggera battitura sull'esterno della colonna, senza comprimere. Coprire con un batuffolo di lana di vetro e, dopo circa 10 minuti, eluire con 4 x 25 ml di diclorometano o etile acetato.

Terminata l'eluizione (circa 20 min.) l'estratto è evaporato, senza alcuna anidificazione, su evaporatore rotante sottovuoto ($t= 40-50\text{ }^{\circ}\text{C}$; pressione ridotta) fino a piccolo volume e poi a secco per rotazione manuale del recipiente.

Ridisciogliere il residuo in modo appropriato (natura e volume del solvente) ai successivi passaggi analitici di purificazione.

C.2.4 Estrazione per dispersione su Florisil

C.2.4.1 Scopo e campo di applicazione

Il metodo consente di estrarre residui di antiparassitari con ampio spettro di polarità da vegetali senza apprezzabile trascinamento di acqua nel solvente di estrazione. Vedi tabella 2

C.2.4.2 Riferimenti

- KADENCZKI, L., Z. ARPAD, I. GARDI, A. AMBRUS, L. GYORFI, G. REESE, W. EBING. 1992. Column Extraction of residues of several pesticides from fruits and vegetables: A simple multiresidue analysis method. *J. Ass. Off. Chem. Int.*, 75: 53 – 61.

C.2.4.3 Definizioni

Vedi A.1.3.

C.2.4.4 Principio

Una porzione rappresentativa del campione di analisi è mescolata intimamente con Florisil. La miscela è sistemata in una colonna di vetro ed eluita con solvente.

Il metodo realizza allo stesso tempo una parziale purificazione dell'estratto per adsorbimento.

C.2.4.5 Reattivi, materiali e vetreria

- Colonne per estrazione, in vetro, 400 x 20 mm d. i. con rubinetto in PTFE.
- Acetone, diclorometano, etile acetato, acqua, puri per analisi di residui. Acqua di qualità adeguata può essere ottenuta mediante estrazione di acqua distillata in imbuto separatore (4 litri di acqua con 2 x 100 ml di diclorometano).
- Florisil: 60 - 100 mesh, pretrattare come segue: riscaldare a ricadere 2 Kg di Florisil in 5 litri di acqua distillata per 1 h, decantare l'acqua e ripetere la procedura tre volte. Rimuovere l'acqua mediante filtrazione sotto vuoto. Essiccare il Florisil a 150°C e riattivare a 650°C per 2 h.
Raffreddare l'adsorbente in essiccatore. Il Florisil è adatto al metodo se 10 g di materiale possono assorbire 6.0 - 6.5 g di acqua senza perdere le proprie caratteristiche di polvere asciutta ("free - flowing").

- Sodio solfato anidro, puro per analisi, riscaldato a 500°C per almeno 6- 8 h.
- Cotone idrofilo sgrassato per estrazione in Soxhlet con etere di petrolio 40 - 60 °C + acetone (1 + 1, v + v) per 6 h.

C.2.4.6 Apparecchiature

- Bilancia tecnica a ± 0.1 g.
- Trituratore: Hobart Food Cutter; Robot Coupe o equivalente.
- Omogeneizzatore: Ultra-Turrax T25, o altri turboestrattori equivalenti.
- Evaporatore rotante sotto vuoto.

C.2.4.7 Campionamento

Vedi A.1.7.

C.2.4.8 Preparazione del campione per l'analisi

Trasferire una porzione rappresentativa di 200 g di campione nel vaso di omogeneizzazione e aggiungere acqua se necessario per realizzare un'appropriata omogeneizzazione. Disintegrare il campione ad alta velocità per ottenere una polpa omogenea. Pesare immediatamente una quantità di omogeneizzato (W_p) corrispondente a 5 g di campione in un mortaio. Evitare che si separi acqua durante l'operazione di pesatura, altrimenti omogeneizzare di nuovo, aggiungere abbastanza Florisil (W_f) da ottenere dopo rimescolamento un campione polverulento asciutto. A titolo di guida riguardo ai valori di W_p e W_f vedere Tab. II. La massa di omogeneizzato (W_p) preso per l'estrazione e la massa di Florisil (W_f) dipendono dal volume di acqua (V), in millilitri, aggiunta al campione. Essi possono essere calcolati in grammi mediante le formule seguenti:

$$W_p = (200 + V)/40;$$

$$W_f = 1.6 \times W_p.$$

C.2.4.9 Procedimento

Preparare uno strato di 0.5 cm di solfato di sodio anidro al fondo della colonna di estrazione. Trasferire la miscela polverulenta del campione nella colonna in maniera uniforme e assestare il materiale battendo la colonna. Lavare mortaio e pestello con circa 20 ml del solvente di estrazione: diclorometano + acetone (9 + 1, v + v) o etile acetato. Versare i lavaggi sulla colonna e aggiustare il flusso a 5 ml/min. Completare l'estrazione con ulteriori 30 ml di solvente. Concentrare l'estratto fino a piccolo volume mediante evaporatore rotante e poi a secco mediante rotazione manuale del recipiente.

Ridisciogliere il residuo in modo appropriato (natura e volume del solvente) ai successivi passaggi analitici di purificazione.

Tabella 2 - Guida alla quantità di acqua e di Florisil richiesti per la preparazione di frutta e verdure per l'estrazione su colonna. (Rif. C.2.4.2)

Derrata 200 g	Acqua aggiunta (ml)	Massa di omogeneizzato prelevato (g)	Massa di Florisil addizionato (g)
ciliege ,uva, meloni, peperoni verdi, susine, patate, lamponi, fragole, pomodori.		5	8
mele, albococche, banane, broccoli, zucchini, mirtilli, melanzane, limoni, arance, pere, ravanelli, bietole rosse, barbabietola.	50	6.25	10
cavoletti di Brussels, carote, sedano, fagioli verdi, piselli, lattuga Turnip, Cavolo rapa	100	7.5	12