

Ricerca Corrente LT 02/16 RC

**RICERCA E SVILUPPO DI METODOLOGIE
REALIZZATE CON CRITERI D'INDAGINE
INNOVATIVI PER L'ANALISI DI FITOSANITARI
SU MATRICI ORTOFRUTTICOLE E RACCOLTA
D'INFORMAZIONI SULLA LORO DIFFUSIONE
IN FUNZIONE DELL'ALIMENTO CONSIDERATO**

Katia Russo – 24 Giugno 2021



SVILUPPO E VALIDAZIONE DI METODI SINGOLO RESIDUO IN LC-MS/MS DI ULTIMA GENERAZIONE

Il laboratorio di Contaminanti Agricoli ha sviluppato e validato diversi metodi di analisi di singoli residui di pesticidi, quali:

Glifosato

Mepiquat
Clomequat

BAC (C-8, C-10, C-12, C-14, C-16, C-18)

DACC (C-8, C-10, C-12, C-14)

2,4-D, MCPA, MCPP-P
Pesticidi Fenossiacidi
Nicotina

Fluroxypyr





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

PREMESSA



- ❖ L'analisi per la ricerca di pesticidi in campioni ortofrutticoli è un'analisi che prevede la ricerca di centinaia di analiti.
- ❖ - Se pensiamo a quanti principi attivi vengono utilizzati o sono stati utilizzati nel corso degli ultimi decenni in agricoltura arriviamo a più di **1000 molecole**.
- ❖ - Nel corso degli anni sono state perfezionate metodiche multiresiduali per poter analizzare i campioni in modo semplice, veloce, economico, sicuro e robusto.....da qui il metodo

Quechers (acronimo di Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe) per ricercare centinaia di molecole contemporaneamente.

- ❖ - Ma **non tutte le molecole** previste dal Piano Comunitario di Controllo Fitosanitari possono essere analizzate con metodo multiresiduale.
- ❖ - Alcune molecole per le loro caratteristiche chimico-fisiche hanno bisogno di metodi dedicati.....i **Metodi Monoresiduo**.



Katia Russo – 24 Giugno 2021



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

PREMESSA

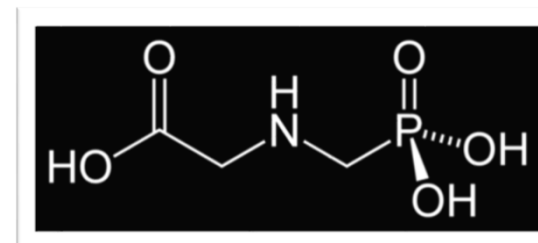
- Per far questo però c'è bisogno soprattutto di strumenti molto sensibili, strumenti di ultima generazione.

Grazie a questa ricerca abbiamo potuto comprare un
**cromatografo liquido con spettrometria di massa/massa triplo
quadrupolo (LC-MS/MS)**



Katia Russo – 24 Giugno 2021

Glifosato



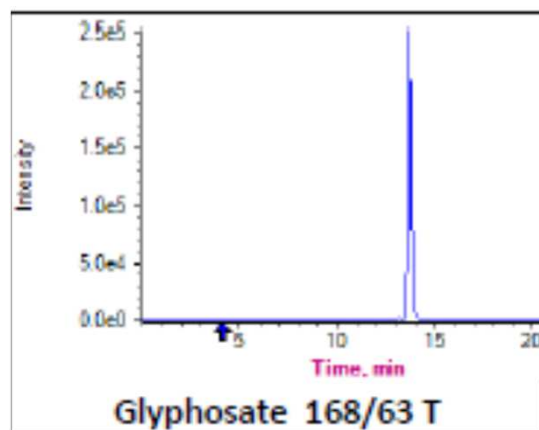
- ✓ E' uno degli erbicidi più diffusi in campo agricolo
- ✓ Questo erbicida viene utilizzato con successo per eliminare le piante infestanti, spesso molto persistenti
- ✓ L'utilizzo del glifosato è cresciuto negli anni con la **diffusione di coltivazioni di piante Ogm** (organismi geneticamente modificati). L'introduzione di **specie vegetali resistenti al glifosato** (soia, mais e cotone) ha permesso ai coltivatori di utilizzare l'erbicida su queste piante senza danneggiare i raccolti.
- ✓ Fino a non molto tempo fa l'analisi chimica di questa molecola ha comportato **difficoltà di tipo** soprattutto **strumentale** dovute alla sua elevata polarità.



