

IT9800235



ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Linee guida per l'applicazione
delle buone pratiche di laboratorio
e l'assicurazione e il controllo della qualità
nell'analisi di residui di prodotti fitosanitari**

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

RECEIVED
FEB 23 1998
OSTI

DISTRIBUTION OF THIS DOCUMENT IS UNLIMITED
FOREIGN SALES PROHIBITED
NT

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

97/24

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Linee guida per l'applicazione
delle buone pratiche di laboratorio
e l'assicurazione e il controllo della qualità
nell'analisi di residui di prodotti fitosanitari**

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

97/24

Istituto Superiore di Sanità

Linee guida per l'applicazione delle buone pratiche di laboratorio e l'assicurazione e il controllo della qualità nell'analisi di residui di prodotti fitosanitari.

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, iii, 33 p. Rapporti ISTISAN 97/24

Le linee guida, rivolte in modo particolare a laboratori incaricati di indagini e controlli relativi ai residui di antiparassitari negli alimenti e nell'ambiente, sono una trascrizione sul piano pratico, organizzativo e operativo dei principi contenuti nel DL.vo n. 120 del 27 gennaio 1992 e nella norma europea UNI CEI EN 45001, alla quale i laboratori incaricati del controllo ufficiale degli alimenti dovranno adeguarsi. I principali argomenti discussi includono l'organizzazione del laboratorio, le dotazioni di personale e di equipaggiamento, le procedure di lavoro relative alla metodologia analitica, i criteri di conferma del superamento di valori limite e il controllo di qualità.

Parole chiave: Pesticidi, Tossicologia

Istituto Superiore di Sanità

Guidelines for application of the good laboratory practices and quality assurance and control in pesticide residues analysis.

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, iii, 33 p. Rapporti ISTISAN 97/24 (in Italian)

The guidelines, particularly aimed at laboratories which carry out studies in the field of pesticide residues in food and environment, are intended to give practical, organizational and operational hints along the lines set up by the Italian Legislative Decree n. 120 of January 27, 1992 and the European standard UNI CEI EN 45001, to which the laboratories dealing with official control and monitoring should conform. The main items discussed include: organization of the laboratory, personnel and equipment, working procedures related to analytical methodology, confirmation criteria for violation of maximum residue limits and quality control.

Key words: Pesticides, Toxicology

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:

Danilo 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	ARPA (Agenzia Regionale 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 Tirafferri	ARPA (Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente) Emilia-Romagna, Rimini
Raffaele Vistocco	ARPA (Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente), Bolzano

Elaborazione del testo a cura di Tiziana Generali

© Istituto Superiore di Sanità 1997

DISCLAIMER

Portions of this document may be illegible electronic image products. Images are produced from the best available original document.

INDICE

	Presentazione	iii
1	Definizioni	1
2	Introduzione	5
3	Laboratorio e suo equipaggiamento	6
3.1	Criteri costruttivi e organizzazione delle aree di lavoro e di servizio	6
3.2	Arredi e dotazione strumentale	6
3.3	Verifica, manutenzione e taratura degli strumenti	8
3.4	Vetreteria e altro materiale d'uso da laboratorio	9
3.5	Reagenti e solventi	9
3.6	Procedure di acquisto	10
4	Personale e organizzazione	10
4.1	Competenze tecniche e aggiornamento	10
4.2	Compiti e responsabilità	10
4.3	Sicurezza per gli operatori	11
5	Procedure di lavoro	12
5.1	Prelievo del campione	12
5.2	Registrazione e conservazione del campione	13
5.3	Selezione del metodo di analisi	14
5.4	Parametri di qualità che caratterizzano il metodo di analisi e loro valutazione	15
5.4.1	Precisione	15
5.4.2	Accuratezza	16
5.4.3	Specificità	17
5.4.4	Incertezza	17
5.4.5	Intervallo di linearità	18
5.4.6	Limite di determinazione analitica	18
5.4.7	Standard di calibrazione	19
5.5	Validazione del metodo di analisi	21
5.6	Documentazione del metodo di analisi, della sua valutazione e validazione	21
5.7	Procedura di analisi	22

5.7.1	Preparazione e trattamento preliminare	22
5.7.2	Estrazione e purificazione	23
5.7.3	Determinazione strumentale	24
5.7.3.1	Analisi qualitativa	25
5.7.3.2	Analisi di conferma qualitativa	25
5.7.3.3	Analisi quantitativa	25
5.7.3.4	Accettabilità del risultato analitico	26
5.8	Criteri di conferma del superamento dei valori limite di riferimento	26
5.9	Controllo di qualità	26
5.9.1	Controllo di qualità intralaboratorio	27
5.9.1.1	Aggiunta di standard di processo	27
5.9.1.2	Campione di controllo	27
5.9.1.3	Carta di controllo	28
5.9.1.4	Controllo di qualità interlaboratorio	28
5.10	Documentazione della prova e del controllo di qualità	29
5.11	Trasmissione dei risultati	29
5.11.1	Rapporto di prova	30
5.11.2	Casi di irregolarità	30
5.11.3	Trasmissione aliquota per revisione di analisi	31
5.11.4	Trasmissione dei risultati al Ministero della sanità	32
	Bibliografia	33

Presentazione

La Direttiva 93/99/CEE del Consiglio, riguardante misure supplementari in merito al controllo ufficiale dei prodotti alimentari, richiede che i laboratori che effettuano analisi ai fini del controllo ufficiale dei prodotti alimentari devono essere conformi ai criteri generali per il funzionamento dei laboratori di prova stabiliti dalla norma europea EN 45001 e alle procedure standard del DL.vo 27 gennaio 1992, n. 120.

Pertanto, il gruppo di lavoro per i residui di antiparassitari della commissione permanente di coordinamento interregionale per i problemi relativi al controllo ufficiale dei prodotti alimentari ha ritenuto utile presentare queste Linee guida con lo scopo di fornire un contributo alla omogeneizzazione e al miglioramento delle procedure adottate dai laboratori preposti 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 di sanità - Roma, il che testimonia della buona collaborazione tra gli enti pubblici preposti al controllo dei residui di antiparassitari negli alimenti.

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

Roma, 30 Settembre 1997

Il Coordinatore del Gruppo di Lavoro
Alfonso Di Muccio

1 DEFINIZIONI

Viene riportato il significato di alcuni termini usati nel testo; in alcuni casi i termini sono specifici del settore alimentare.

ACCURATEZZA

Grado di concordanza fra il valore medio di un certo numero di misure e il valore vero o il valore ritenuto valido e accettato.

ALIQUOTA DI ANALISI O ALIQUOTA DA SAGGIO

Frazione rappresentativa del campione di analisi sulla quale il laboratorio esegue l'analisi.

BUONE PRATICHE DI LABORATORIO (BPL)

Principi riguardanti l'organizzazione e le condizioni in cui le analisi vengono programmate, eseguite, verificate, registrate e trasmesse al fine di garantire la qualità del dato analitico.

CAMPIONE

Genericamente si intende una porzione rappresentativa di un materiale, di un lotto o di una partita, sulla quale il laboratorio esegue le analisi.

CAMPIONE DI LABORATORIO

Porzione rappresentativa del materiale o della merce da sottoporre a controllo sulla quale il laboratorio di prova esegue le analisi, ottenuta per suddivisione del campione finale.

CAMPIONE DI RISERVA

Aliquota identica al campione di laboratorio, a disposizione dei soggetti interessati per analisi di revisione o controperizie.

CAMPIONE DI CONTROLLO

Campione costituito dallo stesso materiale su cui viene eseguita l'analisi, utilizzato per valutare i parametri di qualità di un metodo e per prove di controllo di qualità intra o interlaboratorio.

CAMPIONE ELEMENTARE

Porzione prelevata da un singolo punto dell'intero quantitativo di materiale o merce da saggiare. L'insieme dei campioni elementari costituisce il campione globale.

CAMPIONE FINALE

Campione globale o parte rappresentativa di questo ottenuta mediante opportuna riduzione. Quando richiesto, dal campione finale per ulteriore suddivisione si ottengono più campioni di laboratorio fra loro identici; uno da usare per l'analisi (campione di laboratorio), gli altri come aliquote di riserva a disposizione di soggetti interessati (campioni di riserva).

CAMPIONE GLOBALE

Ottenuto riunendo e mescolando i campioni elementari.

CARTA DI CONTROLLO

Grafico temporale su cui vengono riportati i risultati del controllo di qualità condotto dal laboratorio.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Insieme delle tecniche e delle procedure messe in atto per verificare e assicurare i requisiti prefissati di qualità.

ERRORE CASUALE

Dovuto all'intervento accidentale di differenti sorgenti di variabilità durante il procedimento analitico. Strettamente correlato all'imprecisione.

ERRORE SISTEMATICO

L'insieme dei fattori che determinano uno spostamento del valore trovato da quello reale. E' causa di inaccuratezza.

FOGLIO DI ANALISI

Scheda di lavoro sulla quale l'analista riporta i dati relativi al campione, alle analisi, alle prove di controllo e gli esiti finali.

INCERTEZZA

Stima caratterizzante l'intervallo di valori entro cui con una definita probabilità può trovarsi il valore di una grandezza.

INTERVALLO DI CONFIDENZA

Intervallo entro il quale ad un determinato livello di probabilità si trova il valore vero del parametro preso in esame

LIMITE DI DETERMINAZIONE ANALITICA

Minima quantità di un determinato analita che può essere misurata con un accettabile grado di accuratezza e precisione.

LIMITE MASSIMO DI RESIDUI (LMR)

Concentrazione massima ammessa di un prodotto fitosanitario prevista dalla normativa di riferimento, il cui superamento indica la non regolarità della merce o del materiale oggetto del controllo.

LOTTO

Quantità definita di una merce o di un materiale prodotta sotto condizioni che si presume siano uniformi.

MANUALE DELLA QUALITÀ

Testo in cui sono descritte la struttura organizzativa, le procedure relative ad attività tecniche, analitiche e gestionali in attuazione del programma di assicurazione della qualità e per il raggiungimento degli obiettivi previsti dalla politica della qualità.

MATERIALE DI RIFERIMENTO CERTIFICATO (MRC)

Materiale di riferimento in cui il valore di uno o più componenti è noto e certificato attraverso una procedura tecnicamente validata o accompagnato da un documento emesso da un organismo di certificazione; è utilizzato come campione di controllo o per la taratura di apparecchiature.

MATERIALE DI RIFERIMENTO PREPARATO IN LABORATORIO (MRL)

Materiale di riferimento preparato nel proprio laboratorio il cui valore di uno o più componenti è noto; utilizzato generalmente come campione di controllo e per la validazione dei metodi.

