

**4° CONVEGNO NAZIONALE  
FITOFARMACI E AMBIENTE  
Ambiente, Alimenti, Salute**

**Paolo Branca**

**A.R.P.A. - Agenzia Regionale Protezione Ambientale del Piemonte  
Polo Chimico Regionale Alimenti – Via Nizza 24 – La Loggia (To)**

**Approccio semplificato per la validazione del metodo  
multiresiduo: applicazione al metodo per la ricerca dei  
residui di fitofarmaci in prodotti di origine vegetale**

**Napoli 14-15 maggio 2003**

## Cosa si intende per validazione

La conferma, sostenuta da evidenze oggettive, che i requisiti relativi ad una specifica utilizzazione o applicazione prevista sono stati soddisfatti”.

Il processo di validazione ha quindi l’obiettivo di dimostrare la validità di un metodo, mediante la valutazione di tutti i parametri utili a tale scopo (caratteristiche tecniche, applicabilità, performance analitiche, ecc.).

I metodi analitici vengono solitamente valutati sulla base di tre caratteristiche

- affidabilità
- applicabilità
- praticabilità

Quando vi sia la possibilità di scegliere diversi metodi, l’applicabilità di una determinata prova su un ampio spettro di matrici e la praticabilità del metodo all’interno del laboratorio, possono diventare preponderanti sulle caratteristiche di affidabilità del metodo.

## Procedure per la validazione di un metodo interno

- **Chiarire gli obiettivi e i risultati attesi in modo da individuare i parametri da valutare ai fini della validazione**

**Un metodo interno risulta pertanto come il compendio di una progettazione di cui la validazione costituisce il passaggio finale**

### Caratteristiche degli analisti

**possesso di:**

- **ottima padronanza della tecnica analitica**
- **elevata esperienza professionale**
- **conoscenza delle tecniche statistiche coinvolte nella determinazione dei parametri**

# Parametri tecnici di validazione

**Le grandezze caratteristiche che definiscono le prestazioni di un metodo analitico sono:**

- **Selettività;**
- **Limite di rilevabilità;**
- **Limite di quantificazione;**
- **Intervallo di lavoro ed intervallo di linearità;**
- **Precisione (ripetibilità e riproducibilità);**
- **Accuratezza;**
- **Sensibilità;**
- **Robustezza;**
- **Recupero;**
- **Incertezza;**

**Spetta al chimico individuare le grandezze significative per il metodo analitico che si accinge a validare**

## Quando validare un metodo analitico

La validazione è una fase nella quale, a monte dell'applicazione del metodo, si prendono in considerazione tutti i requisiti che devono essere soddisfatti.

Le caratteristiche devono essere definite in termini di

**parametri tecnici:** campo di applicazione, campo di prova, accuratezza, limite di quantificazione, precisione...

**parametri economici:** disponibilità di adeguate risorse umane e strumentali, costi, tempi, ....

Con queste considerazioni si valuta quali sono i parametri da valutare per verificare se le caratteristiche del metodo soddisfano i requisiti.

## Schema operativo

### **INDIVIDUAZIONE DEL METODO:**

- 1. Verifica della professionalità degli operatori coinvolti nonché le loro attitudini nei confronti delle tecniche analitiche interessate**
- 2. Verificare la disponibilità l'adeguatezza della attrezzatura**
- 3. Verificare se l'intervallo di concentrazione atteso sia compreso in quello del campo di misura del metodo.**

**Parametri tecnici che descrivono un metodo multiresiduo.**

### **Selettività**

Tutti i metodi **analitici multiresiduo** prevedono una misura che è preceduta da un'**estrazione** preliminare e da una **purificazione**.

E' necessario stabilire che il **segnale registrato** sia attribuibile in maniera **univoca all'analita di interesse** e non alla presenza contemporanea di un qualcosa di simile dal punto di vista chimico-fisico, che provochi un incremento anche casuale del segnale misurato.

Bisogna quindi procedere alla conferma di identità. Il fatto che altri componenti interferiscano con lo stadio di misurazione può dipendere dall'efficienza della purificazione.

Se la misura non è specifica è possibile che alcuni analiti non interferiscano, purché lo si sia preventivamente dimostrato nelle stesse condizioni analitiche.