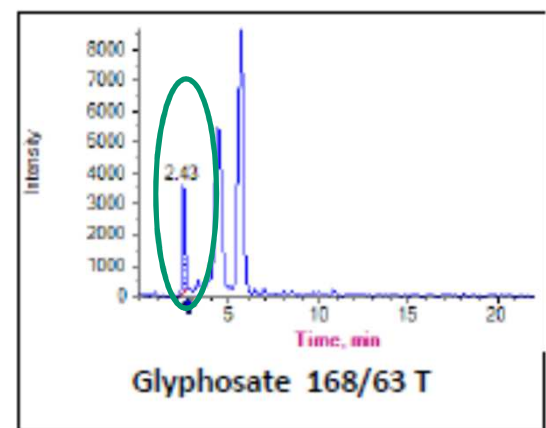
METODO STORICO

Fino a qualche anno fa l'analisi del **Glifosato** più comune, per chi eseguiva controllo ufficiale di pesticidi su alimenti ortofrutticoli, prevedeva una preparazione chiamata **QuePP** + metodi strumentali un po' **laboriosi**:

- L'utilizzo di una colonna cromatografica **Hypercarb** per analisi in cromatografia liquida (LC-MS/MS) con siti attivi che per tale ricerca andavano disattivati
- Disattivazione **iniettando 30-50 volte** un estratto di spinaci (che contiene clorofille e antocianine)



Colonna Hypercarb non disattivata



Colonna Hypercarb disattivata



METODO MESSO A PUNTO DAL NOSTRO LABORATORIO

Preparazione (QuEPP)

- Pesare circa 5 g di campione omogeneizzato
- Aggiungere 10 ml di acqua tridistillata e 100 µl di Glifosate 1,2-¹³C₂ 15N ad una concentrazione di 20 µg/ml (utilizzato come standard interno).
- Agitare per 10 min.
- Aggiungere 10 ml di metanolo acidificato con 1% di acido formico.
- Agitare per 10 min.
- Centrifugare a 4000 rpm per 5 min.
- Filtrare 2 ml di surnatante con filtro 0.45 µm.
- Iniettare in LC-MS/MS.

Preparazione dei livelli di validazione

La matrice riso è stata fortificata con aggiunte di Glifosate per raggiungere i seguenti livelli:

Livello LOQ (0.100 mg/kg): 8 ripetizioni

Livello 1 (0.500 mg/kg): 8 ripetizioni

Limiti di legge nei cereali (5-10 mg/kg)



Analisi Cromatografica

Condizioni per l'analisi in cromatografia liquida:

LC-QQQ:

Eluenti: A) 50 mM Ammonio Formiato (pH 2.9) in acqua : acetonitrile = 6 : 4
B) Acetonitrile

Condizioni cromatografiche:

Flusso: 0.5 ml/min

Volume iniettato: 30 µl

Colonna: **Acclaim Trinity Q1 Thermo Scientific**
(100 mm x 3 mm; 3 µm)

Gradiente cromatografico:

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	100	0
7	100	0
7.1	18.2	81.8
10	18.2	81.8
10.1	100	0
13	100	0