PARTITA

Quantità identificabile di prodotti avente caratteristiche che si presumono uniformi.

PRECISIONE

Grado di concordanza fra i risultati ottenuti da numerose prove indipendenti sotto condizioni definite, applicando uno stesso metodo analitico su uno stesso materiale. Rappresenta la dispersione dei risultati intorno al valore medio.

PRINCIPIO ATTIVO

Molecola contenuta nei formulati dei prodotti fitosanitari che è attiva nei confronti dell'organismo bersaglio. Anche sostanza attiva.

PRODOTTO FITOSANITARIO

La sostanza attiva, o il preparato contenente una o più sostanze attive, nella formulazione fornita all'utilizzatore per la lotta contro i parassiti delle piante e nel controllo delle infestanti nella pratica agronomica.

PROGRAMMA DI ASSICURAZIONE DELLA QUALITÀ (PAQ)

L'insieme delle azioni pianificate e sistematiche necessarie a garantire che il laboratorio soddisfi i prefissati requisiti di qualità.

RAPPORTO DI PROVA

Documento emesso dal laboratorio che espone i risultati di una analisi e altre informazioni ad essa relativa.

REGISTRO DI ANALISI

Registro cartaceo o su supporto magnetico protetto da manomissioni o modifiche non autorizzate, sul quale sono riportati i dati relativi al campione e i risultati analitici definitivi.

REGISTRO DELLE APPARECCHIATURE

Registro dove sono raccolti i dati identificativi della strumentazione e quelli riguardanti la manutenzione, la taratura, la calibrazione e la verifica della performance strumentale.

RIPETIBILITÀ

Grado di concordanza fra i risultati ottenuti da numerose prove indipendenti effettuate da uno stesso operatore, utilizzando lo stesso metodo, sullo stesso materiale in un breve intervallo di tempo.

RIPRODUCIBILITÀ

Grado di concordanza fra i risultati ottenuti da numerose prove indipendenti effettuate da operatori diversi, in laboratori diversi utilizzando lo stesso metodo sullo stesso materiale.

SOSTANZA ATTIVA

Molecola contenuta nei formulati dei prodotti fitosanitari che è attiva nei confronti dell'organismo bersaglio. Anche principio attivo.

SPECIFICITÀ

E' la stima della capacità di un metodo analitico di individuare selettivamente un determinato analita tra altri componenti.

STANDARD DI RIFERIMENTO

Analita in forma pura nel suo stato fisico originale da utilizzare nella preparazione degli standard di calibrazione.

VALIDAZIONE DI UN METODO

Insieme delle azioni sperimentali condotte in un laboratorio, o in più laboratori collettivamente, per verificare l'adeguatezza delle caratteristiche qualitative di un metodo e definire la sua applicabilità.

VALUTAZIONE DI UN METODO

Consiste nell'accertamento delle caratteristiche di praticabilità e di attendibilità analitica di un metodo.

2 INTRODUZIONE

L'attività di controllo sui livelli di residui delle sostanze attive dei prodotti fitosanitari (RPF) in matrici alimentari ed ambientali è abbastanza diffusa nei laboratori dei Dipartimenti delle Agenzie Regionali e Provinciali per la Protezione Ambientale (ARPA, APPA) e dei Presidi Multizonali di Prevenzione (PMP).

Partendo dall'esperienza maturata in questi ultimi anni da alcuni di questi laboratori e dal laboratorio di Tossicologia Applicata dell'Istituto Superiore di Sanità, quali componenti di un gruppo di lavoro costituito all'interno della "Commissione permanente di coordinamento interregionale per i problemi relativi al controllo ufficiale dei prodotti alimentari", abbiamo elaborato queste linee guida che vogliono rappresentare, per un settore specifico come quello dei controlli sui residui, una trascrizione sul piano pratico, organizzativo ed operativo dei principi contenuti nella norma europea UNI CEI EN 45001, alla quale, i laboratori incaricati del controllo ufficiale degli alimenti e di altri controlli in campo sia ambientale che sanitario, dovranno adeguarsi.

Vogliono inoltre rappresentare, in un'ottica di rivalutazione dell'aspetto qualitativo nei confronti di quello quantitativo e di riorganizzazione dell'attività analitica all'interno di laboratori specializzati, un contributo e una proposta organizzativa indirizzata ai laboratori incaricati dei controlli sui RPF (e analogamente di altri settori) per uniformare le procedure, incrementare l'affidabilità delle prestazioni, garantire la qualità, la comparabilità dei risultati e, in ultima analisi, l'uniformità di giudizio.

Un laboratorio che operi secondo programmi di assicurazione della qualità, utilizzando metodi di analisi validati e adottando sistemi di sorveglianza delle proprie prestazioni, rappresenta la migliore garanzia nei confronti dei propri utenti.

Per laboratorio incaricato dei controlli di RPF si intende un laboratorio di analisi di tipo specialistico che:

- esegue sistematicamente, non in modo episodico o casuale, accertamenti al fine di indagine o di verifica dei livelli di residui in matrici come acqua, alimenti, suolo ecc. per un numero adeguato e continuamente aggiornato di sostanze attive
- attua un programma di assicurazione della qualità e di sorveglianza delle proprie prestazioni analitiche
- conduce sperimentazioni di tipo analitico e approfondimenti metodologici nel campo dei residui di prodotti fitosanitari

Gli argomenti trattati nelle linee guida riguardano principalmente:

- requisiti tecnico-organizzativi dei laboratori incaricati del controllo sui RPF
- raccomandazioni e comportamenti secondo le buone pratiche di laboratorio (BPL)
- procedure gestionali ed operative

- procedure di verifica e di assicurazione della qualità

3 LABORATORIO E SUO EQUIPAGGIAMENTO

3.1 CRITERI COSTRUTTIVI E ORGANIZZAZIONE DELLE AREE DI LAVORO E DI SERVIZIO

Il laboratorio dedicato all'analisi di RPF deve essere costruito secondo adeguati criteri di sicurezza, prevenzione e comfort nei confronti degli operatori. Sarà organizzato in modo da risultare razionale e pienamente funzionale. Per questo motivo saranno previste idonee e separate aree di lavoro e di servizio, per le seguenti attività:

- il trattamento preliminare, l'estrazione e la purificazione dei campioni
- l'analisi strumentale, differenziando possibilmente le varie tecniche in aree diverse
- la preparazione e la conservazione delle soluzioni degli standard di riferimento
- la conservazione dei campioni
- la conservazione dei reagenti e dei solventi
- la registrazione e l'archiviazione dei dati relativi ai campioni e alle rispettive analisi
- la pulizia e la decontaminazione della vetreria
- la conservazione dei residui dei campioni sottoposti ad analisi e dei residui delle attività analitiche prima del loro definitivo smaltimento

Deve essere ridotto al minimo il rischio di contaminazione dei locali, della vetreria e dell'attrezzatura in genere, da parte di soluzioni standard concentrate o di campioni con elevati livelli di RPF. Per questo motivo, le procedure di manipolazione, lavaggio e conservazione di materiale fortemente contaminato o supposto tale, saranno mantenute separate dalle altre, possibilmente in locali appositamente adibiti, sotto uno stretto controllo sul rischio di esposizione degli operatori o di contaminazione delle aree di lavoro, con procedure e metodologie descritte dettagliatamente.

3.2 ARREDI E DOTAZIONE STRUMENTALE

Gli arredi di laboratorio (banchi di lavoro, cappe di aspirazione, ecc.), gli impianti di servizio e le apparecchiature di analisi dovranno essere conformi sotto l'aspetto della sicurezza nei confronti degli operatori e delle strutture.

Il laboratorio dovrà disporre di apparecchiatura analitica generale e apparecchiatura analitica specifica per l'analisi dei residui.

La dotazione strumentale necessaria per un laboratorio incaricato del controllo di RPF dovrebbe prevedere:

- armadio frigo per la conservazione degli standard di riferimento
- armadio frigo per la conservazione dei campioni
- armadio freezer per la conservazione dei campioni
- omogeneizzatori
- bagno ad ultrasuoni
- evaporatore rotante
- agitatore meccanico per imbuti separatori
- bilancia tecnica
- bilancia analitica
- 2 gas cromatografi (GC) con rivelatore per composti azotati e fosforati (NPD)
- 2 gas cromatografi (GC) con rivelatore a cattura di elettroni (ECD)
- 1 gas cromatografo (GC) con rivelatore a spettrometria di massa (MS)
- 1 cromatografo liquido (HPLC) con rivelatore spettrofotometrico (UV) a serie di diodi (DAD)
- 1 cromatografo liquido (HPLC) con rivelatore spettrofluorimetrico e derivatizzatore post-colonna
- 1 sistema di purificazione mediante cromatografia di gel permeazione (GPC)
- 1 sistema di estrazione/purificazione mediante Solid Phase Extraction (SPE)
- 1 spettrofotometro UV-VIS a lunghezza d'onda variabile
- 1 spettrofotometro ad adsorbimento atomico (AA)

In alcuni casi può trovare impiego anche la gas cromatografia (GC) con rivelatore a fotometria di fiamma (FPD), a ionizzazione di fiamma (FID), a spettrofotometria infrarossa e trasformata di Fourier (FTIR).

Nell'elenco non sono considerati, anche se ovviamente necessari, gli strumenti di misura e di processo di uso più generale (stufe, agitatori, pHmetro, ecc.), gli impianti e le apparecchiature di servizio (impianto gas puri, impianto per vuoto, compressori, deionizzatori, ecc.), i corredi di vetreria e dispensatori tarati, di vetreria varia e altro materiale di laboratorio.

La dotazione strumentale necessaria può variare in riferimento al progresso tecnologico, all'evoluzione delle metodiche e delle applicazioni, alle specifiche attività dei singoli laboratori.

In alcuni casi è consigliato assicurare a particolari apparecchiature continuità di alimentazione elettrica con l'ausilio di generatori di corrente o di accumulatori. Ad esempio gli spettrometri di massa, gli strumenti di analisi dotati di autocampionatori che possono lavorare anche in assenza di personale, i frigoriferi e i congelatori usati per la conservazione dei campioni e dei materiali di riferimento.

3.3 VERIFICA, MANUTENZIONE E TARATURA DEGLI STRUMENTI

Gli strumenti devono essere installati in idonei locali e mantenuti in condizioni di buon funzionamento ed efficienza.

Tutte le apparecchiature e i relativi impianti di servizio, come ad esempio l'impianto elettrico e l'impianto dei gas tecnici, dovranno essere periodicamente verificati sotto l'aspetto della sicurezza verso gli operatori e verso la struttura.

