

I PESTICIDI: Evoluzione delle metodiche della D.O. Chimica verso un unico metodo

Roma 17 Ottobre 2017

Dario Lucchetti



Il controllo pubblico nella sicurezza alimentare: punti di forza
delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLT

DI COSA PARLEREMO?

- Cosa sono i pesticidi
- Metodi per la purificazione del campione
- Il Quechers
- Applicazioni del Quechers su matrici e analiti «particolari»



Il controllo pubblico nella sicurezza alimentare: punti di forza
delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLT

COSA SONO I PESTICIDI?

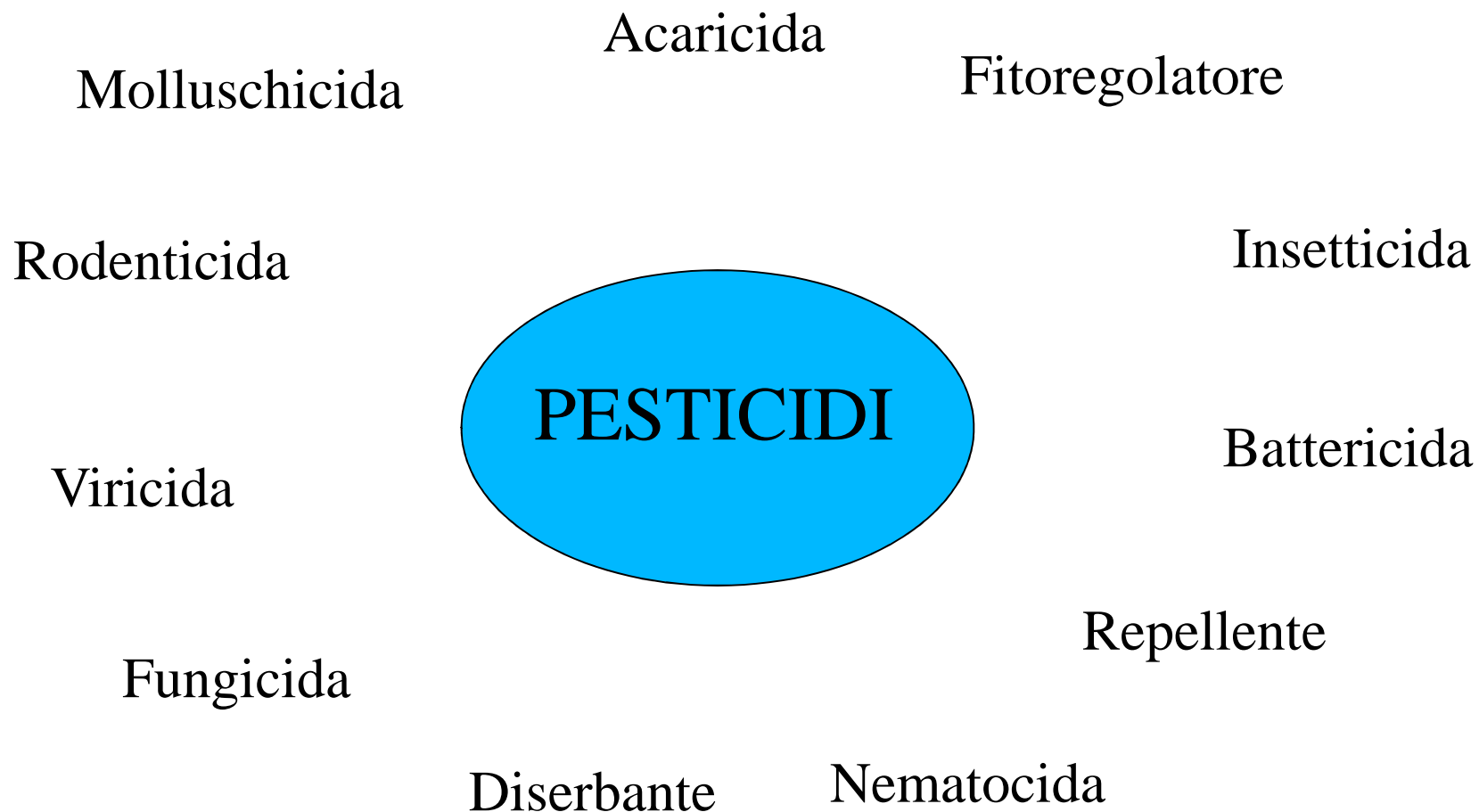
Il termine "pesticidi" è comunemente usato come sinonimo di prodotti fitosanitari. Il termine “pesticidi” è tuttavia termine più ampio che comprende anche prodotti come i biocidi, che non sono destinati all’uso su piante, ma servono a debellare organismi nocivi e portatori di malattie come insetti, ratti e topi.

I prodotti fitosanitari sono pesticidi che vengono utilizzati principalmente per mantenere in buona salute le colture e impedire loro di essere distrutte da malattie e infestazioni.



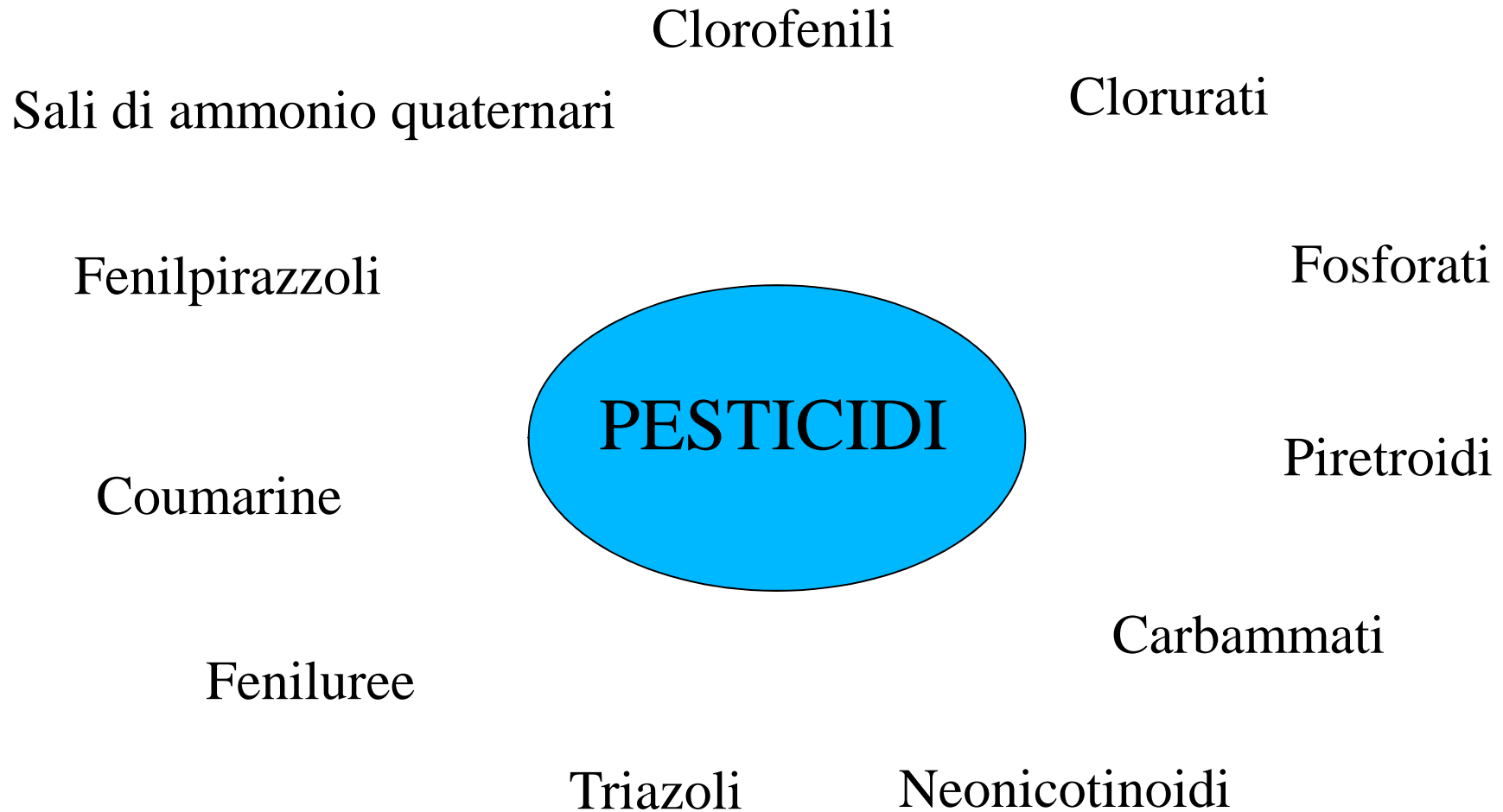
Il controllo pubblico nella sicurezza alimentare: punti di forza delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLTc

COSA SONO I PESTICIDI?



Il controllo pubblico nella sicurezza alimentare: punti di forza delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLTc

COSA SONO I PESTICIDI?



Il controllo pubblico nella sicurezza alimentare: punti di forza delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLTc

COSA SONO I PESTICIDI?

L'elevata differenziazione delle attività e quindi anche delle caratteristiche chimico fisiche dei pesticidi ha da subito generato una miriade di tecniche di estrazione, purificazione e determinazione differenti



Il controllo pubblico nella sicurezza alimentare: punti di forza delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLTc

COSA SONO I PESTICIDI?

RIVELATORE A CATTURA DI ELETTRONI DISEGNO ORIGINALE

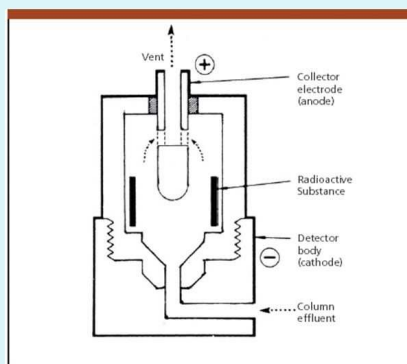
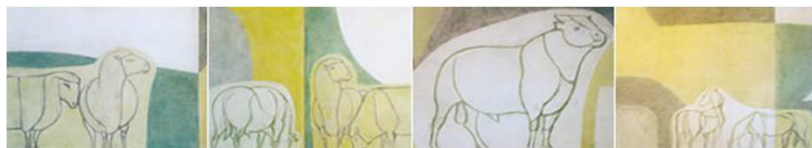
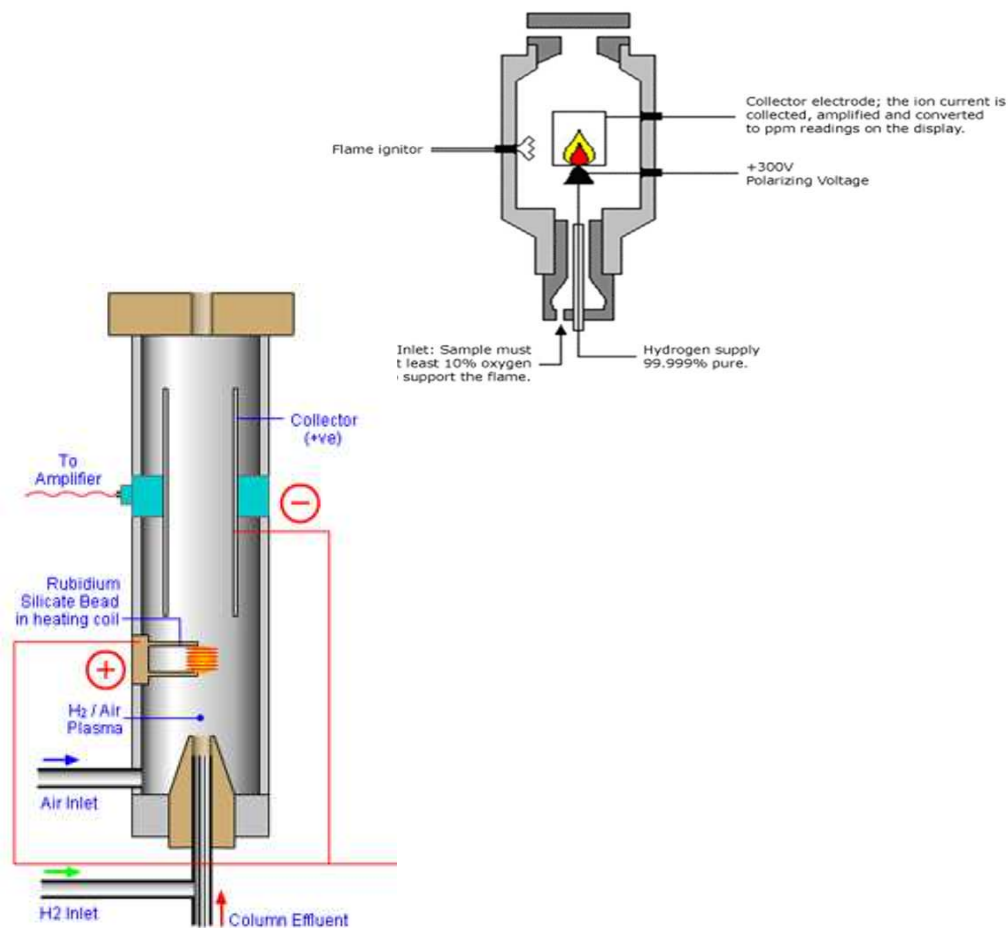


Figure 1: Schematic of a typical early electron-capture detector (2).

57

FID - FLAME IONIZATION DETECTOR



Il controllo pubblico nella sicurezza alimentare: punti di forza delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLTc

COSA SONO I PESTICIDI?