Acquisizione MRM

Ionizzazione: ESI negativa

Voltaggio capillare: -4500V

Orifizio: CUR 30

Temperatura TIS: 350 °C

GS1: 20

GS2: 20

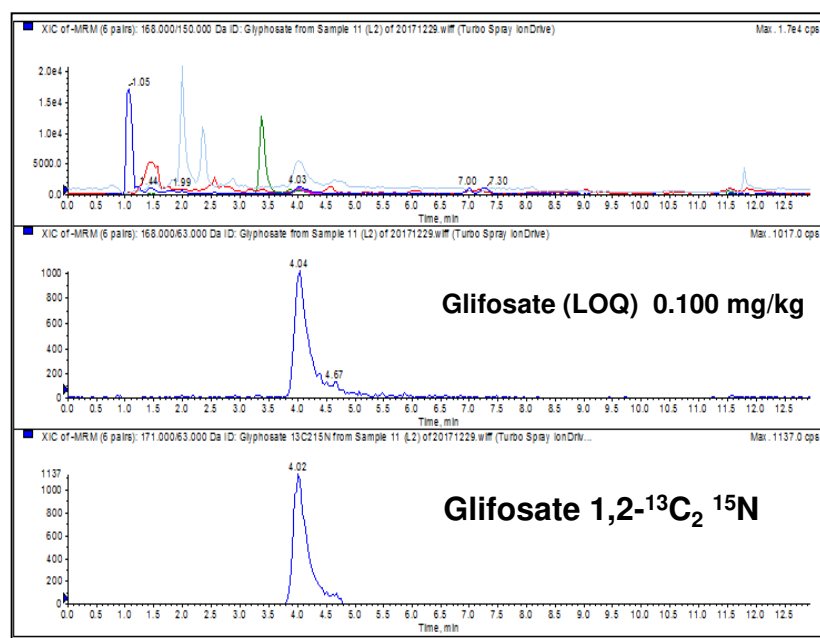
			1° Transizione		2° Transizione		3° Transizione	
Nome	MW	Ionizzazione		Coll		Coll		Coll
Glifosate	169	ESI-	168>63	-15	168>150	-30	168>124	-15
Glifosate 1,2- ¹³ C ₂ ¹⁵ N	172	ESI-	171>63	-15	171>153	-15		



RISULTATI

La validazione del metodo è stata eseguita seguendo quanto descritto nel documento SANTE/11813/2017

Pesticida	Livelli mg/kg	LOQ	Recupero			Incertezza di misura relativa	Limite di ripetibilità mg/kg
			%	CV%	n		
Glifosato	0.100	0.100	102	5.09	8	0.138	0.017
	0.500		103	2.92	8	0.125	0.050

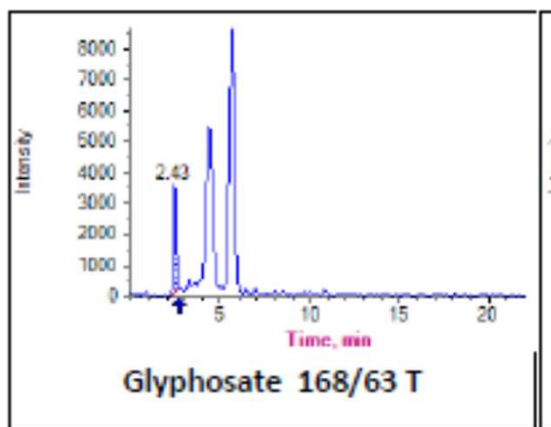




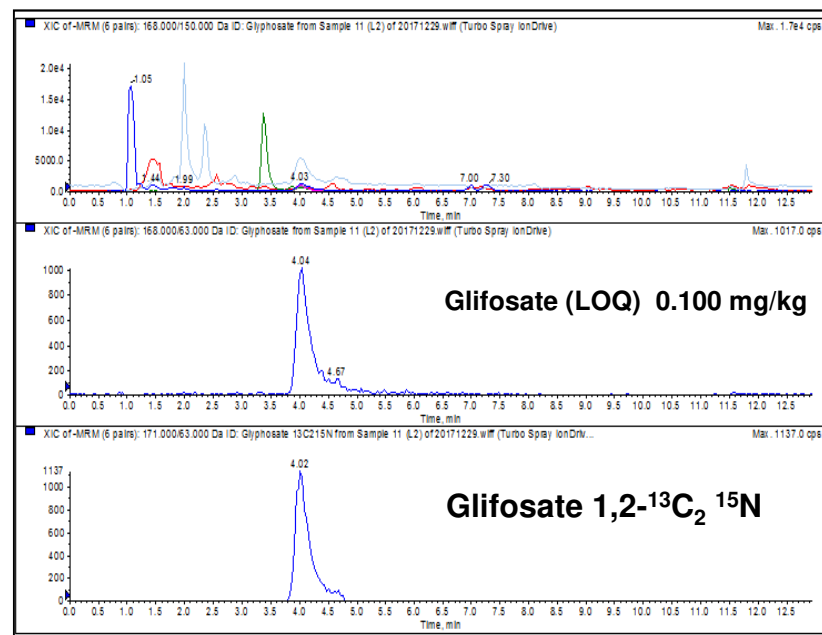
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