Secondo quanto previsto dal programma di assicurazione della qualità (PAQ), in accordo con i criteri che disciplinano le BPL, ogni strumento deve essere opportunamente e periodicamente verificato e, quando necessario, tarato secondo procedure normalizzate.

Per ogni strumento di analisi deve essere disponibile il manuale di corretto funzionamento e, in relazione all'uso e all'attività svolta, dovrà essere previsto un programma di manutenzione ordinaria e programmata, di taratura, di calibrazione e di verifica delle prestazioni.

Possono costituire un utile riferimento le raccomandazioni della A.O.A.C. (5), le Linee Guida dell'Istituto Superiore di Sanità (4) e i manuali UNICHIM della serie 177, circa i parametri da controllare, le frequenze e le relative procedure.

Le operazioni di manutenzione straordinaria vengono di norma svolte dai tecnici delle ditte costruttrici.

Per apparecchiature particolarmente complesse possono essere previsti contratti di manutenzione con le ditte costruttrici che, oltre alla copertura per guasti, prevedano visite programmate per la manutenzione preventiva e la taratura.

Le operazioni di taratura e calibrazione possono essere svolte da tecnici specializzati della ditta costruttrice o di laboratori riconosciuti, oppure da operatori interni, opportunamente addestrati. In questo ultimo caso sarà disponibile e correttamente conservato materiale di riferimento certificato (MRC) o comunque garantito per la taratura.

Le procedure operative connesse a queste operazioni saranno raccolte in modo dettagliato in una apposita documentazione.

I certificati di taratura e di idoneità della strumentazione sono conservati nel registro delle apparecchiature.

Il registro delle apparecchiature contiene, per ogni strumento di analisi, un fascicolo costituito a sua volta da più schede:

- scheda identificativa, dove sono riportati gli estremi identificativi della apparecchiatura, le applicazioni, l'elenco del personale autorizzato all'uso e alla taratura
- scheda di manutenzione ordinaria e straordinaria, dove vengono riportate le operazioni di ordinaria e periodica manutenzione dello strumento, i malfunzionamenti, i guasti e i relativi interventi di riparazione effettuati da personale interno ed esterno, le sostituzioni di parti, i tempi di fermo macchina

- scheda di taratura e calibrazione, dove riportare il risultato dei test condotti per la verifica e l'effettuazione della taratura e stabiliti nel programma di taratura
- scheda di verifica della performance analitica, dove riportare i risultati dei test che l'operatore conduce regolarmente sullo strumento per verificare che l'apparecchiatura sia in condizioni ottimali di impiego sotto l'aspetto, per esempio, della sensibilità, della riproducibilità, della risoluzione, della linearità di risposta

3.4 VETRERIA E ALTRO MATERIALE D'USO DA LABORATORIO

La vetreria e i dispensatori di volume utilizzati per la preparazione delle soluzioni di calibrazione e per la "ricostruzione" degli estratti dei campioni devono essere tarati ed essere di qualità corrispondente alla classe A.

Per quanto riguarda i microdispensatori tarati (micropipette) sarà previsto un programma di verifica della taratura e un apposito registro come indicato al paragrafo 3.3.

Tutta la vetreria o altro materiale riutilizzabile deve essere lavato e trattato in modo da garantire l'assenza di cessione di contaminanti che possono interferire nell'analisi. Saranno documentate e disponibili, per gli operatori addetti a queste operazioni, dettagliate procedure di lavaggio, essiccazione e conservazione.

Si avrà cura di non incrociare fra di loro i materiali impiegati in altre aree analitiche del laboratorio.

L'adeguatezza dello stato di pulizia della vetreria o di altro materiale riutilizzabile sarà verificata da un regolare svolgimento di analisi dei "bianchi" (vedi § 5.4.3) e documentata.

Ove possibile, è preferibile utilizzare materiale monouso. In modo particolare quando si deve operare su materiale fortemente inquinato o supposto tale, per evitare da un lato un potenziale rischio di esposizione a sostanze tossiche per gli operatori, dall'altro il pericolo di contaminazione incrociata.

Il materiale monouso non in vetro, prima di essere utilizzato, dovrà essere opportunamente testato circa possibile incompatibilità o cessione di plastificanti potenzialmente interferenti.

3.5 REAGENTI E SOLVENTI

I reagenti e i solventi utilizzati per l'analisi di RPF devono essere di grado analitico adeguato e di garantita qualità. Se necessario, dovranno essere previsti e quindi documentati periodici controlli sulla qualità e la purezza dei prodotti usati dal laboratorio. Gli esiti delle prove effettuate sui materiali saranno riportati in un apposito registro (vedi § 3.6).

Nei documenti relativi alle procedure operative e ai metodi di analisi sarà indicato il tipo di reagente o solvente necessario, il grado di purezza richiesto, le

precauzioni da adottare nella manipolazione e nella conservazione, con particolare riferimento a tossicità, infiammabilità, stabilità, reattività.

Dovranno essere disponibili le schede di sicurezza in lingua italiana per ogni reagente o solvente utilizzato. Le schede devono essere facilmente accessibili per la consultazione e comunque allegate alla documentazione dei metodi di analisi.

I prodotti saranno regolarmente etichettati, sia per quanto riguarda le confezioni originali che le altre preparate in laboratorio.

Particolare cura deve essere dedicata alla preparazione di acqua distillata che dovrà risultare esente da sostanze organiche potenzialmente interferenti.

3.6 PROCEDURE DI ACQUISTO

Per l'approvvigionamento di apparecchiature, materiali di consumo, solventi, reagenti, materiali di riferimento ecc. il laboratorio si rivolge a fornitori o costruttori qualificati, certificati a norma UNI EN ISO 9000 o che comunque abbiano dimostrato affidabilità nel fornire materiali di idonea e garantita qualità e rispondenti alle specifiche richieste.

Presso il laboratorio sarà disponibile un elenco aggiornato dei fornitori e una scheda relativa ad ogni fornitore, sulla quale poter annotare osservazioni circa le forniture e i risultati dei collaudi effettuati dal laboratorio sui materiali forniti.

I contratti stipulati con i fornitori dovranno prevedere la possibilità di respingere il materiale qualora non rispettasse le specifiche richieste.

4 PERSONALE E ORGANIZZAZIONE

4.1 COMPETENZE TECNICHE E AGGIORNAMENTO

Il personale tecnico addetto al laboratorio incaricato delle analisi di RPF deve essere qualificato e impiegato in modo esclusivo, avere specifica formazione professionale, essere regolarmente addestrato e aggiornato secondo programmi di formazione periodici.

Nel laboratorio, per ogni operatore, sarà tenuto un fascicolo personale che conterrà: titolo di studio, qualifica, formazione e aggiornamento professionale, curriculum vitae e attività scientifica, assegnazione di incarichi e responsabilità.

La dotazione di personale tecnico per un laboratorio incaricato dell'analisi di RPF prevede un nucleo minimo formato da tre operatori: 1 chimico e 2 periti chimici.

4.2 COMPITI E RESPONSABILITÀ

Il personale tecnico segue, per quanto di competenza e secondo le responsabilità attribuite e chiaramente indicate nell'organigramma interno descritto nel manuale della

qualità, le procedure previste dal programma di assicurazione della qualità per quanto concerne in modo particolare l'esecuzione delle prove, il corretto utilizzo e la verifica del funzionamento degli strumenti, l'esecuzione delle tarature, delle calibrazioni e dei test di controllo di qualità, la valutazione e l'interpretazione dei risultati e tutte le altre procedure operative e gestionali previste per il corretto funzionamento del laboratorio.

4.3 SICUREZZA PER GLI OPERATORI

Sicurezza e qualità sono due aspetti che si integrano a vicenda in un sistema dinamico in continua evoluzione. Non è pensabile operare secondo un programma di assicurazione di qualità in assenza di sicurezza.

Il laboratorio deve essere realizzato in ambienti idonei e conformi alla normativa nazionale e comunitaria in materia di sicurezza e igiene del lavoro.

L'attività del laboratorio sarà organizzata in modo da tutelare la salute e la sicurezza sul lavoro degli operatori secondo le procedure previste dai D.P.R. 547/55¹, D.P.R. 303/56², D.L.vo 626/94³ e successive modificazioni.

Gli impianti di servizio e le apparecchiature di analisi dovranno essere conformi sotto l'aspetto della sicurezza verso gli operatori e verso l'ambiente.

Sarà garantita la presenza di idonei locali per la conservazione dei materiali infiammabili, dei materiali tossici (compresi i rifiuti e gli scarti del laboratorio) e dei fluidi sotto pressione.

Il personale addetto alle analisi deve essere messo a conoscenza dei rischi, addestrato e costantemente aggiornato.

L'identificazione dei pericoli e delle corrette modalità per la gestione (eliminazione, riduzione, protezione) dei rischi sono attività che ricadono fra le competenze del personale dirigente.

In particolare dovranno essere individuate tutte le operazioni generali o specifiche potenzialmente pericolose per l'operatore: queste saranno segnalate nelle procedure operative e nei metodi di analisi insieme ad avvertenze e norme di comportamento che l'operatore è tenuto a rispettare per eliminare o comunque ridurre le possibilità di incidente o di esposizione a sostanze pericolose, a garanzia della propria e altrui salute.

Saranno disponibili e facilmente accessibili schede di sicurezza per ogni materiale utilizzato ed un opportuno corredo di dispositivi individuali di protezione (DPI) come guanti, maschere, occhiali ecc.

I metodi di analisi saranno selezionati e valutati anche sotto l'aspetto della sicurezza nei confronti sia degli operatori che dell'ambiente (vedi § 5.3).

¹ Supplemento Ordinario G.U. n° 158 del 12.07.55

² Supplemento Ordinario G.U. n° 105 del 30.04.56

³ Supplemento Ordinario G.U. n° 256 del 12.11.94

5 PROCEDURE DI LAVORO

5.1 PRELIEVO DEL CAMPIONE

Il prelievo del materiale rappresenta la prima parte dell'intero processo analitico. Generalmente gli accertamenti analitici vengono effettuati su porzioni prelevate dal materiale o dalla merce oggetto del controllo (campioni). Le modalità di campionamento dovranno tener conto della uniformità di distribuzione dei residui e dello scopo per il quale vengono condotti i controlli. Il prelievo deve essere effettuato in modo da ottenere un campione sufficientemente rappresentativo affinché il risultato analitico ottenuto possa essere correlato al materiale di origine.