## **Parametri tecnici che descrivono un metodo multiresiduo.**

### **Selettività**

**Se sono presenti interferenti e non si possono separare dall'analita, oppure se l'analista non si accorge della loro presenza, possono verificarsi una serie di inconvenienti a seconda di come viene identificato e quantizzato l'analita di interesse:**

- Sovrastima dell'analita**
- Sottostima dell'analita**
- Falsi positivi**
- Falsi negativi**

**Tecniche di conferma dell'analita risultano pertanto indispensabili**

## **Limite di rilevabilità**

**La più bassa concentrazione che può essere rilevato con un certo grado di sicurezza.**

**Il limite di rilevabilità acquista significato quando si fa riferimento a valori di riferimento (limite di quantificazione superiore al limite di legge).**

**Per determinarlo sperimentalmente si può replicare la matrice esente dall'analita, calcolando la media del segnale (bianco) ed aumentandolo di tre volte il suo scarto tipo.**

## **Limite di quantificazione**

**La più bassa concentrazione che può essere quantificata con un grado di precisione stabilita a priori (in genere 95%).**

**Il metodo più semplice è quello di prendere come riferimento il punto più basso della calibrazione rapportato al fattore di diluizione**

**Esempio:**

**Fattore di concentrazione del campione 10**

**Punto più basso della curva di calibrazione 0,2 p.p.m.**

**Limite di rivelabilità 20 p.p.b.**

**Alcuni organismi internazionali danno come indicazione per il calcolo di prendere a riferimento il valore del bianco aumentato di 5/10 volte lo scarto tipo.**

**Esistono infine dei metodi che utilizzano la regressione lineare per il calcolo del limite di quantificazione**

## **Intervallo di lavoro e linearità**

**Rappresenta l'intervallo di concentrazione entro cui il metodo è applicabile**

**Entro questo intervallo bisogna valutare la linearità della risposta tra il segnale misurato e la concentrazione dell'analita.**

**Attraverso l'analisi statistica della risposta del rivelatore (di solito la regressione lineare), operando su diversi livelli di concentrazione (**almeno 3**) si valuta il coefficiente di correlazione della retta di calibrazione  $R^2$  e si stabiliscono i criteri di accettabilità della retta stessa (di norma  $R^2 > 0.98$ )**

**Esistono eventualmente altri metodi per il calcolo della concentrazione (**esempio: calibrazione a punto singolo**)**

## Precisione

Espressione quantitativa della ripetibilità di un risultato in termini di scarto tipo

I parametri che la descrivono sono:

Ripetibilità

Riproducibilità

Sia la **ripetibilità** che la **riproducibilità** sono funzione della concentrazione pertanto vanno valutati almeno al livello superiore ed al livello inferiore del campo di applicazione

L'indice correlato ai parametri **ripetibilità** e **riproducibilità** è lo **scarto tipo relativo** o **CV%**

## **Accuratezza**

**Rappresenta la vicinanza del valore riscontrato rispetto al valore vero**

**La valutazione dell'accuratezza può avvenire:**

**Analisi di campioni certificati**  
**Partecipazione ai Proficiency Test**  
**Analisi di campioni Spiked**

**L'accuratezza del metodo si valuta attraverso i normali criteri di valutazione (Z-scores o test di normalità)**

## **Sensibilità**

**Rappresenta la variazione della risposta strumentale**

**La valutazione della *Sensibilità* del metodo si valuta attraverso i parametri di regressione della retta di calibrazione:**

## **Robustezza**

**Capacità del metodo nel **NON** essere influenzato da variabili occasionali (variazione del lotto dei reagenti, condizioni ambientali non controllate .....)**

## **Recupero**

### **Il recupero misura l'esattezza di un metodo**

**Il metodo più semplice consiste nell'operare su aliquote contenenti l'analita a concentrazioni conosciute e valutandone il recupero**

**L'uso di campioni **spiked** può portare a valori di recupero sovrastimati**

**La partecipazione ai Proficiency Test riportando il valore trovato al valore assegnato può dare indicazioni **più** attendibili rispetto alla valutazione del parametro **Recupero****

## **Incertezza**

**Valutazione attraverso la relazione empirica di Horwitz corretta da Tomson**

**Il criterio si basa sul fatto che gli errori casuali presenti in un metodo sono inversamente proporzionali alla concentrazione**