GLIFOSATE

CONFRONTO



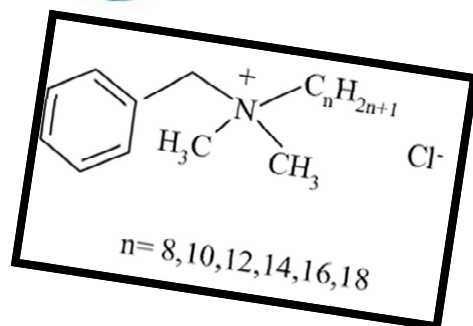
Vecchio Metodo



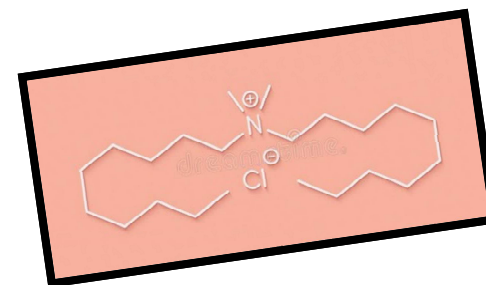
Nostro Metodo



Katia Russo – 24 Giugno 2021



BACs e DACCs



- Il cloruro di benzalconio (BAC) e il cloruro di didecildimetilammonio (DDAC) sono molecole che hanno proprietà tensioattive molto interessanti, motivo per cui sono spesso utilizzate per la pulizia nell'industria alimentare.
- Le loro eccellenti proprietà disinfettanti gli danno anche un campo d'impiego ancora più ampio, in particolare nel settore alimentare e della produzione lattiero-casearia, anche se la molecola BAC non è autorizzata per l'uso nell'industria alimentare.
- I composti di ammonio quaternario possono anche essere utilizzate nel settore agricolo, in particolare sulle colture o per la disinfezione dei locali.





BACs e DACCs

- I metodi dai quali siamo partiti, forniti dal Laboratorio di Riferimento Europeo, prevedono l'utilizzo di acqua sia nella preparazione del campione che nella preparazione delle fasi mobili per l'analisi cromatografica

“The sensitivity of detection is good so that determinations below 0.01 mg/kg are principally possible. It should be considered, however, that the compounds are ubiquitous and have the tendency to strongly interact with surfaces and thus the potential for cross-contaminations. Background levels mostly concern BAC-C12 and BAC-C14, which are typically the predominant components in formulations. Thus LOQs of 0.02 mg/kg are more realistic”

- Il nostro obiettivo è stato quello di testare e validare un metodo che prevedesse la completa eliminazione dell'acqua dalla preparazione del campione e nelle fasi mobili della corsa cromatografica, compresa la fase di lavaggio interno ed esterno della siringa. E' noto infatti che è impossibile trovare un'acqua totalmente priva di questi contaminanti poiché utilizzati come detergenti. Avendo eliminato l'acqua dall'intero procedimento, abbiamo potuto lavorare con campioni bianchi privi di contaminazioni da BACs o DDACs (bergamotto non trattato) e raggiungere livelli bassi di limite di quantificazione per ogni analita.





METODO MESSO A PUNTO DAL NOSTRO LABORATORIO

Preparazione

- Pesare circa 10 g di campione omogeneizzato.
- Aggiungere 10 ml di acetonitrile
- Agitare per 10 min.
- Aggiungere 4 g di MgSO₄, 1 g di NaCl, 1 g di Trisodio Citrato Diidrato e 0.5 g di Disodio Idrogenocitrato Sesquidrato.
- Agitare per 10 min.
- Centrifugare a 4000 rpm per 10 min.
- Prelevare un'aliquota di surnatante e porre in vial.
- Iniettare in LC-MS/MS.

