

PROPOSTE PER L'ARMONIZZAZIONE DELLE STIME DI LOD E LOQ

Anna Chiara Turco, Marina Patriarca

Laboratorio Nazionale di Riferimento per i metalli e i composti azotati negli alimenti

IX Workshop dei Laboratori Nazionali di Riferimento per i metalli e i composti azotati negli alimenti e nei mangimi, per gli additivi nei mangimi, per i contaminanti da processo - Roma, 28-29 novembre 2019

Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria



REGOLAMENTO (CE) N. 333/2007 DELLA COMMISSIONE

del 28 marzo 2007

relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di piombo, cadmio, mercurio, stagno inorganico, 3-MCPD e benzo(a)pirene nei prodotti alimentari

(Testo rilevante ai fini del SEE)

«LOD» =

limite di rilevazione: la minima concentrazione misurata da cui è possibile dedurre con ragionevole certezza statistica la presenza dell'analita. Il limite di rilevazione è numericamente pari al triplo della deviazione standard della media delle determinazioni in bianco (n>20).

«LOQ» =

limite di quantificazione: il minimo tenore di analita misurabile con ragionevole certezza statistica. Se l'accuratezza e la precisione sono costanti in un intervallo di concentrazione prossimo al limite di rivelazione, ~~il limite di quantificazione è numericamente pari al sestuplo della deviazione standard della media delle determinazioni in bianco (n>20).~~

**Modificato da Reg.
(UE) 2016/582**

Tabella 5

Criteria di prestazione relativi ai metodi di analisi per il piombo, il cadmio, il mercurio e lo stagno inorganico

Parametro	Valore/Osservazione
Applicabilità	Alimenti di cui al regolamento (CE) n. 1881/2006
LOD	Per lo stagno inorganico meno di 5 mg/kg. Per gli altri elementi meno di un decimo del tenore massimo di cui al regolamento (CE) n. 1881/2006, salvo nel caso in cui il tenore massimo di piombo sia inferiore a 100 µg/kg. In tal caso meno di un quinto del tenore massimo.
LOQ	Per lo stagno inorganico meno di 10 mg/kg. Per gli altri elementi meno di un quinto del tenore massimo di cui al regolamento (CE) n. 1881/2006, salvo nel caso in cui il tenore massimo di piombo sia inferiore a 100 µg/kg. In tal caso meno di due quinti del tenore massimo.

Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria

IX Workshop dei Laboratori Nazionali di Riferimento per i metalli e i composti azotati negli alimenti e nei mangimi, per gli additivi nei mangimi, per i contaminanti da processo - Roma, 28-29 novembre 2019

REGOLAMENTI

REGOLAMENTO (UE) 2016/582 DELLA COMMISSIONE

del 15 aprile 2016

che modifica il regolamento (CE) n. 333/2007 per quanto riguarda l'analisi di arsenico inorganico, piombo e idrocarburi policiclici aromatici e per alcuni criteri di prestazione relativi all'analisi

(Testo rilevante ai fini del SEE)

3) al punto C.3.1. Definizioni, la definizione di LOQ è sostituita dalla seguente:

«**LOQ**» = limite di quantificazione: il minimo tenore di analita misurabile con ragionevole certezza statistica. Se l'accuratezza e la precisione sono costanti in un intervallo di concentrazione prossimo al limite di rilevazione, il limite di quantificazione è numericamente pari al decuplo della deviazione standard della media delle determinazioni in matrice bianca (n ≥ 20).»