Ne risultava:

1. Elevati tempi di analisi
2. Utilizzo massiccio di solventi e vetreria di laboratorio
3. Multiple analisi cromatografiche per la determinazione di singole classi di pesticidi (es. ECD per clorurati, NPD per fosforati)
4. Interferenze di matrice spesso anche di difficile interpretazione.....

.....

.....



Il controllo pubblico nella sicurezza alimentare: punti di forza delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLTc

La risoluzione di questi problemi è arrivata con lo sviluppo e l'utilizzo del metodo QUECHERS

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

Il metodo QuEChERS è stato sviluppato da Michelangelo Anastassiades negli anni 2001 e 2002 durante la sua visita post-doc presso l'USDA / ARS-ERRC a Wyndmoor / Pennsylvania (USA) nel gruppo di ricerca di Steven Lehotay. Inizialmente la metodologia è stata sviluppata per l'analisi dei farmaci veterinari (anthelmintici e tireostatici) nei tessuti animali, ma dopo aver realizzato il suo grande potenziale nell'estrazione di composti polari è stato anche testato sull'analisi dei residui di pesticidi nel materiale vegetale con grande successo.

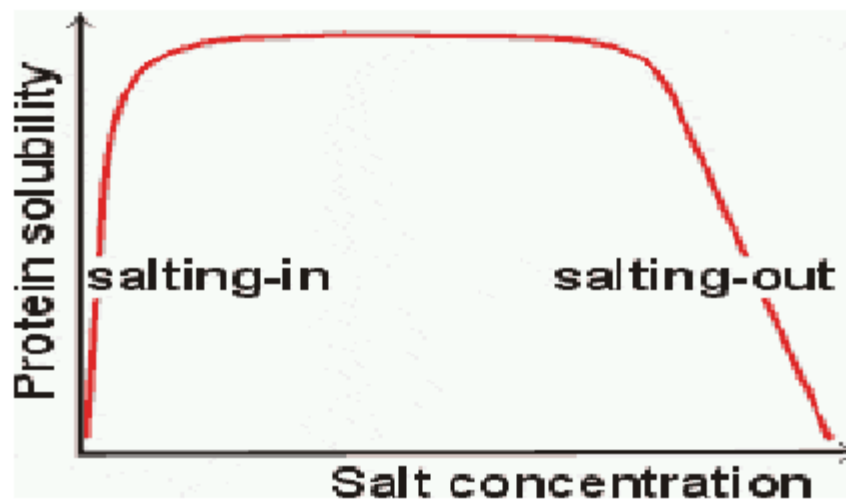


Il controllo pubblico nella sicurezza alimentare: punti di forza delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLTc

QUECHERS fase I

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

Il **QuEChERS fase I** consiste in una miscela di sali che sfruttando sia l'effetto tampone, che permette **l'estrazione** in solvente di analiti pH-dipendenti, e l'aumento della forza ionica (salting out) con conseguente precipitazione dei principali interferenti

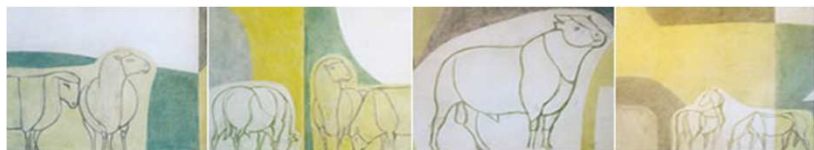
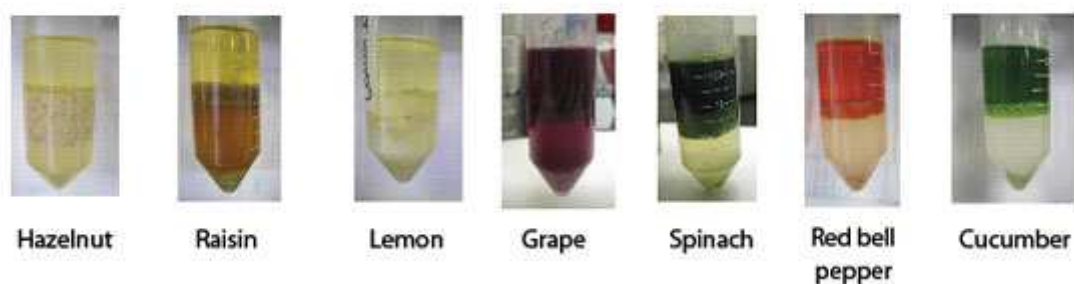


Il controllo pubblico nella sicurezza alimentare: punti di forza delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLTc

QUECHERS fase II

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

Il **QuEChERS fase II** anche detta (dispersive-SPE) consiste in una miscela di sali che permette la **purificazione** della fase organica dagli interferenti di matrice



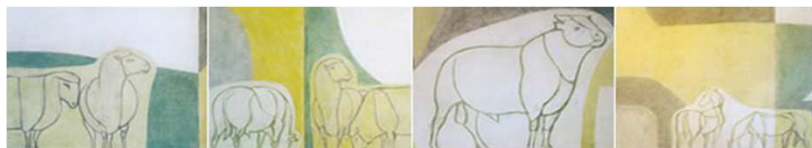
Il controllo pubblico nella sicurezza alimentare: punti di forza delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLTc

Modifiche al QUECHERS

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

La principale modifica che si applicano al **QuEChERS fase I** riguarda l'aggiunta di NaOH 5 N che serve a neutralizzare la componente acida dell'estratto per ottimizzare il recupero di analiti pH-dipendenti (per esempio estratti di Limoni, Mandarini, More)

Le principali modifiche che si applicano al **QuEChERS fase II** riguardano l'aggiunta di GCB che serve ad eliminare i pignenti (per esmpio More, Carciofi o vegetali a foglia verde) e l'aggiunta di fase C18 per eliminare le sostanze cerosi o gli oli (per esempio Mandorle, Arumi)