Per quanto riguarda i prodotti ortofrutticoli ed i cereali si fa riferimento al DM 20.12.80⁴; per gli altri alimenti, le acque destinate al consumo umano, le acque di scarico, i fanghi, i rifiuti, ecc. si rimanda alla normativa specifica in cui sono riportati i criteri per un campionamento rappresentativo.

In linea generale ad eccezione di materiali liquidi perfettamente omogenei, dovrà essere previsto il prelievo di più campioni elementari (CE) il cui numero, posizione, peso o volume sarà riferito alla grandezza del lotto da saggiare e al suo grado di uniformità. I CE riuniti e miscelati insieme costituiscono il campione globale (CG), dal quale per successive suddivisioni viene ottenuto il campione di laboratorio (CL) sul quale vengono condotte le analisi (campione propriamente detto).

Nel caso dei prodotti ortofrutticoli, il CG viene frazionato fino ad ottenere il campione finale (CF) dal quale si ricavano quattro o cinque aliquote perfettamente identiche, di cui una costituisce il CL, le altre costituiscono l' aliquota per l'analisi di revisione, l' aliquota a disposizione della magistratura per eventuale controperizia, l' aliquota del produttore, l' aliquota del detentore (campioni di riserva).

I criteri e le modalità del campionamento, anche se si riferiscono a procedure standard, devono essere descritte sul verbale o sulla scheda di prelievo; in certi casi può essere utile allegare schemi o diagrammi per indicare i modi e i luoghi in cui sono state prelevati i CE.

Nei casi in cui il prelievo è a carico del laboratorio, nel rapporto di prova (vedi § 5.11.1) saranno indicate le procedure di prelevamento. Se il prelievo non è stato effettuato dal laboratorio che esegue l'analisi, si dovrà specificare nel rapporto di prova.

I contenitori dei campioni devono garantire una buona tenuta, una completa inerzia chimica, non alterare lo stato fisico e la composizione originale del campione. Di norma sono utilizzati il vetro, il polietilene, il nylon. Se il campione è prelevato nella sua confezione originale, questa deve rimanere inalterata fino al momento dell'analisi.

⁴G.U. Serie Generale n° 8 del 09.01.1981

Sul contenitore del campione, o su un'apposita fascetta, devono essere chiaramente riportati gli estremi caratterizzanti il campione, riferiti ad un verbale o ad una scheda di prelievo.

Il contenitore deve permettere, nei casi previsti, una facile sigillatura a garanzia dell'integrità dell'aliquota.

5.2 REGISTRAZIONE E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Ad ogni campione viene assegnato un numero o codice di ingresso progressivo che sarà riportato sul contenitore, sulla fascetta, sul verbale o scheda di prelievo, sul foglio di analisi (vedi § 5.10) ed infine sul rapporto di prova. Tale numero o codice accompagna il campione durante tutte le fasi dell'analisi.

I dati e le informazioni relative al campione vengono riportati su un registro cartaceo, a fogli numerati ed insostituibili, o su un supporto magnetico in sistemi computerizzati protetti da possibili manomissioni o cancellazioni involontarie (registro di analisi). In tale registro saranno riportati successivamente i risultati finali delle analisi (vedi § 5.10).

Le informazioni essenziali da riportare sul registro al momento dell'arrivo del campione in laboratorio sono le seguenti:

- data di ricezione del campione
- natura del campione
- modalità di conservazione durante il trasporto al laboratorio
- condizioni del campione e del contenitore al momento della ricezione
- indicazioni sul detentore/produttore
- organismo prelevatore
- data, luogo, motivazione e modalità del prelievo
- ricerche richieste

In alcuni casi può essere richiesta la completa riservatezza del campione esaminato: in questo caso l'operatore addetto alle analisi avrà come unico riferimento il numero o il codice assegnato al campione.

Il campione deve essere opportunamente conservato durante e dopo il trasporto al laboratorio fino alla esecuzione delle analisi. In linea generale il campione viene conservato a temperatura refrigerata (0-4°C). Per campioni deperibili, se i tempi di inizio analisi superano le 48 ore, è consigliabile il congelamento a -20°C, salvo diversa indicazione. Una volta scongelato, il prodotto deve essere analizzato nel più breve tempo possibile. Nelle procedure operative deve essere specificato il metodo più idoneo alla conservazione. I luoghi di conservazione devono impedire contaminazione incrociata.

Qualsiasi altro trattamento di conservazione come ad esempio la liofilizzazione, l'essiccazione, la sterilizzazione, l'aggiunta di additivi, dovrà essere preliminarmente verificato nei confronti della stabilità del o dei principi attivi analizzati.

Eventuali aliquote di riserva relative allo stesso campione (analisi di revisione, magistratura, detentore, produttore) vengono registrate con lo stesso numero o codice e conservate in modo idoneo, per il tempo necessario, durante e dopo l'esecuzione delle analisi. Di questo si terrà nota in un apposito registro. Tali aliquote sono a disposizione degli interessati, su loro richiesta, nei modi e nei tempi previsti dalla norma. A garanzia della corretta conservazione, la temperatura di frigoriferi o congelatori deve essere controllata e registrata a intervalli prestabiliti. Sono preferibili sistemi di registrazione automatica della temperatura.

5.3 SELEZIONE DEL METODO DI ANALISI

I metodi di analisi utilizzati devono essere validi e sperimentati. Si può far riferimento:

- se esistenti, effettivamente praticabili e ragionevolmente aggiornati al progresso tecnologico e scientifico, a metodi ufficiali o a metodi normati, cioè definiti da enti normativi riconosciuti
- a metodi reperibili in letteratura sperimentati in uno o più laboratori

Sono preferibili metodi multiresiduo applicabili a più gruppi di sostanze validati da prove collaborative interlaboratorio.

I metodi saranno valutati preliminarmente circa la loro effettiva praticabilità tenendo conto anche della rapidità di esecuzione, dei costi, del grado di abilità richiesta. Per quanto riguarda l'analisi degli alimenti i metodi utilizzati devono essere conformi ai criteri contenuti nell'allegato n° 2 del D.M. 23.12.92⁵ e, come raccomandato, validati mediante prove collettive condotte in più laboratori per i principi attivi da determinare e le matrici da analizzare, conformemente ai protocolli adottati a livello internazionale. Per l'analisi dei residui in altre matrici come acqua, scarichi, suolo, rifiuti ecc., i criteri da seguire per la scelta del metodo e la sua validazione sono in linea generale gli stessi di quelli per gli alimenti.

Qualunque sia il metodo di analisi selezionato, il laboratorio dovrà condurre test di messa a punto e di valutazione dei requisiti di qualità di cui al paragrafo successivo (vedi § 5.4).

I dati relativi alla valutazione e validazione del metodo saranno documentati e conservati in un apposito registro disponibile in laboratorio (vedi § 5.6).

Nella scelta di un metodo di analisi è inoltre necessario tenere conto dell'aspetto sicurezza sia nei confronti dell'operatore che nei confronti dell'ambiente: sono preferibili

⁵ G.U. Serie Generale n°305 del 30.12.92.

in linea generale metodi di analisi che impiegano modeste quantità di solventi, che eliminano o riducono l'impiego di reagenti tossici o comunque pericolosi, che automatizzano le procedure riducendo l'intervento manuale dell'operatore.

Di ogni metodo sarà fatta una valutazione dei rischi (chimico, cancerogeno, fisico e infortunistico); verranno individuate le operazioni più pericolose e indicati i comportamenti più idonei da seguire, compreso l'utilizzo di dispositivi individuali di protezione; verranno raccolte le schede di sicurezza di ogni reagente utilizzato, che il fornitore è obbligato a trasmettere insieme al prodotto in lingua italiana, per allegarle alla documentazione relativa ai metodi di analisi e alle procedure operative.

Qualora il laboratorio non disponga di un supporto ritenuto necessario per una efficace tutela della salute e sicurezza nei confronti dell'operatore si dovrà procedere ad una scelta alternativa che offra sufficienti garanzie.

5.4 PARAMETRI DI QUALITÀ CHE CARATTERIZZANO IL METODO ANALITICO E LORO VALUTAZIONE

5.4.1 Precisione

E' il grado di concordanza fra i risultati ottenuti da numerose prove indipendenti sotto condizioni definite, applicando uno stesso metodo analitico su uno stesso materiale. Generalmente se misurata nello stesso laboratorio, con lo stesso operatore, in un breve intervallo di tempo, si indica come ripetibilità, se misurata in laboratori diversi, si indica come riproducibilità.

La precisione del metodo di analisi prescelto viene valutata dal laboratorio effettuando una serie definita di prove condotte nelle stesse condizioni in cui verranno effettuate le analisi sui campioni reali. Può risultare utile valutare separatamente la precisione di ogni fase del processo globale: estrazione, ripartizione, purificazione e analisi strumentale.

Il grado di imprecisione si ricava dal valore della deviazione standard percentuale o coefficiente di variazione percentuale (CV%) ottenuta da una prova simultanea effettuata su almeno sei distinte aliquote di campione.

La valutazione della precisione viene effettuata per ogni matrice, o per matrici simili, per ogni principio attivo, a più livelli di concentrazione scelti fra quelli più significativi.

Per la prova possono essere usati materiali di riferimento certificati (MRC) se disponibili, o matrici di riferimento preparate in laboratorio (MRL) preparate aggiungendo i principi attivi che si vogliono testare.

Il grado di imprecisione è correlato al livello di concentrazione dei residui sulla matrice che si deve analizzare.

In linea generale, per valutare l'accettabilità o meno del grado di imprecisione si può far riferimento al grafico di Horwitz⁶ dove il CV% interlaboratorio è correlato alla concentrazione dei RPF nella matrice.

Considerando inoltre, che il contributo dell'imprecisione intralaboratorio è calcolato essere pari circa a $2/3$ ⁷, si può ricavare la seguente tabella, che indica i valori massimi accettabili di CV% a cui il laboratorio può riferirsi:

Livello RPF (mg/kg)	Grado di imprecisione interlaboratorio CV%	Grado di imprecisione intra-laboratorio CV%
0.0001	64	43
0.001	45	30
0.01	32	21
0.1	23	15
1	16	11
10	11	7

5.4.2 Accuratezza

E' il grado di concordanza fra il valore medio di un certo numero di misure e il valore vero o presunto tale; viene espresso come percentuale del valore vero. L'accuratezza è correlata alla presenza di errori sistematici che determinano uno spostamento del valore trovato da quello reale. A differenza degli errori casuali, molti errori sistematici possono essere noti e quindi minimizzati o corretti.