4) al punto C.3.3.1. Criteri di prestazione, la lettera a) è sostituita dalla seguente:

«a) Criteri di prestazione relativi ai metodi di analisi per il piombo, il cadmio, il mercurio, lo stagno inorganico e l'arsenico inorganico

Tabella 5

Parametro	Criterio				
Recupero	Si applicano le disposizioni di cui al punto D.1.2				
LOD	= tre decimi del LOQ				
LOQ	Stagno inorganico	≤ 10 mg/kg			
	Piombo	ML < 0,01 mg/kg	0,01 < ML ≤ 0,02 mg/kg	0,02 < ML < 0,1 mg/kg	ML ≥ 0,1 mg/kg
		≤ ML	≤ due terzi del ML	≤ due quinti del ML	≤ un quinto del ML
	Cadmio, mercurio, arsenico inorganico	ML è < 0,100 mg/kg		ML è ≥ 0,100 mg/kg	
≤ due quinti del ML		≤ un quinto del ML»			

Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria

IX Workshop dei Laboratori Nazionali di Riferimento per i metalli e i composti azotati negli alimenti e nei mangimi, per gli additivi nei mangimi, per i contaminanti da processo - Roma, 28-29 novembre 2019

Criticità:

- LOD e LOQ matrici dipendenti

(devono essere determinati per ogni matrice perché la stima di questi parametri può risentire dell'effetto matrice applicando lo stesso metodo analitico a campioni di matrice differente)

- Considerevole sforzo in termini di tempo e lavoro

(soprattutto nel caso di metodi multi-elementali/multi-matrice. Lo sforzo può essere giustificato nel caso di sostanze proibite ma non è necessario nel campo degli elementi chimici considerando che i tenori massimi previsti dalla normativa di riferimento in questo caso sono significativamente $>$ al LOD e LOQ)

Criticità:

- Discrepanze osservate nei valori di LOD e LOQ tra i laboratori

(dipendenti da prestazioni pratiche individuali del laboratorio e dalla scelta del disegno sperimentale effettuata dal laboratorio per stimare questi parametri)

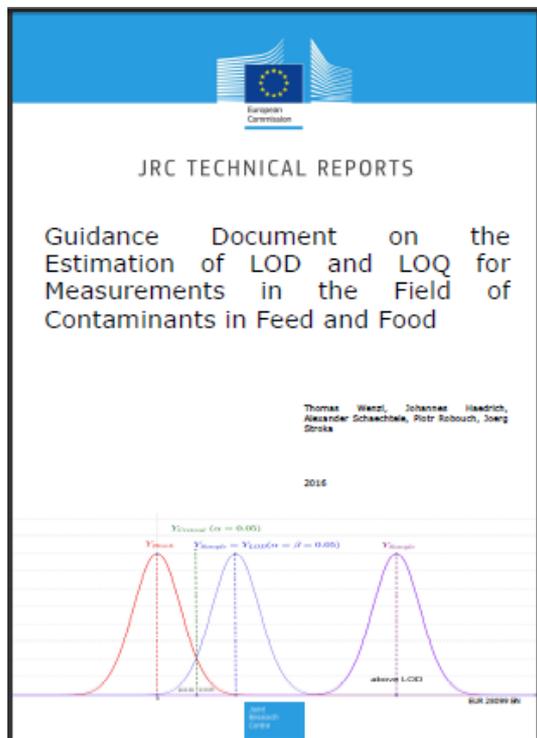
- Possibile sottostima LOD e LOQ se basata su $n \geq 20$ campioni bianchi

rispetto a quella ottenuta eseguendo l'analisi su una numerosità inferiore



La Commissione Europea si sta orientando verso una eliminazione della prescrizione prevista nel Reg. UE 333/2007 e s.m.i. lasciando spazio alla linea guida stilata dal network degli EURLs sui contaminanti

Linee guida sulla stima del LOD e LOQ per le misurazioni nel campo dei contaminanti nei mangimi e negli alimenti



Obiettivi:

- Armonizzare gli approcci per la stima del LOD e LOQ
- Fornire indicazioni aggiuntive per la stima del LOD e LOQ relativamente ai metodi analitici adottati nell'ambito del controllo ufficiale degli alimenti e dei mangimi nell'Unione Europea

Approcci per la stima di LOD e LOQ nelle differenti aree:

- **Analisi di bianchi o pseudobianchi**

- **Osservazioni appaiate**

- **Taratura**

- **Analisi di bianco reagente**

- **Rapporto segnale/rumore (S/N)**

Elementi chimici

Micotossine

Contaminanti da processo

Criteria per la scelta dell'approccio migliore:

- Assicurarsi che l'approccio scelto sia in accordo ai requisiti normativi
- Valutare la disponibilità dei campioni bianchi
- Valutare la fattibilità e scegliere le migliori condizioni di taratura

Note: Tutti gli esperimenti devono essere condotti in condizioni di ripetibilità. In caso di elevata variabilità si può applicare la condizione di ripetibilità intermedia.

Approcci da preferire nel campo degli elementi chimici:

- **Analisi di bianchi o pseudobianchi** **1°**
- **Taratura** **2°**
- **Osservazioni appaiate** **3°**

Definizioni

Bianchi reagente: campioni per i quali viene eseguita la procedura analitica completa ad eccezione dell'aggiunta dell'analita

Bianchi: campione di prova in cui l'analita è assente

Pseudobianchi:

- **Bianchi naturalmente contaminati:** campioni di prova nei quali l'analita è naturalmente presente a concentrazioni basse ma misurabili.
- **Bianchi fortificati:** campioni di prova nei quali l'analita viene aggiunto ad un basso livello di concentrazione nota (concentrazione ≤ 5 volte il LOD atteso cioè derivante da conoscenze sperimentali pregresse e/o letteratura)

Stima di LOD e LOQ:

- **Analisi di campioni bianchi**

Scelta dei campioni:

1. Disponibilità di campioni (bianchi o pseudobianchi)
2. Dipendenza del metodo e/o dell'analita dalla matrice
3. Omogeneità delle varianze
4. Concentrazione dell'analita intorno al LOD atteso (≤ 5 volte)

Stima di LOD e LOQ:

- **Analisi di campioni bianchi (n=10)**

Bianchi o Pseudobianchi rappresentativi della matrice

Soluzione ideale per analiti o metodi analitici matrice dipendenti

Pseudobianchi di matrici differenti (unica matrice o più matrici)

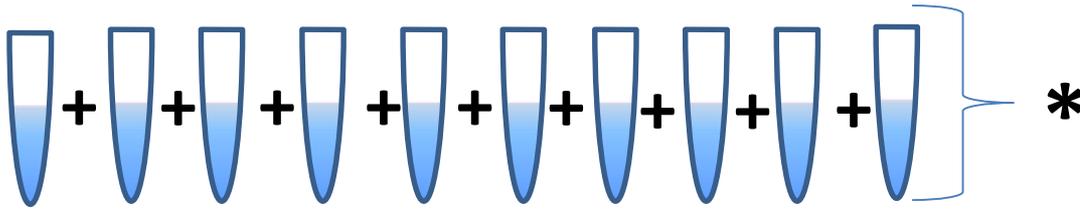
nel caso di analiti o applicazione di metodi analitici non influenzati da effetto matrice o nel caso di matrici confrontabili a quella di interesse per caratteristiche chimico-fisiche. Soluzione ideale per metodi con ampi campi di applicazione.

• **Analisi di campioni bianchi (n=10)**

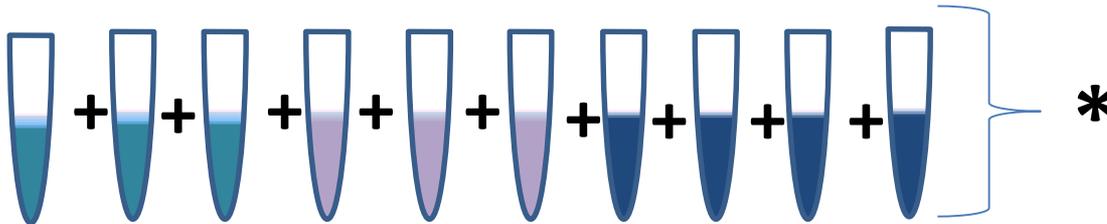
Condizioni necessarie:

1. Preparazione indipendenti
2. Analisi in singolo di ognuna delle 10 preparazioni
3. Concentrazione dell'analita nei campioni intorno al LOD atteso (non più di 10 volte il LOD)
4. Retta di taratura da progettare intorno al LOD atteso con livelli di concentrazione equidistanti e utilizzando lo stesso modello applicato nel metodo di prova
5. Analisi svolta in condizioni di ripetibilità

• Analisi di campioni bianchi (n=10)



Campioni bianchi e/o pseudobianchi naturalmente contaminati (matrice unica)

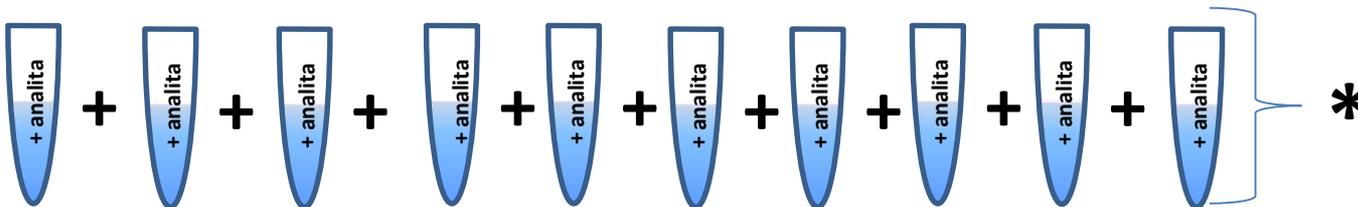


Campioni pseudobianchi naturalmente contaminati (più tipi di matrice → pooled)

* **Scarto tipo**
(della media dei risultati)

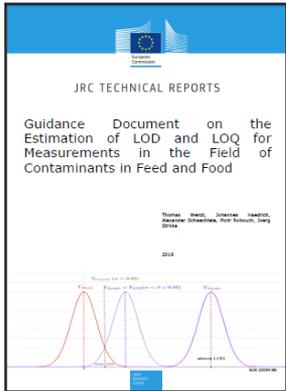
↓ Equazione A

LOD



Campioni pseudobianchi fortificati (matrice unica o più tipi di matrice)