**La relazione matematica che descrive tale relazione è:**

$$CV_R \% = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

**Correzione di Tompson valida sotto i 120 µg/kg**

$$\sigma_R \% = 0,22 C$$

**Ad un grado di copertura del 95% l'incerteza estesa si calcola**

$$U(y) = \sigma_R 1.96$$

**Criterio di applicabilità**

$$\frac{\sigma_r}{\sigma_R} \text{ compreso fra } 1/2 \text{ e } 2/3$$

**C = Concentrazione dell'analita in unità di massa (C%)**

**$\sigma_r$  = Scarto tipo di ripetibilità**

**$\sigma_R$  = Scarto tipo di riproducibilità**

**U(y) = Incerteza estesa**

## **Esempio pratico**

### **Principi attivi da accreditare – Metodo SPE**

<b>Azinfos etile</b>	<b>Endosulfan alfa</b>	<b>Pirazofos</b>
<b>Azinfos metile</b>	<b>Endosulfan beta</b>	<b>Piridafention</b>
<b>Bupirimate</b>	<b>Endosulfan SO<sub>4</sub></b>	<b>Pirimetamil</b>
<b>Ciproconazolo</b>	<b>Esaconazolo</b>	<b>Pirimifos metile</b>
<b>Clorfenvinfos</b>	<b>Etoprofos</b>	<b>Penconazolo</b>
<b>Clorpirifos</b>	<b>Fenitrotion</b>	<b>Propargite</b>
<b>Clorpirifos metile</b>	<b>Fention</b>	<b>Propiconazolo</b>
<b>Clorprofam</b>	<b>Fentoato</b>	<b>Quinalfos</b>
<b>Clortalonil</b>	<b>Fosalone</b>	<b>Tebuconazolo</b>
<b>Clortal dimetile</b>	<b>Fosmet</b>	<b>Tetradifon</b>
<b>Clozolate</b>	<b>Malation</b>	<b>Tolifluanide</b>
<b>Diazinone</b>	<b>Metidation</b>	<b>Triadimefon</b>
<b>Diclofluanide</b>	<b>Paration</b>	<b>Vinclozolin</b>
<b>Dimetoato</b>	<b>Paration metile</b>	
	<b>Penconazolo</b>	

## **Matrici su cui si vuole accreditare il metodo**

**Spinaci, lattuga, cavoli, fagiolini, fragole, mele, pere pesche, pomodori, uva, arance, limoni**

<b>Alto contenuto di acqua e clorofilla</b>	<b>Spinaci, lattuga, broccoli,cavoli, fagiolini</b>
<b>Alto contenuto di acqua/bassa clorofilla</b>	<b>Mele, pere, pesche, fragole, uva, pomodoro</b>
<b>Alto contenuto di acidi</b>	<b>Arance, limoni</b>

## **Matrici su cui lavorare**

**Lattuga, mele, arance**

<b>Principio Attivo</b>	<b>Solubilità H<sub>2</sub>O mg/l</b>	<b>Principio Attivo</b>	<b>Solubilità H<sub>2</sub>O mg/l</b>
Azinfos	4/5	Fentoato	11
Azinfos metile	28	Fosalone	10
Bupirimate	22	Fosmet	22
Ciproconazolo	140	Malation	145
Clorfenvinfos	145	Metidation	250
Clorpirifos	1.4	Paration	24
Clorpirifos CH3	2.6	Paration metile	55
Clorprofam	89	Penconazolo	70
Clorotalonil	0.6	Pirazofos	4.2
Clortal dimetile	0.5	Piridafention	74
Clozolate	2.0	Pirimetanil	0.1
Diazinone	60	Pirimifos metile	5
Diclofluanide	2.0	Propargite	insolubile
Dimetoato	25 gr/l	Quinalfos	250 gr/l
Endosulfan	0.33	Tebuconazolo	32
Esaconazolo	0.02	Tetradifon	0.05
Etoprofos fenitrotion	750	Tolifluanide	0.9
	14	Triadimefon	260
Fention	2.0	Vinclozolin	34