Preparazione del livello di fortificazione

La matrice limone è stata fortificata con aggiunte di ogni singolo DDAC (C-8, C-10, C-12, C-14) per raggiungere i seguenti livelli:

Livello LOQ (0.030 mg/kg): 8 ripetizioni

Livello 1 (0.300 mg/kg): 8 ripetizioni

e di ogni singolo BAC (C-8, C-10, C-12, C-14, C-16, C-18) per raggiungere i seguenti livelli:

Livello LOQ (0.010 mg/kg): 8 ripetizioni

Livello 1 (0.100 mg/kg): 8 ripetizioni





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

BAC e DACC

Analisi Cromatografica

Condizioni per l'analisi in cromatografia liquida:

LC-QQQ:

Eluenti: A) 0.5 mM Ammonio Formiato in acetonitrile, 0.01% acido formico
B) 5 mM Ammonio Formiato in metanolo, 0.01% acido formico

Condizioni cromatografiche:

Flusso: 0.4 ml/min

Volume iniettato: 1 μ l

Colonna: Kinetex Biphenyl 100 Å (2.6 μ m, 100 x 2.1 mm ID)

Condizioni spettrometro di massa

Acquisizione MRM

Ionizzazione: ESI positiva

Voltaggio capillare: 4500V

Orifizio: CUR 20

Temperatura TIS: 400 °C

GS1: 40

GS2: 40

Gradiente cromatografico:

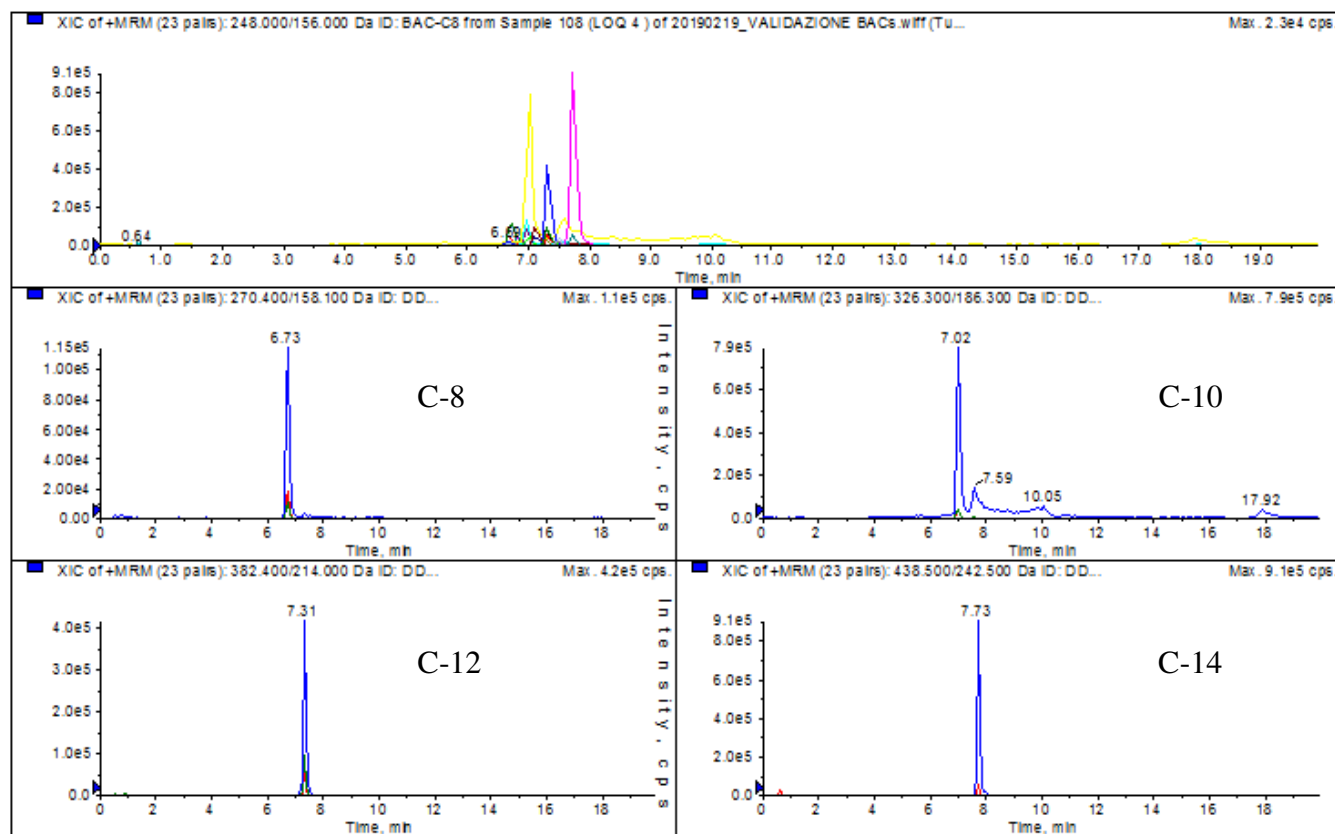
Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	95	5
2	95	5
8	90	10
12	10	90
15	10	90
15.1	95	5
20	95	5