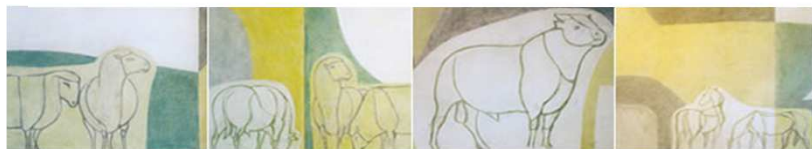


QUECHERS

Vegetable and fruits, cereals and food of animal origin

Commodity groups	Typical commodity categories	Typical representative commodities
1. High water content	Pome fruit	Apples, pears
	Stone fruit	Apricots, cherries, peaches,
	Other fruit	Bananas
	Alliums	Onions, leeks
	Fruiting vegetables/cucurbits	Tomatoes, peppers, cucumbers, melons
	Brassica vegetables	Cauliflowers, Brussels-sprouts, cabbages, broccoli
	Leafy vegetables and fresh herbs	Lettuce, spinach, basil
	Stem and stalk vegetables	Celery, asparagus
	Forage/fodder crops	Fresh alfalfa, fodder vetch, fresh sugar beets
	Fresh legume vegetables	Fresh peas with pods, peas, mange tout, broad beans, runner beans, French beans
2. High acid content and high water content ¹⁰	Leaves of root and tuber vegetables	Sugar beet and fodder beet tops
	Fresh Fungi	Champignons, chanterelles
	Root and tuber vegetables or feed	Sugar beet and fodder beet roots, carrots, potatoes, sweet potatoes
	Citrus fruit	Lemons, mandarins, tangerines, oranges
3. High sugar and low water content ¹¹	Small fruit and berries	Strawberries, blueberries, raspberries, black currants, red currants, white currants, grapes
	Fruit pomace	Citrus fruits
4a. High oil content and very low water content	Honey, dried fruit	Honey, raisins, dried apricots, dried plums, fruit jams
	Tree nuts	Walnuts, hazelnuts, chestnuts
	Oil seeds	Oilseed rape, sunflower, cotton-seed, soybeans, peanuts, sesame etc.
4b. High oil content and intermediate water content	Pastes of tree nuts and oil seeds	Peanut butter, tahina, hazelnut paste
	Oily fruits and products	Olives, avocados and pastes thereof
5. High starch and/or protein content and low water and fat content	Dry legume vegetables/pulses	Field beans, dried broad beans, dried haricot beans (yellow, white/navy, brown, speckled), lentils
	Cereal grain and products thereof	Wheat, rye, barley and oat grains; maize, rice wholemeal bread, white bread, crackers, breakfast cereals, pasta
	Cereal grain products thereof, incl. cereal based composite feed	

Le commodities sono classi di alimenti che, prendendo vita dei mercati di distribuzione, descrivono e dividono gli alimenti in base alle loro composizione



Il controllo pubblico nella sicurezza alimentare: punti di forza delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLTc

Le COMMODITIES

Commodity groups	Typical commodity categories	Typical representative commodities
6. "Difficult or unique commodities" 12		Hops Cocoa beans and products thereof, coffee, tea Spices
7. Meat (muscle) and Seafood	Red muscle White muscle Offal Fish	Beef, pork, lamb, game, horse Chicken, duck, turkey Liver, kidney Cod, haddock, salmon, trout
8. Milk and milk products	Milk Cheese Dairy products	Cow, goat and buffalo milk Cow and goat cheese Yogurt, cream
9. Eggs	Eggs	Chicken, duck, quail and goose eggs
10. Fat from food of animal origin	Fat from meat Milk fat ¹³	Kidney fat, lard Butter

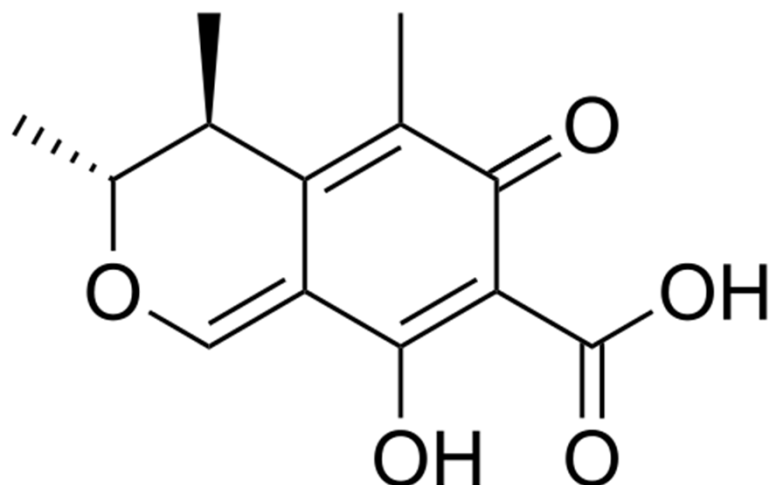
Feed

Commodity groups	Typical commodity categories	Typical representative commodities
1. High water content	Forage crops Brassica vegetables Silage Leaves of root and tuber vegetables	Grasses, alfalfa, clover, rape, fresh sugar beets Kale/cabbage Maize, clover, grasses Sugar beet leaves and tops
2. High acid content and high water content	Fruit pomace	Citrus
3. High sugar and low water content	-	
4a. High oil content and very low water content	Oil seeds cake or meal	Rape, sunflower, cotton-seed, soybeans, olives, etc.
4b. High oil content and intermediate water content	-	
5. High starch and/or protein content and low water and fat content	Cereal grain and products thereof, incl. cereal based composite feed Pulses Straw Hay	Wheat, rye, barley and oat grains; maize, rice Field bean, dried broad bean, dried haricot bean (yellow, white/navy, brown, speckled), lentils Wheat, rye, barley and oat Grasses
6. "Difficult or unique commodities"	-	



Il controllo pubblico nella sicurezza alimentare: punti di forza delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLTc

CITRININA



La **citrinina** è
una micotossina originariamente isolata nel 1931 da
Hetherington e Raistrick da
una coltura del
fungo *Penicillium citrinum*

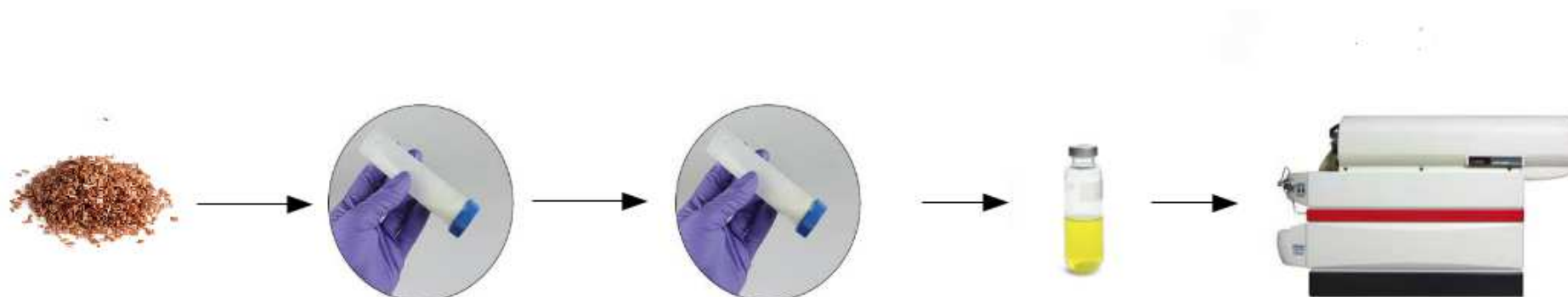
Il **Riso rosso fermentato** si ottiene facendo fermentare il comune riso (*Oryza sativa*) con il *Monascus purpureus* (lievito rosso). Questa **tecnica è molto antica**, in uso in Giappone già dal 300 avanti Cristo.

Il Riso rosso fermentato è oggi un ingrediente 100% naturale impiegato negli **integratori vegetali per la riduzione del Colesterolo**: contiene infatti una particolare molecola (la **Monacolina K**) che è una statina vegetale in grado di influire positivamente sui livelli dei grassi nel sangue.