Nell'analisi di RPF uno dei casi più ricorrenti di errore sistematico è l'estrazione incompleta degli analiti. Per questo in ogni laboratorio, preliminarmente alle analisi su campioni reali, devono essere condotte prove di recupero. Queste prove vengono condotte a diversi livelli di concentrazione compreso il livello "zero", cioè la matrice senza aggiunta, per ogni principio attivo e per ogni matrice, o matrici simili, almeno in doppio per avere nel contempo una stima della riproducibilità. Vengono utilizzate per questo MRC se disponibili, oppure MRL cioè matrici in cui precedentemente sia stata accertata l'assenza dei principi attivi da determinare, alle quali vengono addizionate quantità note delle sostanze attive.

Il grado di recupero viene calcolato per confronto con standard di calibrazione preferibilmente preparati in estratti di identica matrice non addizionata (§ 5.4.7: standard

⁶ Horwitz W. 1982. Anal. Chem. 54: 67A-76A.

⁷ Parker G.A. 1991. J. Assoc.Off.Anal.Chem. 74(5): 868-871.

di calibrazione in matrice) con lo scopo di ridurre gli errori dovuti ad effetto matrice che possono alterare la risposta strumentale.

Quando possibile è preferibile usare MRC o materiale in cui sia comunque noto il contenuto di residui, poiché la valutazione del recupero, specialmente nel caso di alimenti o di terreno, sarà più significativa in quanto le sostanze attive sono incorporate naturalmente e non addizionate artificialmente.

In ciascuna serie di analisi, le soluzioni standard di principi attivi usate per le aggiunte e per la preparazione delle soluzioni finali di calibrazione devono essere preparate dalle stesse soluzioni standard concentrate, nello stesso tempo e con le stesse diluizioni. Se passa molto tempo fra la preparazione degli standard di calibrazione "su matrice" e il controllo dei recuperi, è opportuno valutare la stabilità dei principi attivi nelle condizioni sperimentali.

Recuperi medi per ciascuna sostanza attiva compresi fra 80-100% in un range di 70-110% , purché ripetibili, sono generalmente accettabili.

5.4.3 Specificità

E' la stima della capacità di un metodo di individuare selettivamente un determinato analita tra altri interferenti. E' strettamente connessa con l'accuratezza: gli errori causati dalla presenza di composti interferenti sono fra gli errori sistematici più frequenti.

Il metodo deve essere selettivo per la classe di composti che si intendono analizzare. Le interferenze devono essere se possibile evitate o ridotte grazie ai processi di purificazione. Se inevitabili dovranno essere comunque individuate e separate dagli analiti. Per ogni matrice soggetta ad analisi sarebbe utile registrare il profilo cromatografico "naturale", in cui siano assenti residui di sostanze attive. Nel caso di coeluizione di un analita di interesse e di composti interferenti, deve essere previsto un metodo alternativo di purificazione o di determinazione.

E' importante assicurarsi che eventuali interferenze non provengano da contaminazione dei solventi, della vetreria o di altro materiale utilizzato per l'analisi. Per questo, sia i solventi che la vetreria verranno periodicamente controllati con analisi complete: la prova "bianco solventi" è un'analisi condotta su un campione ottenuto per concentrazione dei solventi utilizzati, nei volumi previsti dalla metodica; la prova "bianco vetreria" è un'analisi condotta su un campione ottenuto utilizzando tutto il materiale, i reattivi e i solventi previsti dalla metodica, con la sola esclusione della matrice. Se queste prove danno risultati soddisfacenti, si può procedere con l'analisi dei campioni.

5.4.4 Incertezza

L'incertezza di una misura è una stima quantitativa dell'intervallo entro cui, con una certa probabilità, può trovarsi il valore della grandezza da misurare, il così detto misurando.

L'incertezza è di norma espressa insieme al risultato analitico finale in termini di limiti di confidenza che indicano il range di valori entro cui ad un livello prestabilito di probabilità (generalmente il 95%) si trova il valore vero.

L'incertezza è la risultante degli errori casuali e degli errori sistematici di tutte le fasi del procedimento analitico. Non è quindi definibile come espressione della sola imprecisione, a meno che gli errori sistematici, in generale riconoscibili, non siano minimizzati o corretti.

L'incertezza random (U_r), risultante dagli errori casuali, è calcolata attraverso un trattamento statistico della deviazione standard (s) delle misure effettuate, del tipo:

$$U_r = t \ s / n^{1/2}$$

dove n è il numero delle misure e t è il coefficiente di Student.

Nel calcolo dell'incertezza complessiva (U_c), da associare al risultato analitico dovranno essere considerate inoltre tutte le possibili cause note di variabilità, se non trascurabili, come ad esempio l'incertezza dei materiali di riferimento o l'incertezza degli strumenti di misura.

Per il calcolo dell'incertezza può rappresentare un utile riferimento la "Guida per la dichiarazione dell'incertezza di misura" del SINAL (9).

L'incertezza stimata sarà riportata nel rapporto di prova insieme al risultato analitico.

5.4.5 Intervallo di linearità

Per ogni principio attivo da determinare deve essere prevista una curva di calibrazione di almeno tre punti più un bianco. Estrapolazioni per analisi quantitative devono essere condotte per valori compresi negli estremi del range di linearità della curva. Non sono ammesse estrapolazioni esterne a questo range.

Per ridurre gli effetti matrice e ottenere analisi quantitative più accurate, le soluzioni degli standard di calibrazione possono essere preparate direttamente nell'estratto di una matrice uguale o simile a quella che si intende analizzare (standard di calibrazione su matrice).

Quando il valore limite di riferimento è simile al limite di determinazione analitica, quest'ultimo rappresenta il punto più basso della curva di calibrazione.

5.4.6 Limite di determinazione analitica

Per ogni sostanza da determinare deve essere misurato il limite di determinazione analitica (LDA), cioè la minima quantità misurabile con un accettabile grado di accuratezza e precisione, che può essere diverso da matrice a matrice. Il LDA deve essere almeno la metà di un eventuale valore limite di riferimento per quella sostanza attiva. Il LDA deve essere riportato nel rapporto di prova per ogni sostanza attiva.

La valutazione del LDA viene effettuata seguendo le procedure previste ai paragrafi 5.4.1 e 5.4.2 per il livello inferiore di concentrazione che può essere distinto in modo significativo dal livello "zero" cioè dal "bianco".

Nel caso di analisi di residui su matrici alimentari, la sensibilità del metodo, in funzione dei limiti di riferimento, deve soddisfare almeno i seguenti requisiti ^{8,9}:

LMR o CMA (mg/kg)	LDA (mg/kg)
> 0.5	0.1
0.5-0.05	0.1-0.02
<0.05	LMR x 0.5

(LMR= limite massimo di residui, CMA= concentrazione massima ammessa).

In linea generale, un simile criterio può essere applicato anche ad altre matrici.

5.4.7. Standard di calibrazione

Il laboratorio dovrebbe disporre di standard di riferimento di ogni principio attivo nello stato fisico originale (liquido o solido); in alternativa, se questi non fossero reperibili, si possono utilizzare soluzioni a titolo noto.

Degli standard disponibili in laboratorio deve essere tenuto un apposito registro aggiornato dove annotare: nome del principio attivo, grado di purezza, stato fisico, data di acquisto, data di scadenza, fornitore, note sulla stabilità del composto, scheda di sicurezza, precauzioni nella manipolazione, uso di dispositivi di protezione individuale.

Una delle cause più ricorrenti di errore sistematico, con conseguente incremento dell'inaccuratezza analitica, è dovuta all'uso di standard di riferimento puri o soluzioni diluite di questi che hanno perso il titolo originale; uno dei modi per evidenziare questo tipo di errore è l'esecuzione di test interlaboratorio.

Il grado di purezza degli standard dei RPF deve essere elevato e conosciuto, preferibilmente certificato o comunque garantito. Il grado di incertezza richiesto per la purezza degli standard è correlato all'incertezza del metodo analitico adottato.

Devono essere rispettate le modalità di conservazione degli standard di riferimento: in linea generale a temperatura refrigerata, al buio, in contenitori di vetro il periodo di conservazione è di diversi anni. Se indicata, va rispettata la data di scadenza.

⁸ Direttiva CEE 94/43 in G.U. 2ª serie speciale n°83 del 31.10.94

⁹ D.L.vo n°194 del 17.03.1995 in Supplemento Ordinario G.U. n°122 del 27.05.1995

Dopo questa data, ed in generale per composti instabili, l'utilizzazione degli standard è vincolata a verifica del titolo da parte del laboratorio.

Stesse attenzioni devono essere riservate ai composti utilizzati come standard interni. Per standard interni si intendono degli analiti che vengono aggiunti:

- a) all'inizio del procedimento analitico: standard interno di processo (SIP),
- b) all'estratto finale prima dell'esame cromatografico: standard interno finale (SIF).

I composti di cui al punto a) devono avere caratteristiche chimico-fisiche uguali o il più possibile simili ai composti da determinare; la loro funzione è quella di evidenziare eventuali errori grossolani che si possono verificare durante l'intero procedimento analitico (§ 5.9.1.1) o di costituire, nei casi possibili, un valido sistema di quantificazione che rende indipendenti dalla misura accurata dei volumi e da perdite durante il procedimento analitico (es. analisi per diluizione isotopica).

I composti di cui al punto b) devono presentare elevata stabilità e nessuna reattività nei confronti degli analiti da determinare; la loro principale funzione è quella di migliorare la precisione analitica strumentale e permettere in cromatografia l'identificazione degli analiti attraverso l'uso dei tempi di ritenzione relativi.

Le soluzioni standard di calibrazione vengono preparate sciogliendo il composto in un solvente organico appropriato. Le soluzioni concentrate (100-1000 µg/ml) in linea generale sono stabili per molti mesi se tenute al riparo della luce, a bassa temperatura, in contenitori di vetro ben chiusi per evitare perdite per evaporazione. Le soluzioni diluite (10 µg/ml) hanno in genere un periodo di stabilità più breve (1-2 mesi). Le miscele di più sostanze possono essere meno stabili delle soluzioni dei singoli analiti. Le soluzioni di lavoro per effettuare le calibrazioni (0.1-2 µg/ml) vengono preparate fresche ogni volta. Tutte le soluzioni saranno correttamente etichettate.

La preparazione degli standard deve essere documentata sul quaderno di laboratorio. In caso di standard di riferimento certificati, dovrà essere conservata la certificazione.

Ogni volta che si preparano soluzioni standard deve essere registrata la data di preparazione, il solvente usato, il peso del principio attivo, il tipo di vetreria tarata e di dispensatori o microdispensatori tarati utilizzati, il nome dell'analista preparatore.