Nome	MW	Ionizzazione	1° Transizione		2° Transizione		3° Transizione	
				Coll		Coll		Coll
DDAC C-8	270.5	ESI+	270>58	55	270>46	55	270>158	40
DDAC C-10	326.6	ESI+	326>186	40	326>184	45	326>58	60
DDAC C-12	382.7	ESI+	382>214	50	382>58	85	382>43	75
DDAC C-14	438.8	ESI+	438>242	50	438>240	50		
BAC C-8	283.9	ESI+	248>91	25	248>156	30		
BAC C-10	311.9	ESI+	276>91	25	276>184	30		
BAC C-12	340.0	ESI+	304>91	50	304>212	25		
BAC C-14	368.1	ESI+	332>91	47	332>240	40		
BAC C-16	396.1	ESI+	360>91	47	360>268	47		
BAC C-18	406.2	ESI+	388>91	47	338>296	47		

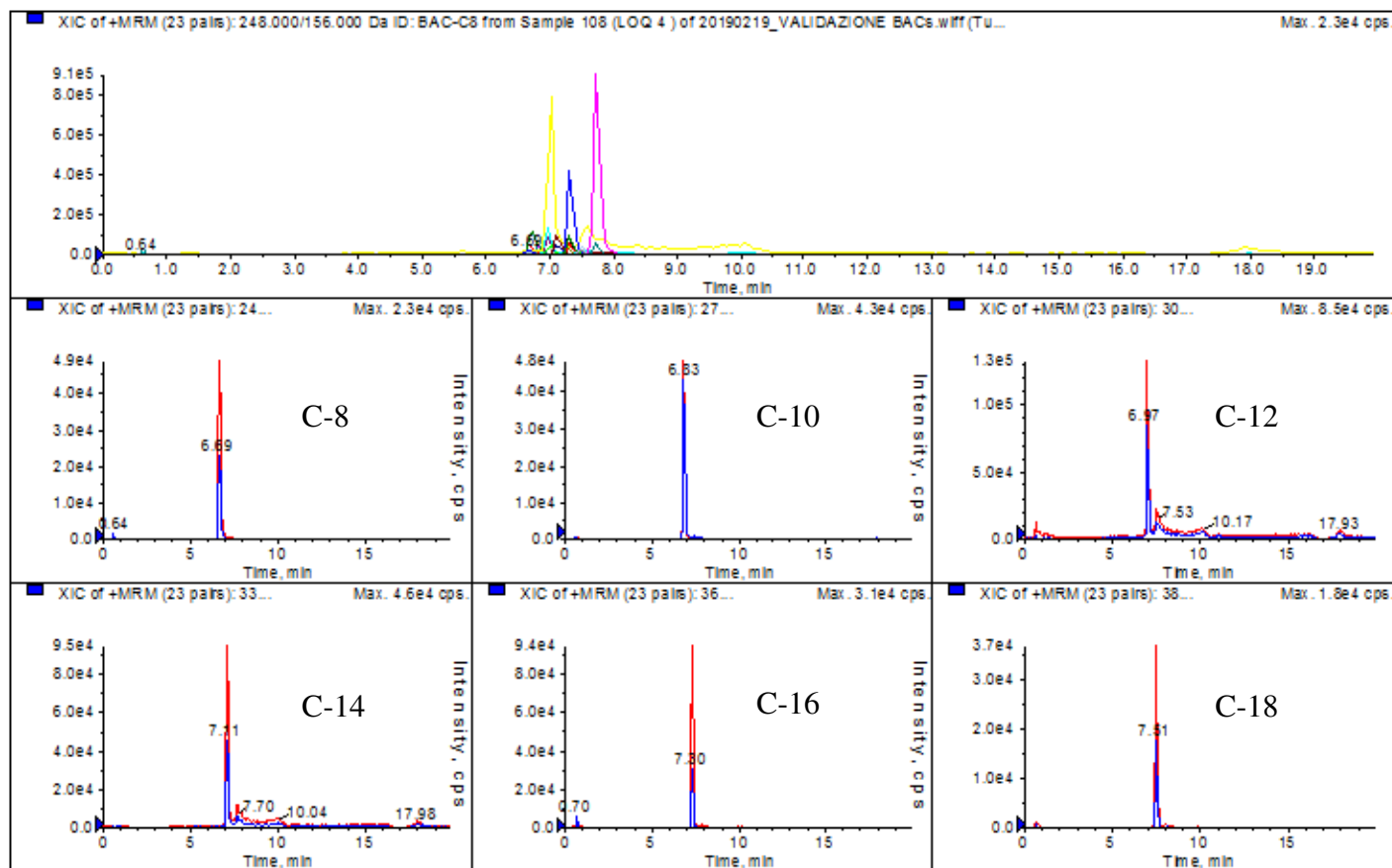


Katia Russo – 24 Giugno 2021

RISULTATI



RISULTATI

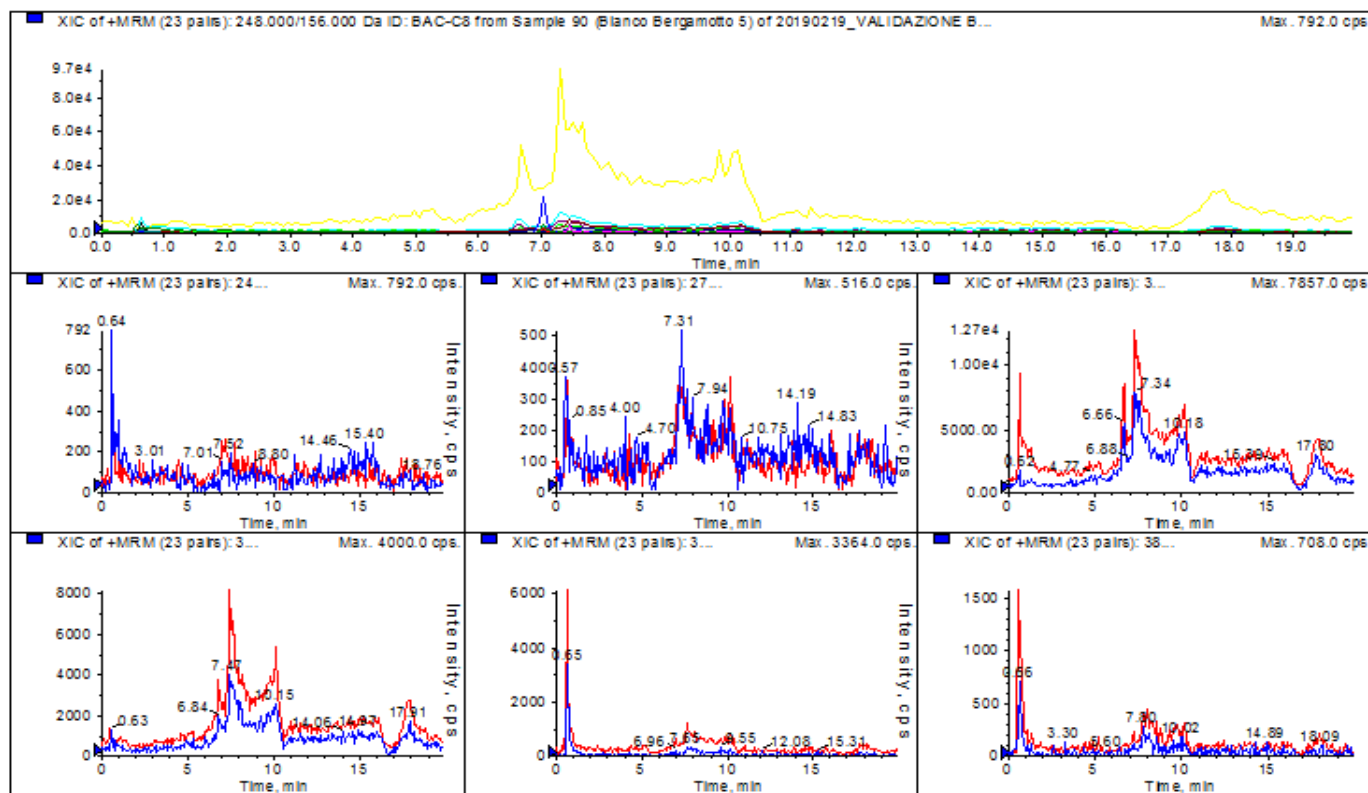




Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

BAC

RISULTATI PER IL BIANCO



Katia Russo – 24 Giugno 2021



PERFORMANCE DEI METODI E DEL LABORATORIO

Farina di grano - 2018		
	Media	Z-Score
Glifosate	0,729	-0,1
Cloromequat	0,235	0,0
Mepiquat	0,153	1,7