<b>Principio Attivo</b>	<b>Solubilità H<sub>2</sub>O</b>	<b>Principio Attivo</b>	<b>Solubilità H<sub>2</sub>O</b>
Azinfos	4/5	Fentoato	11
<b>Azinfos metile</b>	28	Fosalone	10
Bupirimate	22	Fosmet	22
Ciproconazolo	140	Malation	145
Clorfenvinfos	145	Metidation	250
<b>Clorpirifos</b>	1.4	Paration	24
Clorpirifos CH3	2.6	Paration metile	55
Clorprofam	89	Penconazolo	70
<b>Clorotalonil</b>	0.6	Pirazofos	4.2
Clortal dimetile	0.5	Piridafention	74
Clozolate	2.0	Pirimetamil	0.1
<b>Diazinone</b>	60	Pirimifos metile	5
Diclofluanide	2.0	<b>Propargite</b>	<b>insolubile</b>
<b>Dimetoato</b>	<b>25 gr/l</b>	<b>Quinalfos</b>	<b>250 gr/l</b>
<b>Endosulfan</b>	0.33	Tebuconazolo	32
Esaconazolo	0.02	Tetradifon	0.05
Etoprofos	750	Tolifluanide	0.9
fenitrotion	14	Triadimefon	260
Fention	2.0	Vinclozolin	34

Ricuperi medi % sulle singole matrici

	<b>Mele</b>	<b>Insalata</b>	<b>Arancia</b>
<b>Azinfos metile</b>	<b>95</b>	<b>91.1</b>	<b>100</b>
<b>Clorpirifos</b>	<b>72.3</b>	<b>85</b>	<b>71.4</b>
<b>Clorotalonil</b>	<b>75.0</b>	<b>98</b>	<b>84</b>
<b>Diazinone</b>	<b>73.0</b>	<b>88</b>	<b>78.6</b>
<b>Dimetoato</b>	<b>91.2</b>	<b>70</b>	<b>82.1</b>
<b>Quinalfos</b>	<b>71.7</b>	<b>92</b>	<b>83.2</b>
<b>Endosulfan</b>	<b>71.9</b>	<b>76</b>	<b>72.5</b>
<b>Propargite</b>	<b>88.6</b>	<b>93</b>	<b>91.5</b>

Valori medi calcolati sulla media dei ricuperi ai tre livelli di concentrazione 0,02 – 0,2 – 1,0 mg/kg

valori sperimentali	Aggiunto		Risultati elaborazione	
	0,16			
	numero dati (n.)	6		
0,147	Media (Xm)	0,1527		
0,159	Varianza (s <sub>r</sub> <sup>2</sup> )	0,0001		
0,162	<b>Scarto tipo (s<sub>r</sub>)</b>	<b>0,0102</b>		
0,141	CV %	6,6628	Media (limite di fiducia inf. p=	0,142
0,143	Minimo	0,141	Media (limite di fiducia sup. p=	0,163
0,164	Massimo	0,164	Intervallo di fiducia della me	0,0106
	Range	0,023		
	Mediana	0,153	Gradi di libertà	5
	<b>Ricupero % medio</b>	<b>95,4</b>	t di student p=95%	2,571
distribuzione normale	Test Shapiro-Wilks 5%	SI	<b>LIMITE DI RIPETIBILITA'</b>	<b>0,037</b>
presenza dati anomali	Test Huber 5%	NO		



Determinazione di :

clorpirifos

Metodo di analisi:

UT2.MO54

### CALIBRAZIONE

CONC.	AREA	y calc.
0,000		8103,24
0,25	44365	57531,86
1	225568	205817,71
2,5	495806	502389,43