Da parte degli operatori devono essere prese tutte le precauzioni previste nei casi di manipolazione di sostanze tossiche o nocive descritte nelle procedure operative e nelle schede di sicurezza e indossare, se richiesto, appropriati dispositivi di protezione individuale (DPI).

Prima di procedere alla pesata o alla diluizione, il composto o la soluzione concentrata devono essere riportate a temperatura ambiente. Per la preparazione degli standard concentrati si pesano in genere almeno 10 mg di composto, direttamente in un matraccio tarato. Saranno prese le necessarie precauzioni per i composti particolarmente volatili, o per evitare evaporazione di solvente. Il solvente impiegato deve essere inerte nei confronti del composto, compatibile con il sistema di rilevazione analitico, non

volatile, possibilmente non tossico. La vetreria deve essere inerte nei confronti della sostanza e non adsorbire gli analiti. Talvolta può essere richiesto un trattamento di silanizzazione della vetreria impiegata.

I setti dei "vials" utilizzati nei sistemi automatici di introduzione dei campioni in GC, HPLC ecc. rappresentano una fonte di possibile contaminazione: è raccomandato il teflon e la loro sostituzione ogni volta che sono stati forati nel caso il campione debba essere conservato per successive analisi.

Le soluzioni di calibrazione, se necessario, possono essere preparate utilizzando al posto del solvente puro, un estratto ottenuto da una matrice uguale o simile a quella in cui i composti devono essere determinati, seguendo il procedimento analitico (standard di calibrazione su matrice). Per questo, in laboratorio dovrebbero essere disponibili matrici esenti da residui.

La vetreria usata per la preparazione degli standard non deve essere la stessa usata per l'analisi dei campioni.

Per ogni sostanza attiva deve essere fatto un controllo cromatografico (GC, HPLC, GC-MS) al fine di valutare il tempo di ritenzione, il fattore di risposta, lo spettro di massa, la stabilità termica in gascromatografia, la riproducibilità, la sensibilità, il campo di linearità. Per ogni sostanza attiva può essere valutato e quindi considerato l'effetto matrice, che può alterare il tempo di ritenzione e il fattore di risposta degli analiti.

5.5 VALIDAZIONE DEL METODO DI ANALISI

La validazione, o convalida del metodo di analisi, consiste nell'insieme delle sperimentazioni di cui ai paragrafi precedenti (§§ 5.4.1-5.4.6), attraverso le quali siano stati valutati e misurati i parametri di qualità del metodo, verificati come adeguati ai requisiti prefissati dal laboratorio per il tipo e lo scopo delle analisi, e sia stato possibile dimostrare, in ultima analisi, che il metodo fornisce risultati validi e quindi accettabili.

Il materiale documentale dei test di validazione del metodo deve essere conservato e disponibile in laboratorio (vedi § 5.6)

La validazione di un metodo analitico è condotta all'interno del laboratorio o preferibilmente coinvolgendo più laboratori in test collettivi, con l'eventuale supporto di esperti nella progettazione e nel trattamento statistico dei dati sperimentali.

5.6 DOCUMENTAZIONE DEL METODO DI ANALISI, DELLA SUA VALUTAZIONE E VALIDAZIONE.

Ogni metodo di analisi deve essere oggetto di un documento scritto, dettagliato in ogni parte, conservato in laboratorio e a disposizione del personale tecnico, codificato per essere facilmente identificabile e rintracciabile.

Deve essere presente e disponibile in laboratorio tutta la documentazione relativa alla sperimentazione seguita per la validazione del metodo di analisi compresi tracciati cromatografici, curve di calibrazione, grafici, spettri ecc.

Ogni variazione occasionale rispetto al metodo originale motivata e autorizzata sarà annotata sul foglio di analisi relativo al campione (vedi § 5.10). Se le modifiche sono significative e non episodiche, il metodo deve essere nuovamente validato e documentato.

La nuova edizione del metodo sostituisce la precedente.

Per la descrizione e documentazione della metodica di analisi è preferibile riferirsi alla norma ISO 78/2¹⁰ o al modello n° 948 della Commissione Tecnica ISO n° 34 (4).

Insieme all'elenco del materiale necessario, alle condizioni di utilizzo della strumentazione, alla descrizione del procedimento analitico, devono essere indicati fra l'altro: i principi attivi e le matrici per le quali la metodica è stata validata, le possibili interferenze, il limite di determinazione analitica per ogni principio attivo, l'incertezza stimata, il range di linearità, i controlli di qualità previsti, la data dell'ultima revisione, le avvertenze e norme di sicurezza per gli operatori.

Al metodo saranno allegate le schede di sicurezza di tutti i materiali utilizzati.

In caso di variazione significativa del metodo di analisi relativamente ad evoluzione tecnologica o metodologica, inclusione di nuovi principi attivi, estensione a diverse matrici da analizzare ecc., saranno di nuovo seguite le operazioni di valutazione e validazione del metodo.

5.7 PROCEDURA DI ANALISI

Rappresenta l'insieme delle operazioni che portano al risultato analitico finale e che in linea generale prevedono le seguenti fasi:

- preparazione e trattamento preliminare del campione
- estrazione degli analiti dalla matrice
- concentrazione e purificazione degli estratti
- determinazione analitica strumentale

Della procedura seguita deve essere tenuta annotazione sul foglio di analisi relativo ad ogni campione (§ 5.10).

5.7.1 Preparazione e trattamento preliminare

Il peso o il volume della porzione di campione di laboratorio da utilizzare per l'analisi (aliquota di analisi o aliquota da saggio) dipende dalla concentrazione dei residui nella matrice in esame. Ad esempio per le acque, in cui i livelli attesi di residui sono generalmente compresi fra 0.01 e 0.5 µg/l, l'aliquota di analisi sarà mediamente di 1 litro; per gli alimenti, in cui i livelli attesi di residui sono più alti di almeno tre ordini di

¹⁰ ISO 78/2-1981. Layout for a standard method of chemical analysis.

grandezza, viene generalmente utilizzata una porzione di alcuni grammi (10-100) dell'intero campione che può avere un peso di uno o più chilogrammi o un volume di uno o più litri.

Nel caso di campioni perfettamente omogenei non ci sono problemi nel prelevare aliquote di analisi rappresentative.

Diverso è il caso dei materiali solidi non omogenei. In questo caso il campione di laboratorio, possibilmente nella sua totalità, dovrà essere disgregato, frantumato, finemente macinato od omogeneizzato, in modo che la porzione prelevata per l'analisi sia rappresentativa dell'intera aliquota. In questa fase si dovranno evitare i surriscaldamenti che potrebbero causare degradazione termica di alcuni principi attivi.

Quando, per ragioni di volume eccessivo, non è possibile utilizzare l'intero campione di laboratorio, si procederà ad un prelievo per quarti contrapposti fino alla riduzione voluta della massa.

Per alcuni principi attivi (esempio i ditiocarbammati sui prodotti vegetali freschi) può essere richiesta una frantumazione non eccessiva del campione.

Nel caso di prodotti ortofrutticoli, prima di procedere a qualsiasi trattamento di frantumazione del campione di laboratorio, devono essere scartate le parti da non sottoporre ad analisi come previsto dalla normativa¹¹: peduncolo, buccia, guscio, residui terrosi ecc. In questo modo dal campione di laboratorio si ottiene il così detto campione di analisi.

Contemporaneamente alla aliquota di analisi, vengono preparate in numero sufficiente, dal campione di laboratorio, identiche porzioni da conservare e utilizzare in caso di ripetizione della prova per errori, incidenti o eventuali conferme. Le porzioni di riserva, nel caso di prodotti deperibili, vengono immediatamente congelate a -20°C.

L'aliquota di analisi deve essere trattata singolarmente e separatamente da altri campioni in modo da evitare rischi di contaminazione incrociata.

Dopo ogni operazione, il materiale d'uso da laboratorio riutilizzabile, deve essere perfettamente ripulito, prima di procedere all'analisi successiva.

Possono essere aggiunti in questa fase eventuali reattivi o coadiuvanti di estrazione.

5.7.2 Estrazione e purificazione

Di norma è preferibile procedere con l'estrazione e la purificazione del campione immediatamente dopo la fase di pretrattamento.

Generalmente in questa fase il campione in esame viene trattato direttamente con un solvente che estrae i principi attivi dalla matrice.

Alcuni metodi prevedono in via alternativa la dispersione del campione (solido o liquido) su materiale inerte adsorbente prima del trattamento di estrazione con solvente.

¹¹ D.M. 09.08.95 in Supplemento Ordinario G.U. n°252 del 27.10.95.

Nel caso di campioni liquidi, come acqua e altre bevande, o liquefacibili, l'estrazione è comunemente condotta per passaggio attraverso una fase solida adsorbente (colonna cromatografica o membrana) o anche per semplice contatto (fibra), riducendo in questo caso l'uso e il consumo di solvente e producendo al tempo stesso una parziale purificazione dell'estratto.

Durante la fase di estrazione devono essere evitati i surriscaldamenti che potrebbero causare degradazione termica dei principi attivi, reazioni indesiderate con la matrice o perdita del solvente per evaporazione.

Se parametri come la temperatura o il pH sono importanti ai fini dell'efficienza di estrazione, questi dovranno essere misurati ed eventualmente corretti durante la fase di estrazione di ogni campione.

Di norma la soluzione risultante viene concentrata per evaporazione del solvente a pressione ridotta. La concentrazione degli estratti è un punto critico dell'intero processo analitico. Portare l'estratto completamente a secco sotto vuoto può comportare perdite dei principi attivi più volatili. L'evaporazione del solvente deve essere condotta alla temperatura più bassa possibile per ridurre il rischio di degradazione termica o di perdita per evaporazione del principio attivo. La pressione ridotta può provocare ebollizione turbolenta e quindi rischio di perdita di materiale. Per evaporazioni su piccola scala è consigliabile l'evaporatore centrifugo o un flusso di azoto secco: l'aria è sconsigliata a causa del suo potere ossidante. Devono essere usate comunque tutte le precauzioni per ridurre il rischio di perdite per evaporazione dei principi attivi più volatili.

Se necessario, l'estratto verrà purificato per eliminare o ridurre la presenza di coestratti che possono interferire analiticamente o che possono danneggiare o alterare i sistemi di rilevazione strumentale. Generalmente la purificazione viene condotta per ripartizione liquido-liquido o per cromatografia.

L'estratto purificato, pronto per l'analisi finale, deve essere portato a volume con vetreria tarata non inferiore a 1 ml. Se non è possibile misurare esattamente il volume finale, dovrà essere previsto l'uso di un opportuno standard interno.