Farina di grano - 2019		
	Media	Z-Score
Glifosate	0,764	0,7
Cloromequat	0,233	-0,6
Mepiquat	0,219	1,3

Farina di grano - 2020		
	Media	Z-Score
Glifosate	0,633	0,7
Cloromequat	0,267	0,1
Mepiquat	0,218	1,3

Farina di soia – 2018 – SRM13		
	Media	Z-Score
Glifosate	0,962	0,3
Mepiquat	0,128	0,1

Farina di riso – 2020 – SRM 15		
	Media	Z-Score
Glifosate	0,183	-0,4
Cloromequat	0,070	-1,0
2,4-D	0,050	-0,1
Carbofuran (sum)	0,105	0,0

Semi di Sesamo - 2021		
	Media	Z-Score
Glifosate	0,539	0,2
Nicotina	0,230	-0,4





IMPATTO E TRASFERIBILITÀ OPERATIVA

- I risultati di questo progetto, sono stati presentati al Workshop dei Laboratori Nazionali di Riferimento AO/CF/FV/SRM e Laboratori Ufficiali per l'analisi di residui di antiparassitari in alimenti – Istituto Superiore di Sanità - 1 Marzo 2019
- **L'intento è stato quello di trasferire ad altri laboratori ufficiali i metodi messi a punto per permettere l'estensione delle analisi ad altre regioni.**
- Inoltre in virtù dei risultati ottenuti l'ARPA Campania ha affidato a noi, dal 2019, il proprio piano comunitario di ricerca fitosanitari e abbiamo potuto supportare il lavoro di ASL, Agenzia delle Dogane di Roma, NAS e USMAF di varie regioni.
- **La richiesta più ricorrente ha riguardato la ricerca di Glifosate**
- Delle 250 analisi eseguite in questi due anni e mezzo solo in 13 campioni è stata riscontrata la presenza di Glifosate in un range compreso tra **0,1 e 0,9 mg/kg**.
- **I valori più alti sono stati rilevati in Farine di Grano che hanno un Limite Massimo Consentito di Glifosate pari a **10 mg/kg**.**



CONCLUSIONI

Utilizzando un LC-MS/MS di ultima generazione....

- **GLIFOSATE:** Abbiamo testato e validato un metodo che prevedeva l'utilizzo di una colonna Acclaim Trinity Q1. Questa colonna rispetto alla classica Hypercarb, che generalmente viene utilizzata per l'analisi del glifosate, non prevede alcun tipo di pretrattamento. Inoltre nonostante il Glifosate sia stato validato al LOQ di 0,1 mg/kg il rapporto S/N ci indica che è possibile scendere di almeno 5 volte portando il LOQ a 0.020 mg/kg.
- **BACs e DDACs:** eliminando completamente l'acqua dalla preparazione del campione e nelle fasi mobili della corsa cromatografica compresa la fase di lavaggio interno ed esterno della siringa, non abbiamo contaminazioni da BACs o DDACs nel nostro bianco (bergamotto non trattato) al LOQ di 0,01 mg/kg
- **FLUROXYPYR:** Abbiamo ottenuto un'alta sensibilità a concentrazioni di 0,01 mg/kg (LOQ) per una molecola che notoriamente mostra un segnale non ottimale in LC-MS/MS

ESI(-)	No Data	[M-H] ⁻	253>195 255>197 255>235
ESI(+)	+	[M+H] ⁺	255>209 255>181



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Grazie a:

Dott. Dario Lucchetti

Dott.ssa Daniela Triolone

Dott. Paolo Di Giustino

Dott.ssa Daniela Delfino

Dott.ssa Marta Mancuso

Dott. Bruno Neri



A VOI TUTTI
**GRAZIE PER
L'ATTENZIONE**



Katia Russo – 24 Giugno 2021