$$y=a+bx$$

$$a = 8103,2381$$

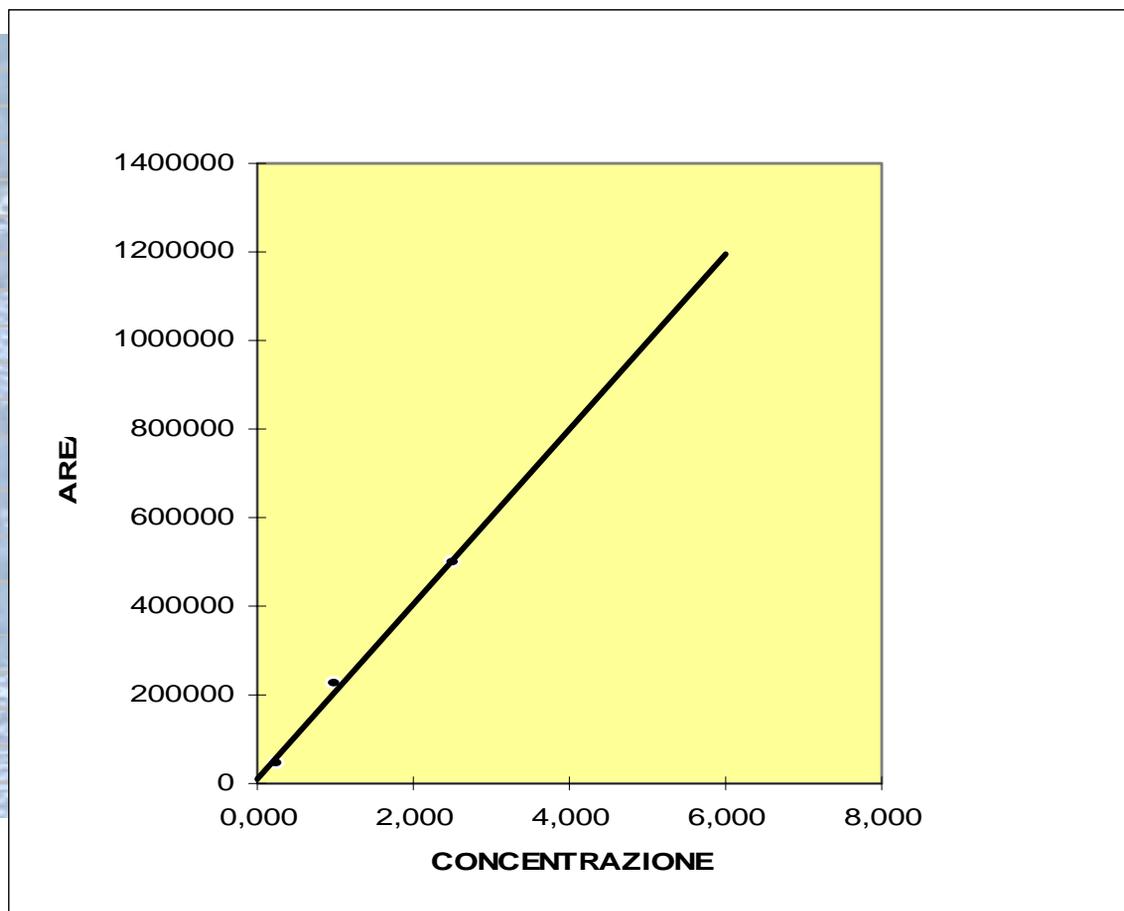
$$b = 197714,48$$

$$r = 0,9971$$

**SENSIBILITA'** 0,004

**Limite di quantificazione** 0,025

**Limite di determinazione** 0,012



Incertezza di Horwitz							
C mg/kg	0,1						
frazione di massa	0,0000001		CVR%	Risultato :	Incertezza composta		
logC esp	-7 4,5		22,62742		0,023		
Incertezza estesa	0,044						
				Espressione del risultato =	p.p.m.		p.p.m.
					0,100 +/-		0,044
Incertezza di Tompson							
C mg/kg	0,067						
frazione di massa	6,7E-08		CVR%	Risultato :	Incertezza composta		
logC esp	-7,173925 4,5869626		24,0333    24		0,01608000		
Incertezza estesa	0,032						
				Espressione del risultato =	0,067		+/- 0,032
					p.p.m.		p.p.m.

## *Riepilogando*

<b>Selettività</b>			<b>GC/MS</b>
<b>Limite di rivelabilità</b>			<b>0,0125</b>
<b>Limite di quantificazione</b>			<b>0,025</b>
<b>Intervallo di lavoro</b>			<b>0,025-0,250</b>
<b>Intervallo di linearità</b>			<b>0,25-2.5</b>
<b>precisione</b>	<b>ripetibilità</b>		<b>0,037</b>
	<b>riproducibilità</b>		<b>0,0102</b>
<b>Sensibilità</b>			<b>0,004</b>
<b>Recupero</b>			<b>95,4</b>
<b>Incertezza</b>			<b>Horwitz</b>