Se si usano vials o provette con tappo in materiale plastico, è necessario orientarsi su setti rivestiti in politetrafluoroetilene (PTFE). I "vials" sono prodotti tipicamente monouso, specialmente i setti, di cui è raccomandata l'immediata sostituzione dopo l'uso, se la soluzione deve essere conservata per successive operazioni.

5.7.3 Determinazione strumentale

Gli strumenti comunemente utilizzati nell'analisi di residui sono: gas cromatografi con rivelatori selettivi (es. ECD, NPD, FPD), gas cromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC/MS), cromatografi per HPLC con vari rivelatori (es. UV, UV-DAD, spettrofluorimetro), spettrofotometri di assorbimento molecolare (UV-visibile), cromatografi liquidi preparativi (es. GPC, come tecnica di purificazione).

Per quanto riguarda la taratura, la calibrazione, la manutenzione ordinaria e straordinaria degli strumenti di analisi e il relativo registro delle apparecchiature, è stato già detto al paragrafo 3.3.

Opportuni standard di calibrazione dovranno regolarmente verificare le prestazioni (sensibilità, riproducibilità, linearità, risoluzione ecc.) ed indicare la perfetta efficienza di ogni parte dell'apparecchiatura, che, nel caso di insoddisfacente risposta, dovrà essere riportata nelle condizioni ottimali o eventualmente sostituita. Dell'esecuzione dei test deve rimanere traccia sulla scheda di verifica della performance strumentale.

Particolari accorgimenti consentono di prolungare e mantenere costante l'efficienza analitica degli strumenti: uso di precolonne, pulizia dei liner di iniezione, sostituzione dei setti di iniezione, pulizia dei rivelatori, filtrazione e purificazione delle fasi mobili, ecc. Gli interventi più significativi sullo strumento e sulle parti analitiche di questo verranno riportati sulla scheda di manutenzione.

Particolari analiti termicamente instabili vanno incontro a decomposizione durante l'analisi gascromatografica. La determinazione quantitativa di queste sostanze può presentare difficoltà. Sarà pertanto necessario trovare alternative analitiche non distruttive (es. HPLC).

L'analisi di particolari sostanze per GC o HPLC può prevedere una loro derivatizzazione per aumentare la volatilità o la sensibilità. La derivatizzazione può essere condotta in modo "off-line" oppure "on-line". In ambedue i casi, prima di procedere all'analisi dei campioni, deve essere verificata la resa e la riproducibilità di reazione.

5.7.3.1 Analisi qualitativa

L'identificazione delle sostanze viene effettuata sulla base dei tempi di ritenzione, o meglio dei tempi di ritenzione relativi o degli indici di ritenzione.

5.7.3.2 Analisi di conferma qualitativa

Considerata la molteplicità di possibili interferenti presenti anche in estratti purificati, l'identificazione degli analiti deve essere confermata. L'utilizzo critico o la combinazione di tecniche diverse come l'uso di una seconda colonna cromatografica a diversa polarità, l'analisi con un diverso rivelatore, l'esame dello spettro ultravioletto, l'analisi in GC-FTIR, l'analisi in GC/MS, rappresentano metodi di conferma qualitativa con gradi di affidabilità crescenti.

5.7.3.3 Analisi quantitativa

E' necessario disporre di un sistema in grado di misurare accuratamente le aree o le altezze dei picchi cromatografici.

L'aggiunta di uno standard interno alla soluzione (standard interno finale), prima dell'iniezione nel sistema cromatografico, rende indipendenti dal determinare esattamente il volume iniettato e aumenta la riproducibilità strumentale.

Il calcolo delle concentrazioni dei componenti viene effettuato per confronto con opportuni standard di calibrazione (preferibilmente multilivello) o con il metodo delle aggiunte note, che risulta generalmente più accurato. Per le modalità di preparazione degli standard di calibrazione e delle curve di calibrazione si rimanda al paragrafo 5.4.7.

L'aggiunta di uno standard interno al campione all'inizio del procedimento analitico (standard di processo), nell'ipotesi che si tratti di una sostanza dal comportamento chimico e cromatografico identico o molto simile agli analiti da determinare, può costituire un valido sistema di quantificazione che rende indipendenti dalla misura accurata dei volumi e dalle eventuali perdite durante la fase preparativa. La tecnica della diluizione isotopica in GC-MS rappresenta il metodo più rigoroso di analisi quantitativa.

5.7.3.4 Accettabilità del risultato analitico

Nel caso in cui le conferme qualitative per una sicura identificazione dell'analita e eventuali conferme quantitative, siano state soddisfacenti e, qualora le prove di controllo di qualità di cui ai paragrafi successivi (5.9 e 5.10) abbiano dato esito positivo e ovviamente sia stato escluso ogni tipo di contaminazione involontaria del campione, il risultato analitico è accettato sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo.

5.8 CRITERI DI CONFERMA DEL SUPERAMENTO DI VALORI LIMITE DI RIFERIMENTO

Se il valore riscontrato di un principio attivo supera un valore di riferimento, limite massimo di residui (LMR), prima di esprimere l'esito sfavorevole, deve essere considerata l'incertezza stimata e dichiarata dal laboratorio nell'analisi di quel principio attivo in quella matrice (§ 5.4.4).

L'esito sarà sfavorevole e quindi il campione risulterà irregolare, quando l'intervallo di confidenza associato al risultato e calcolato dal valore dell'incertezza dichiarata dal laboratorio, è collocato interamente sopra il LMR.

5.9 CONTROLLO DI QUALITÀ

Il laboratorio sottopone la propria attività analitica a continua verifica attraverso controlli interni ed esterni in modo da evidenziare perdite o carenze di qualità e adottare le misure correttive o preventive necessarie.

5.9.1 Controllo di qualità intralaboratorio

Una procedura di controllo interno di qualità ha lo scopo di valutare il verificarsi di variazioni della precisione e dell'accuratezza, e quindi di valutare l'attendibilità dei risultati analitici di una serie di campioni analizzati. Permette di evidenziare errori grossolani o sistematici e consente il monitoraggio delle proprie prestazioni nel tempo garantendo il rispetto dei livelli di qualità prestabiliti. Può essere condotto utilizzando vari metodi; qui vengono riportati due test fra i più comuni.

5.9.1.1 Aggiunta di standard di processo

Si tratta di un controllo che viene fatto per ogni campione in analisi. Ad ogni campione viene aggiunto uno o più analiti simili a quelli che devono essere analizzati, che abbiano un comportamento chimico analogo e che non interferiscano con gli analiti di interesse (standard interno di processo).

Nel caso di analisi multiresiduo, dove gli analiti ricercati possono essere qualche centinaio, è impossibile individuare standard interni rappresentativi per tutte le classi di composti. Tuttavia l'aggiunta anche solo di alcuni di questi, scelti in modo opportuno, può risultare un utile riferimento, in quanto consente di individuare cadute di precisione o segnalare la presenza di errori grossolani verificatisi nel corso delle analisi.

Nel caso di analisi in GC/MS possono essere usati come standard interni opportuni isotopi delle sostanze che devono essere determinate. In questo caso può essere usata la tecnica della diluizione isotopica per l'analisi quantitativa.

5.9.1.2 Campione di controllo

Per ogni serie analitica di campioni, viene analizzato parallelamente un campione di controllo costituito da materiale di riferimento: se disponibile, materiale di riferimento certificato, in alternativa, materiale costituito da una matrice uguale o simile ai campioni da analizzare di cui si conosca il contenuto in RPF, o esente da residui a cui viene aggiunta una miscela di diversi principi attivi opportunamente scelti in concentrazione nota (materiale di riferimento preparato in laboratorio).

La dimensione della serie analitica, cioè la cadenza con cui condurre i controlli è in funzione del tipo, del numero, della frequenza dei controlli effettuati e dell'organizzazione del lavoro al proprio interno; analisi particolarmente complesse come quelle condotte sugli alimenti, richiedono una frequenza di "controlli" almeno del 20%; per accertamenti non routinari può essere necessario anche un controllo per ogni campione.

Il tipo, il numero e la quantità dei principi attivi aggiunti alla matrice di controllo varia in funzione delle esigenze:

- la quantità aggiunta, e quindi la concentrazione attesa nel campione di controllo, può essere quella più frequentemente riscontrata nei campioni

- la quantità aggiunta, e quindi la concentrazione attesa nel campione di controllo, può essere pari al limite di riferimento, in modo da avere una idea immediata dei superamenti di alcune sostanze attive
- la quantità aggiunta, e quindi la concentrazione attesa nel campione di controllo, può essere uguale al LDA in modo da avere un controllo sulla sensibilità del metodo ed evitare “falsi negativi”
- i principi attivi aggiunti, scelti fra le varie classi di composti, possono essere quelli riscontrati più frequentemente e analiticamente più critici, in modo che il metodo e l'operatore siano sottoposti a continua verifica

5.9.1.3 Carta di controllo

Il calcolo dei recuperi sul campione di controllo viene condotto come indicato al paragrafo 5.4.2. I risultati ottenuti ai paragrafi 5.9.1.1 e 5.9.1.2 vengono riportati su una carta di controllo in cui è stato evidenziato il campo di accettabilità (es. recuperi 70-110%).

La carta di controllo permette una documentazione sistematica dei risultati analitici e consente di visualizzare graficamente la loro tendenza. Permette quindi all'operatore di intervenire prontamente all'instaurarsi di una situazione “anomala” o di “allarme”.

Nel caso che i risultati dei controlli di cui ai paragrafi precedenti non siano accettabili, saranno ripetute le analisi sul campione o sui campioni relativi alla serie analitica a cui i controlli si riferiscono. Se l'incertezza persiste, il risultato può essere espresso indicando che la serie è fuori controllo.

5.9.2 Controllo di qualità interlaboratorio

Ogni laboratorio partecipa ad un programma di controllo di qualità interlaboratorio in circuiti locali, nazionali o internazionali, per una valutazione obiettiva dell'affidabilità delle proprie prestazioni. Il laboratorio si rende disponibile a collaborare in termini precisi e vincolanti.

Lo scopo è quindi quello di valutare e migliorare la propria accuratezza e di verificare nel tempo la comparabilità dei risultati forniti da laboratori che eseguono uno stesso tipo di analisi.

Vengono utilizzati opportuni campioni di controllo costituiti:

- da materiale di riferimento certificato (MRC), se disponibile, o altro materiale di riferimento comunque garantito dall'organismo che lo ha preparato
- da materiale di riferimento preparato dai laboratori che partecipano al circuito

Il test viene periodicamente effettuato dal laboratorio sul campione di controllo incognito che verrà analizzato insieme ai campioni di routine. I risultati sono trasmessi all'organismo incaricato della loro elaborazione e valutazione.