• Analisi di campioni bianchi



EQUAZIONE A

$$x_{LOD} = 3,9 * \frac{s_{y,b}}{b}$$

x_{LOD} : Limite di rivelabilità

$s_{y,b}$: Scarto tipo dei segnali di bianco / pseudo bianco

b : Pendenza della curva di taratura

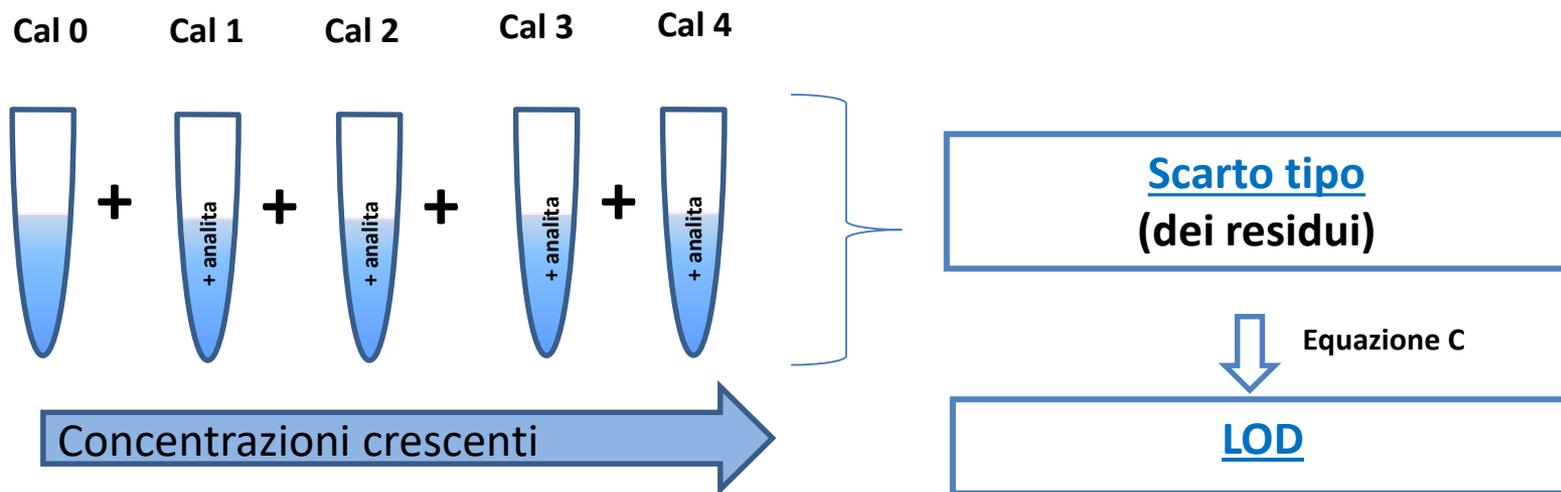
Stima del LOD e LOQ

• Approccio della taratura

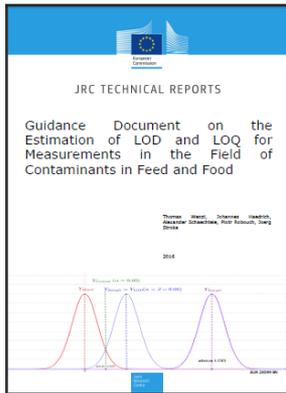
Condizioni necessarie:

1. Analisi di bianchi o pseudobianchi addizionati a livelli di concentrazione equidistanti (5 livelli incluso lo zero; in accordo con la ISO 11843-2:2000)
2. Ciascun livello preparato ed analizzato in doppio seguendo l'intera procedura analitica
3. Concentrazione dell'analita: non più di 10 volte il LOD atteso
4. Retta di taratura da progettare intorno al LOD atteso (altrimenti rischio di sovrastima del LOD o di eteroscedasticità delle intensità di segnale misurate che se ignorata può portare a stime non corrette)
5. Analisi svolta in condizioni di ripetibilità

- **Approccio della taratura**
(matrice specifico)



• Approccio della taratura



EQUAZIONE C

$$x_{LOD} = 3,8 * \frac{s_{y,x}}{b} * \sqrt{1,1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

- x_{LOD} : Limite di rivelabilità
- $s_{y,x}$: Scarto tipo dei residui
- b : Pendenza della curva di taratura
- \bar{x} : Livello medio di taratura
- x_i : Concentrazione di analita al livello di taratura i

Stima del LOD e LOQ

- **Approccio delle osservazioni appaiate**

Applicazione:

1. Se non sono disponibili campioni bianchi
2. Se è necessario includere più matrici nel metodo, riducendo lo sforzo lavorativo necessario per la stima del LOD nel caso di metodi analitici con ampio scopo
3. Se è necessario tenere conto della sottrazione del bianco