Il controllo pubblico nella sicurezza alimentare: punti di forza delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLTc

CITRININA

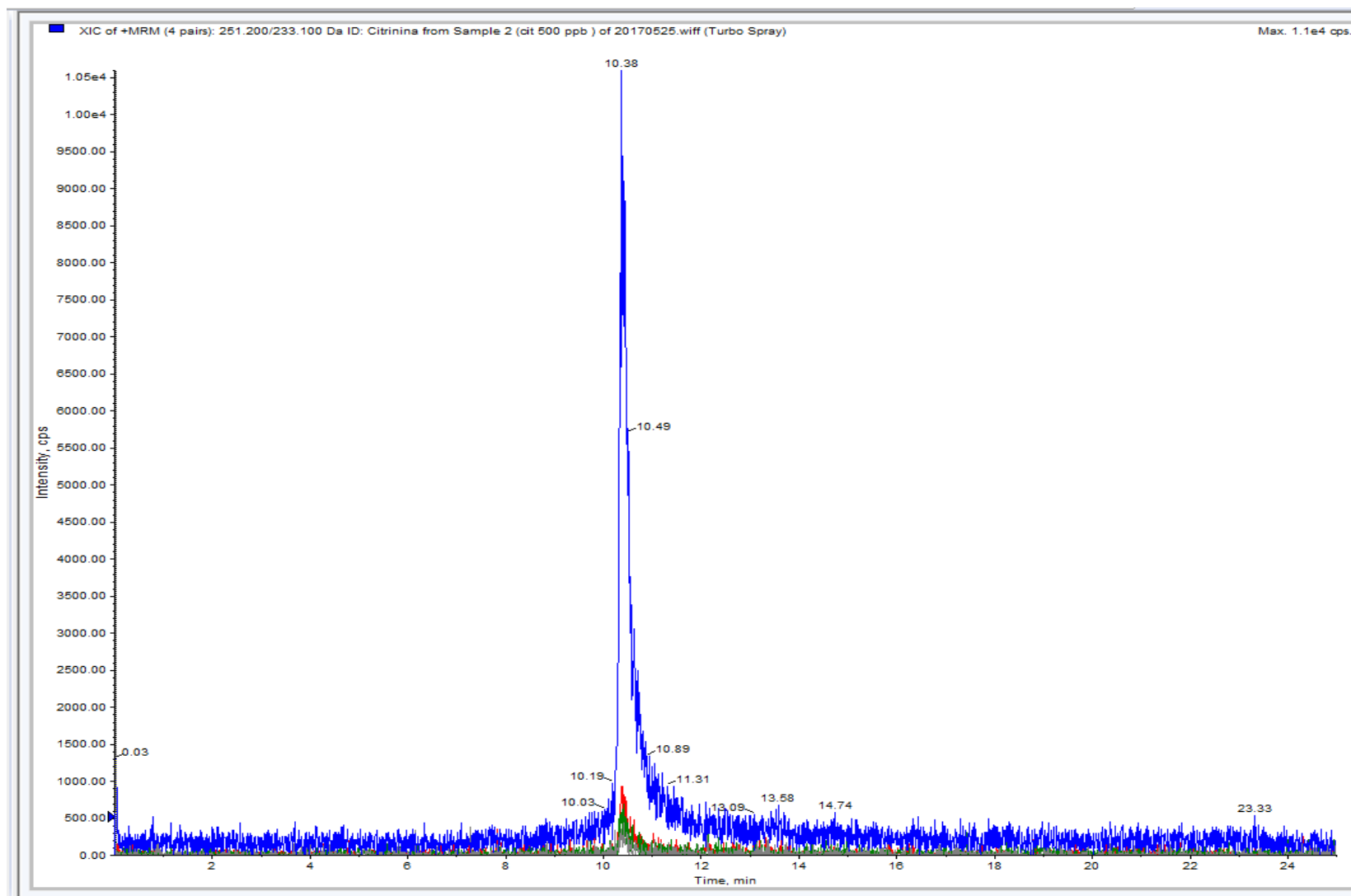


5 g di campione + 10 ml di acqua in agitazione per 30 minuti, aggiungere
10 ml di acetonitrile e agitare per 10 minuti
Quechers fase I e quechers fase II con aggiunta di fase C18
1 ml di surnatante a secco e ripreso con 0,1 ml di aceonitrile



Il controllo pubblico nella sicurezza alimentare: punti di forza
delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLTc

CITRININA



Il controllo pubblico nella sicurezza alimentare: punti di forza delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLTc

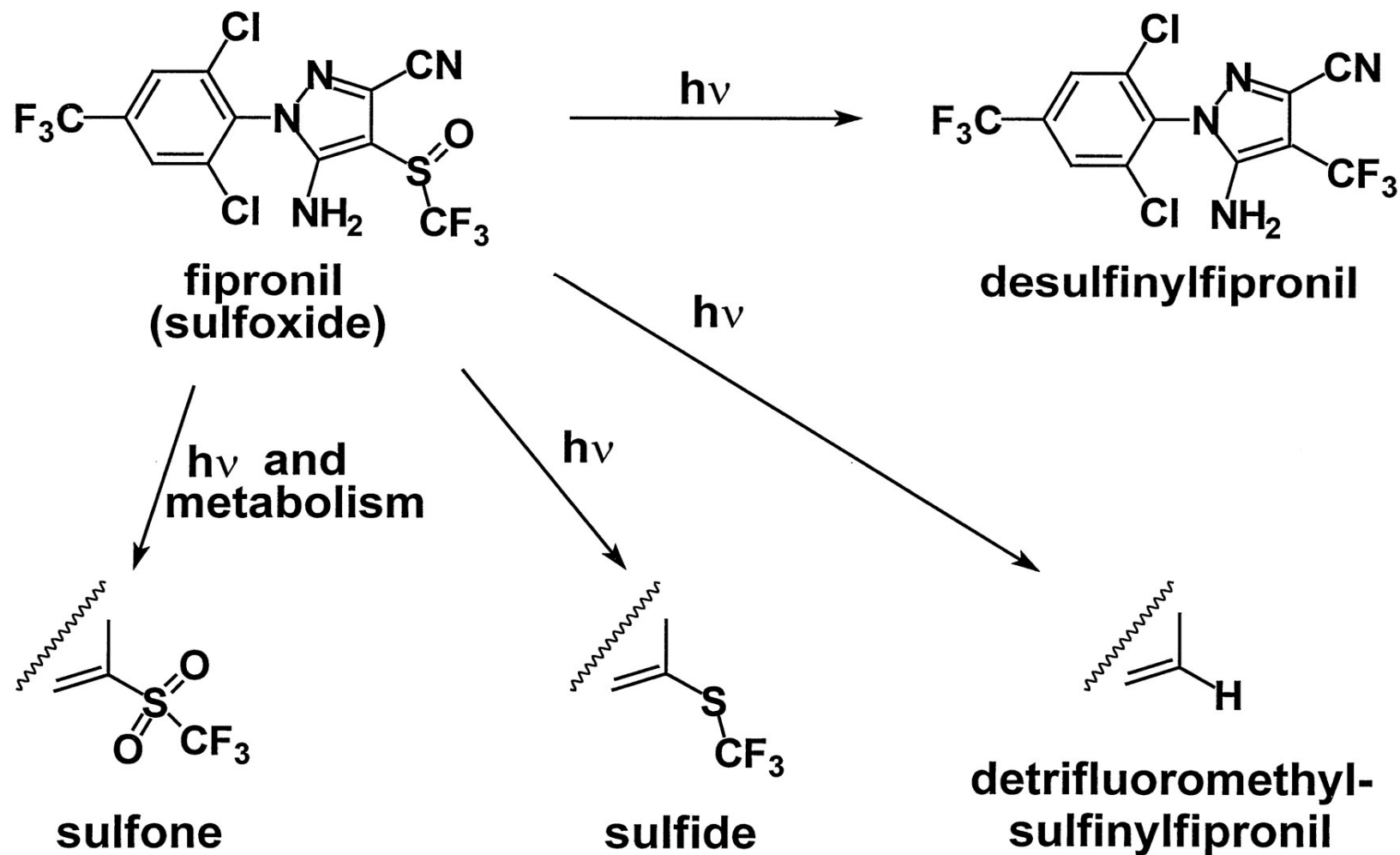
Il **fipronil**, appartiene alla classe dei pesticidi fenilpirazzolici conosciuto anche come **fluocianobenpirazolo**, è un insetticida ad ampio spettro che disturba l'attività del sistema nervoso centrale dell'insetto impedendo il passaggio degli ioni cloruro attraverso il recettore del GABA. Ciò causa la ipereccitazione dei nervi e dei muscoli degli insetti contaminati.