I campioni di controllo devono essere omogenei e stabili per tutto il periodo della prova; l'organismo che fornisce tali campioni deve averli testati precedentemente circa la loro omogeneità, il contenuto degli analiti e la loro incertezza analitica; dovranno essere noti eventualmente altri dati sulla composizione della matrice, da comunicare ai laboratori sottoposti alla prova.

Se i risultati trasmessi dal laboratorio non soddisfano i criteri minimi di accettabilità, questo dovrà correggere al più presto i propri errori prima di riprendere il normale ciclo analitico.

5.10 DOCUMENTAZIONE DELLA PROVA E DEL CONTROLLO DI QUALITÀ

Per ogni campione analizzato deve essere compilata una scheda (foglio di analisi) in cui dovranno essere riportati: numero o codice identificativo del campione, tipologia del campione, analisi e ricerche richieste, estremi del verbale o della scheda di prelievo, metodo analitico utilizzato, calcoli e risultati delle analisi, data di inizio e di fine analisi, esito delle conferme qualitative e quantitative, esito dei test di controllo di qualità, nome e firma degli analisti.

Ogni modifica apportata sul foglio di analisi non deve nascondere la versione precedente. Devono inoltre essere conservati cromatogrammi, spettri, curve di calibrazione e il resto dei dati grezzi relativi al campione in esame ed essere documentate e disponibili le carte di controllo di qualità relative.

Se disponibili in laboratorio sistemi informatici, i dati cromatografici e spettroscopici relativi alla prova, alla conferma qualitativa e quantitativa, insieme al metodo di integrazione e calcolo, possono essere archiviati su supporto magnetico.

I risultati analitici del laboratorio devono essere registrati e archiviati nel registro di analisi nel rispetto del segreto professionale e comunque secondo quanto previsto dalla normativa vigente e conservate per un periodo di almeno 10 anni ¹².

I registri di analisi possono essere cartacei o magnetici, se il laboratorio dispone di sistemi di gestione informatici, e prevedere sistemi di sicurezza circa le manomissioni o le modifiche non autorizzate (vedi § 5.2).

5.11 TRASMISSIONE DEI RISULTATI

I risultati analitici dovrebbero essere espressi insieme alla loro incertezza con un numero di cifre significative ad essa correlata.

I risultati analitici sono riportati nel rapporto di prova.

¹² D.L.vo 120/92 in Supplemento Ordinario G.U. n°40 del 18.02.92.

5.11.1 Rapporto di prova

Secondo quanto previsto dalla norma UNI CEI EN 45001 e dalla guida ISO n° 25¹³ gli elementi necessari da riportare sul rapporto di prova sono i seguenti:

- identificazione giuridica del laboratorio
- numero progressivo del rapporto di prova e data di emissione
- descrizione del campione
- identificazione del committente
- estremi del verbale o scheda di prelievo
- data e possibilmente ora del ricevimento del campione in laboratorio
- indicazione delle modalità di trasporto del campione, di detenzione fino alla conclusione delle analisi, di conservazione delle aliquote di riserva, riferite alla temperatura
- data di inizio e di conclusione delle analisi
- estremi del verbale di apertura del campione e di inizio analisi nei casi in cui sia previsto
- numero o sigla identificativa dell' aliquota sottoposta ad analisi
- modalità dei trattamenti preliminari del campione
- metodo di analisi: con un codice se ufficiale, con sintetica descrizione o riferimento bibliografico negli altri casi; devono essere segnalate eventuali modifiche occasionali ai metodi indicati
- risultati e loro incertezza espressi con le unità di misura ISO; nei casi di "assenza" esprimere il risultato come inferiore al LDA
- dichiarazione che il rapporto di prova non può essere utilizzato, in tutto o in parte, a scopo pubblicitario o promozionale, senza l'autorizzazione del laboratorio
- conclusioni circa l'esito complessivo della prova
- indicazione del luogo di conservazione delle aliquote di riserva, dei dati grezzi, dei calcoli, delle carte di qualità e altra documentazione prevista dal PAQ adottato nell'esecuzione della prova
- firma dei responsabili tecnici dell'analisi
- numerazione delle pagine

Relazioni e fatturazioni devono essere riportate in un documento separato.

5.11.2 Casi di irregolarità

In ogni campo dell'attività di controllo dei residui di prodotti fitosanitari, ogni

¹³ ISO/IEC. 1990. Guide 25 (prevista revisione entro il 1997).

superamento di valori limite di riferimento prevede una serie di comportamenti secondo quanto stabilito dalle norme che regolano le diverse materie: igiene degli alimenti, igiene delle acque destinate al consumo umano, igiene degli ambienti confinati, inquinamento idrico e del suolo.

Nel campo dell'igiene degli alimenti, il comportamento da seguire nel caso di violazione dell'articolo 5 lett. h) della legge 283/62, quando siano cioè superate le concentrazioni massime ammesse di residui di prodotti fitosanitari negli alimenti, indicate in ordinanze e decreti ministeriali, prevede la trasmissione delle seguenti comunicazioni:

- comunicazione per raccomandata AR agli interessati che risultano dal verbale di prelevamento, nella quale sarà indicata l'irregolarità riscontrata, l'articolo o gli articoli della legge trasgrediti, la possibilità e le modalità per la richiesta di revisione di analisi. Alla comunicazione è allegato il rapporto di prova
- comunicazione all'organo prelevatore per raccomandata AR nella quale sarà indicata l'irregolarità riscontrata, l'articolo o gli articoli della legge trasgrediti, e alla quale si allegano: copia della comunicazione agli interessati, copia del verbale di prelevamento, rapporto di prova
- comunicazione alla Azienda USL (quando non coincidente con l'organo prelevatore) nel cui territorio è stato effettuato il prelevamento, identica alla precedente, allegandovi gli stessi documenti
- comunicazione al dipartimento regionale competente, circa l'irregolarità riscontrata ed indicazioni sulla provenienza del prodotto risultato non conforme, per i provvedimenti di competenza

La procedura è identica nel caso di presenza nel campione di residui che indichino un utilizzo di prodotti fitosanitari non autorizzati sulla coltura, come previsto e punito dall'art. 23, 2° comma, D.L.vo 15.05.95 n° 194.¹⁴

Il laboratorio che ha eseguito l'accertamento conserva in modo adeguato le aliquote di riserva. Nel caso di richiesta di revisione di analisi, il laboratorio stesso o l'ente prelevatore, inviano nei modi e nei tempi previsti l'aliquota relativa assicurando la perfetta conservazione ed integrità (vedi paragrafo successivo).

5.11.3 Trasmissione aliquota per revisione di analisi

Per quanto si riferisce a casi di irregolarità su prodotti alimentari, l'aliquota per la revisione di analisi viene inviata all'Istituto Superiore di Sanità su richiesta dell'interessato, che provvederà al versamento della quietanza prevista dai tariffari vigenti e all'indicazione dell'Avvocato di fiducia e del suo indirizzo postale completo.

¹⁴ Supplemento Ordinario G.U. n°122 del 27.05.95.

L'aliquota per la revisione deve essere trasferita celermente all'Istituto Superiore di Sanità e in condizioni (preferibilmente surgelata) tali da assicurare l'integrità della confezione e del campione.

L'aliquota per la revisione sarà accompagnata dai documenti relativi al prelievo (verbale), all'analisi (rapporto di prova) e alla metodica seguita, in originale o in copia conforme.

Tutti i documenti, compreso il contrassegno che accompagna il campione, devono essere leggibili e regolarmente firmati e tutti i dati di identificazione devono corrispondere a quelli riportati sul verbale di prelevamento.

5.11.4 Trasmissione dei risultati al Ministero della sanità

Periodicamente i risultati delle analisi relative al controllo ufficiale sui residui negli alimenti e nelle acque destinate al consumo umano, vengono trasmessi per via telematica al Ministero della Sanità, nell'ambito del programma generale di raccolta informatizzata dei risultati dei controlli periferici su alimenti e acque potabili, utilizzando le stazioni di lavoro collocate in ogni laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

- (1) KEITH, L.H., W. CRUMMETT, J. DEEGAN JR., R.A. LIBBY, J.K. TAYLOR, G. WENTLER. 1983. Principles of environmental analysis. *Anal.Chem.* 55: 2210-2218.
- (2) CALARESU G. 1994. Guida all' applicazione delle "Buone Pratiche di Laboratorio (GLP)" nei laboratori di analisi. *S.E.F., Milano.*
- (3) CALARESU G., A. RIBERZANI, A. ORRU', G.CHESSA, C. TESTA, G. DEIANA. 1996. Incertezza analitica e utilizzo dei risultati di laboratorio nell' ambito dei controlli sugli alimenti. *Boll.Chim.Igien.* 47: 235-238.
- (4) CONI E., L.CROCI, R. DRAISCI, M. GIANFRANCESCHI, B. PASOLINI, E. SANZINI, A. STACCHINI. 1996. Linee guida per l'assicurazione della qualità nei laboratori preposti al controllo ufficiale dei prodotti alimentari. *Rapporto ISTISAN 96/1.* ISS - Istituto Superiore di Sanità - Roma.
- (5) GARFIELD F.M. 1991. Quality assurance principles for analytical laboratories. *J. Assoc.Off.Anal.Chem. Int., Gaithersbury, Maryland 20877-2417 USA.*
- (6) HILL A.R.C. 1995. Quality control for pesticide residues analysis, MAFF 1994. *Boll.Chim.Igien.* 46: 345-369.
- (7) MILLER G. 1992. Manuals of food quality control-13.Pesticide residue analysis in the food control laboratory. *FAO - Rome, Italy.*
- (8) WELACH/EURACHEM. 1994. Accreditation for chemical laboratories, guidance on the interpretation of the EN-45000 series of standards and ISO/IEC guide 25. *Boll.Chim.Igien.* 45: 400-437.
- (9) SINAL. 1995. Guida per la dichiarazione dell' incertezza di misura, DT-0002.

*Direttore dell'Istituto Superiore di Sanità
e Responsabile scientifico: Giuseppe Benagiano*

Direttore responsabile: Vilma Alberani

*Stampato dal Servizio per le attività editoriali
dell'Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 ROMA*

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.*

Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Roma, settembre 1997 (n. 3) 4° Suppl.

*La responsabilità dei dati scientifici e tecnici
pubblicati nei Rapporti e Congressi ISTISAN è dei singoli autori*