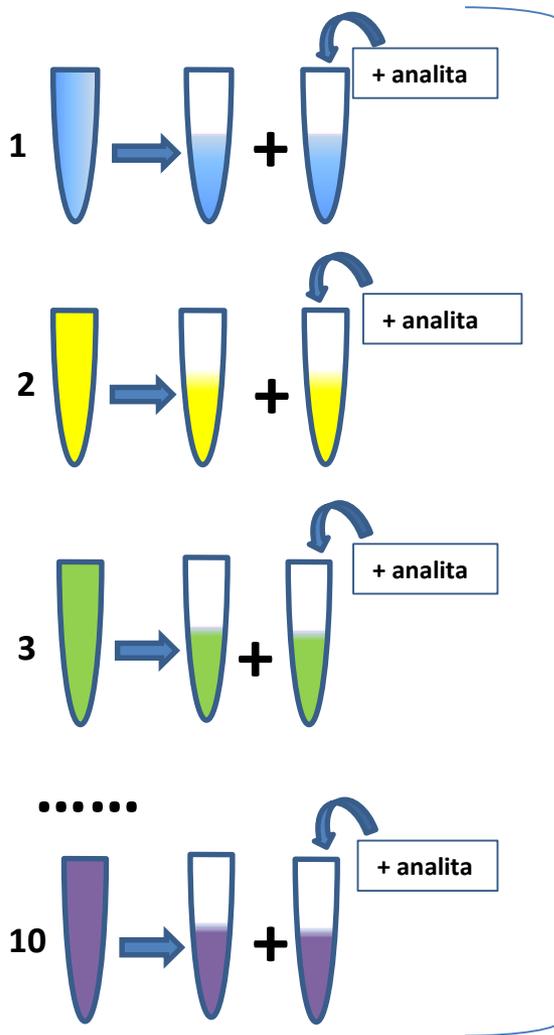
• Approccio delle osservazioni appaiate

Condizioni necessarie:

1. Identificare 10 pseudobianchi (di matrici differenti ma con contenuto simile di analita)
2. Dividere in due aliquote i campioni pseudobianchi e aggiungere una aliquota con una concentrazione di analita pari al LOD atteso (non più di 5 volte il LOD)
3. Analizzare le due porzioni dei 10 pseudobianchi in condizioni di ripetibilità
4. Progettare una retta di taratura intorno al LOD atteso e sulla base del modello applicato nel metodo di prova. I livelli di concentrazione devono essere equidistanti e con una concentrazione max non superiore a 10 volte il LOD atteso

• Approccio delle osservazioni appaiate

(ciascuna coppia può essere analizzata anche in corse differenti per una migliore stima della variabilità)



Scarto tipo
(delle differenze tra i segnali)

Equazione B

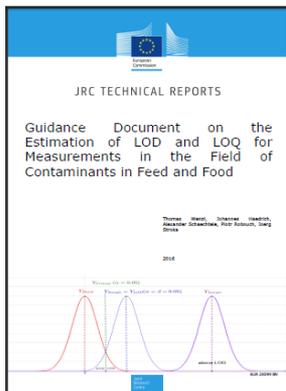


LOD

Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria

IX Workshop dei Laboratori Nazionali di Riferimento per i metalli e i composti azotati negli alimenti e nei mangimi, per gli additivi nei mangimi, per i contaminanti da processo - Roma, 28-29 novembre 2019

• Approccio delle Osservazioni Appaiate



EQUAZIONE B

$$x_{LOD} = 5,2 * \frac{s_{y,net}}{h}$$

x_{LOD} : Limite di rivelabilità

$s_{y,net}$: Scarto tipo delle differenze dei segnali di osservazioni appaiate

b : Pendenza della curva di taratura

Calcolo del LOQ

$$x_{\text{LOQ}} = \frac{10}{3} * x_{\text{LOD}} = 3.3 * x_{\text{LOD}}$$

In accordo al Reg. (UE) 333/2007

In programma revisione e aggiornamento

"Linee guida sulla stima del LOD e LOQ per le misurazioni nel campo dei contaminanti nei mangimi e negli alimenti":

Inserimento di altri contaminanti da processo, inquinanti organici persistenti (POP) alogenati, nitrati, nitriti, melammina, tossine vegetali,....

Grazie per l'attenzione!

Contatti

email: Inr.metalli@iss.it

website: <http://old.iss.it/meta/>

Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria

IX Workshop dei Laboratori Nazionali di Riferimento per i metalli e i composti azotati negli alimenti e nei mangimi, per gli additivi nei mangimi, per i contaminanti da processo - Roma, 28-29 novembre 2019