È un pesticida non permesso il cui LMR è stato fissato a 0,005 mg/Kg di fipronil più metabolita sulfone espresso come fipronil



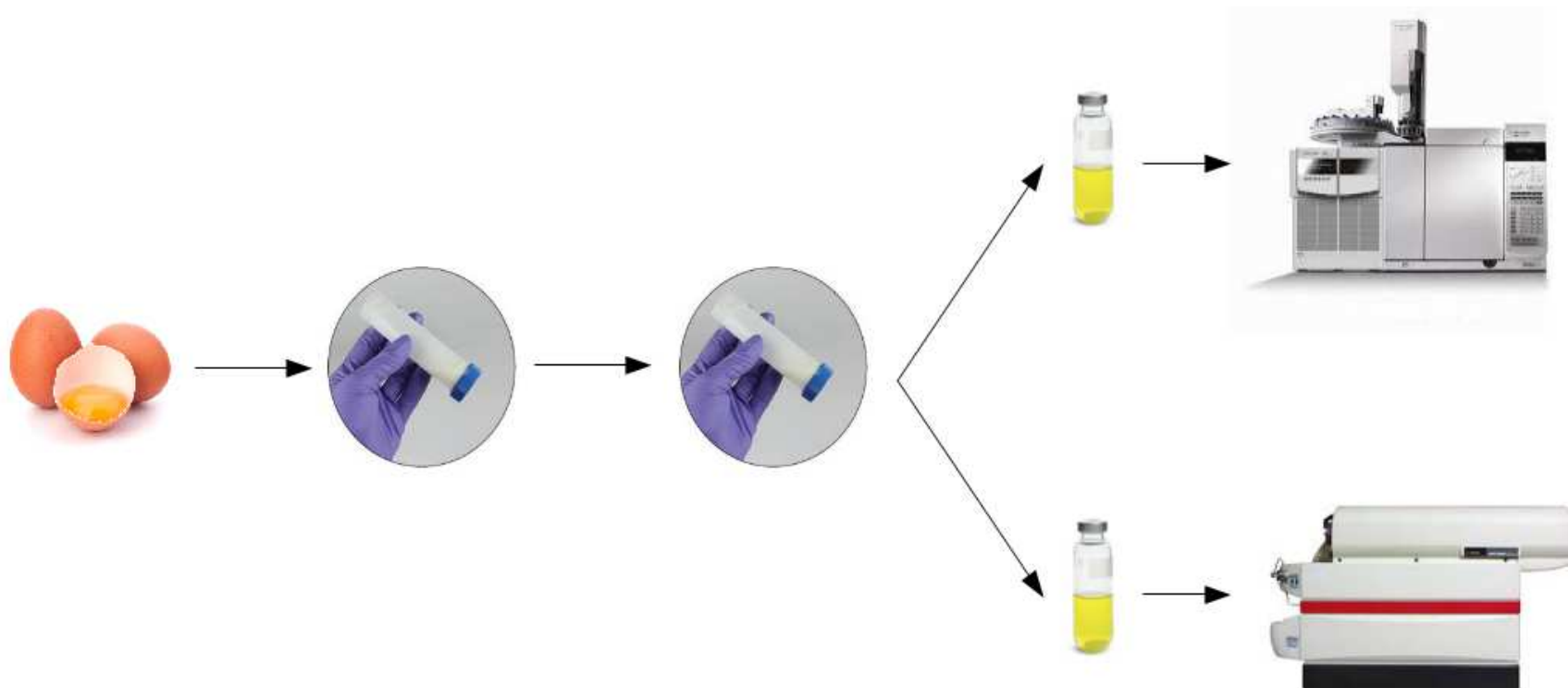
Il controllo pubblico nella sicurezza alimentare: punti di forza delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLTc

FIPRONIL



Il controllo pubblico nella sicurezza alimentare: punti di forza delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLTc

FIPRONIL

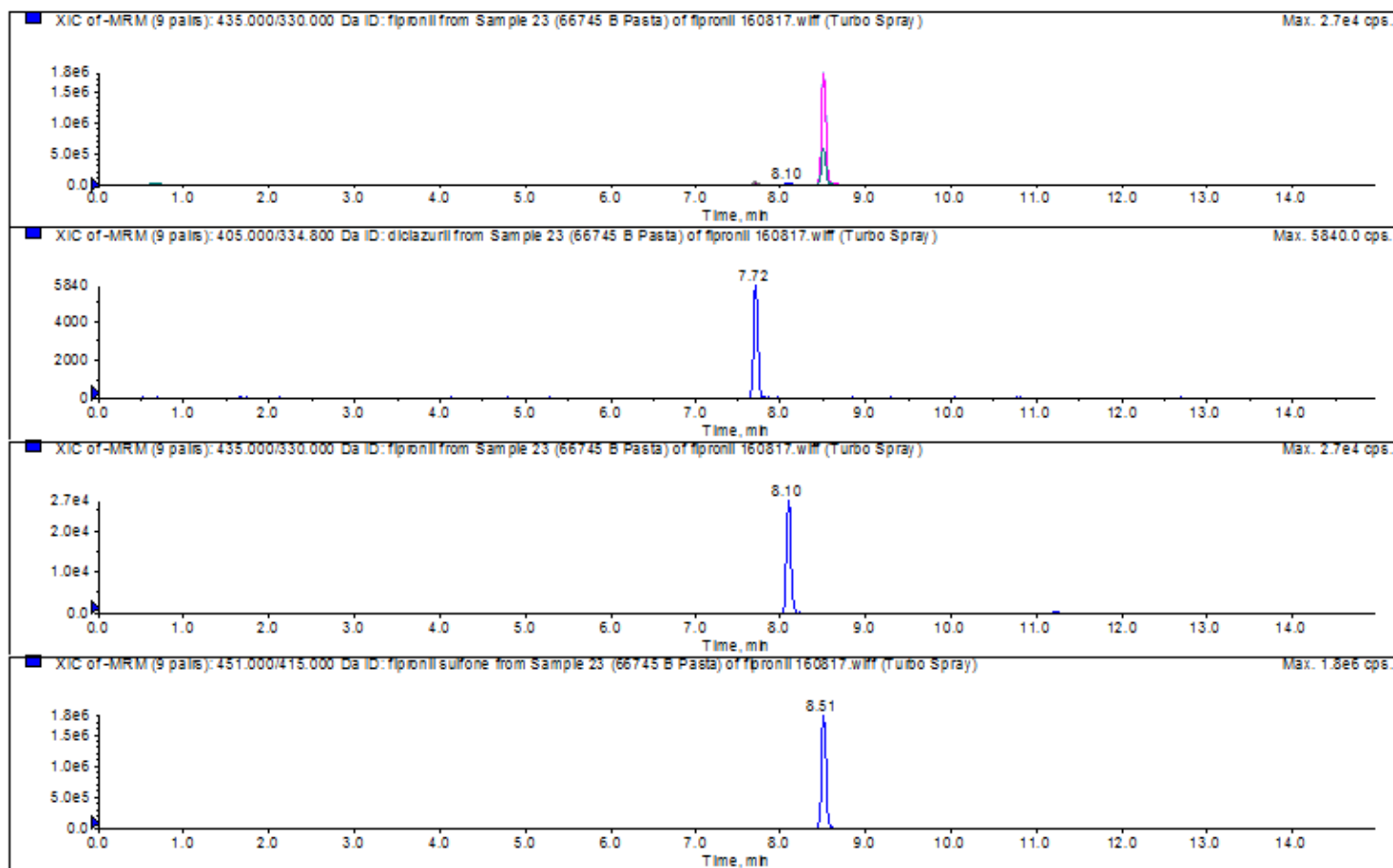


5 g di campione + 10 ml di acqua in agitazione per 30 minuti, aggiungere
 10 ml di acetonitrile e agitare per 10 minuti
 Quechers fase I e quechers fase II
 1 ml di surnatante a secco e ripreso con 0,1 ml di isotano per GC-MSMS
 0,2 ml di estratto purificato (QII) per LC-MSMS



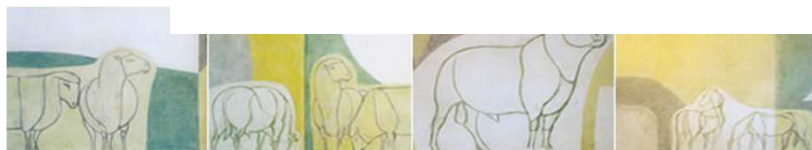
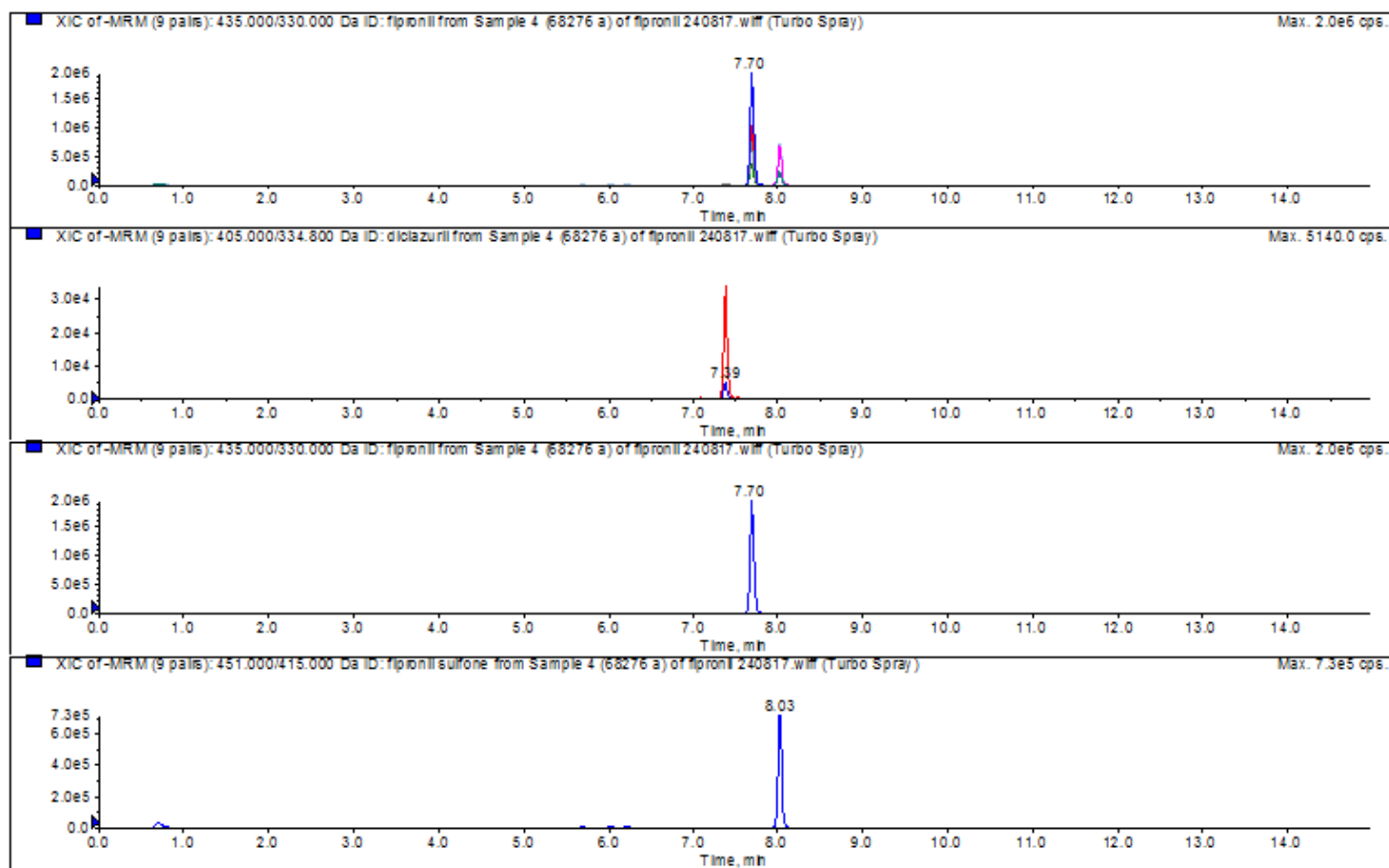
Il controllo pubblico nella sicurezza alimentare: punti di forza
 delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLTc

FIPRONIL UOVA



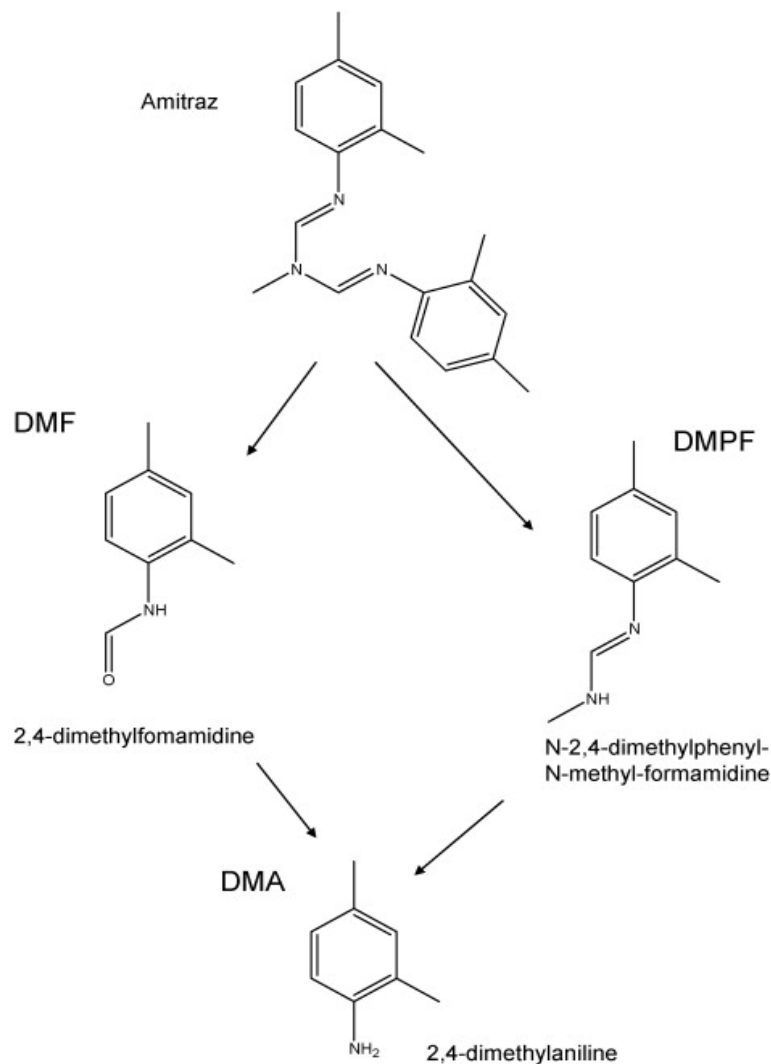
Il controllo pubblico nella sicurezza alimentare: punti di forza delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLTc

FIPRONIL ACQUA



Il controllo pubblico nella sicurezza alimentare: punti di forza delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLTc

AMITRAZ



Sono stati aggiunti come analiti da ricercare sulle stesse matrici anche l'amitraz e i suoi principali metaboliti

Il metodo di estrazione è rimasto invariato



Il controllo pubblico nella sicurezza alimentare: punti di forza delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLTc

DIREZIONE OPERATIVA CHIMICA
POS CHI 060 INT rev. 5 del 21/01/2017
PESTICIDI (GC-MS) (GC-MS-MS)

PG-QUA 00511 a rev. 23

pag. 1 di 72



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aluigi

PESTICIDI (GC-MS) (GC-MS-MS)

Redatto:

Katia Russo

Verificato Responsabile Struttura Semplice:

Bruno Neri

Verificato RQ:
Silvana Guzzo

Qualità Qualità Qualità Qualità Qualità Qualità

Approvato Responsabile di Struttura Complessa:

Bruno Neri

Tre commodities

- Alto contenuto acquoso
- Alto contenuto proteico , basso acquoso
- Alto contenuto di oli

211 Molecole (in GC-MSMS e LC-MSMS)



Il controllo pubblico nella sicurezza alimentare: punti di forza delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLTc

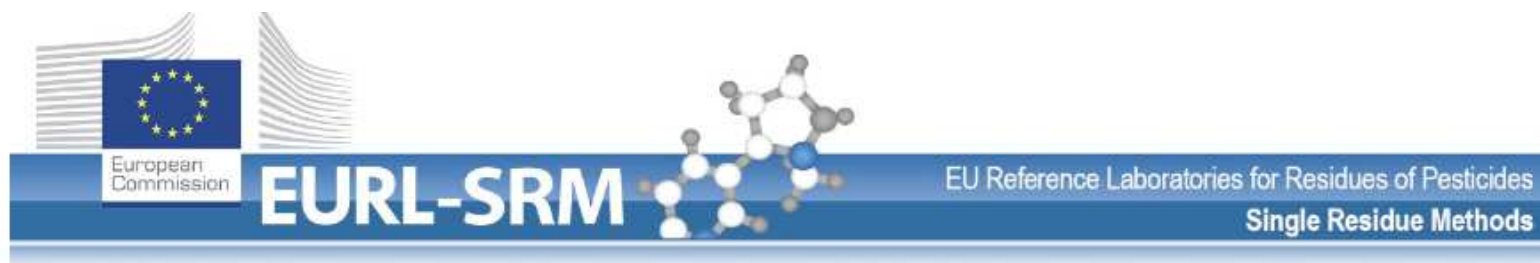


- 1) È possibile riunificare tutte le metodiche per la determinazione dei pesticidi in una sola
- 2) Diminuzione delle problematiche legate alla procedura analitica (estrazione e purificazione)
- 3) Aumento delle competenze strumentali e della flessibilità strumentale



CONCLUSIONI

- Sviluppo di un metodo «gemello» alla POS CHI 060 per la determinazione dei pesticidi negli alimenti di origine animale
- Approccio ai metodi singolo residuo per i pesticidi non determinabili con il metodo Quechers



Quick Method for the Analysis of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin via LC-MS/MS involving Simultaneous Extraction with Methanol (QuPPE-Method)

Version 9.3 (August 2017, Document History, see page 73)

Authors: M. Anastassiades; D. I. Kolberg; A. Benkenstein; E. Eichhorn; S. Zechmann;
D. Mack; C. Wildgrube; I. Sigalov; D. Dörk; A. Barth



Il controllo pubblico nella sicurezza alimentare: punti di forza
delle attività svolte presso i Laboratori dell'IZSLTc

Grazie a tutti!

