

ANALISI DEI RESIDUI DI AGROFARMACI: INFLUENZA DEL METODO DI CAMPIONAMENTO

D. SCARPA¹, M. DEMARTINI^{1,2}, R. CAPURRO¹, T. DEMAESTRI^{1,2}

¹Sata srl - Str. Alessandria, 13, 15044 Quargnetto (AL)

²Cadirlab srl - Str. Alessandria, 13, 15044 Quargnetto
r.capurro@satasrl.it

RIASSUNTO

E' stato approfondito lo studio degli effetti di due differenti metodologie di campionamento applicate in diversi contesti di distribuzione di agrofarmaci. Il primo sistema di campionamento (Codex) è stato effettuato seguendo le istruzioni Codex (CAC/GL 33-1999) mentre il secondo metodo di campionamento (Random) è un sistema di campionamento semplificato più simile alle normali condizioni operative. Tutte le fasi del campionamento e del processo di misurazione sono state progettate utilizzando disegni sperimentali gerarchici. I dati ottenuti sono stati interpretati attraverso l'utilizzo di test statistici uni e multivariati con l'obiettivo di individuare eventuali differenze del risultato analitico dovute al sistema di campionamento utilizzato e di isolare l'incertezza del dato finale attribuibile al sistema di campionamento e quella attribuibile al sistema di misura. L'interpretazione dei dati ha confermato l'importanza del campionamento sul risultato del sistema di misurazione confermando come tecnica privilegiata quella suggerita dal Codex in special modo su tecniche trattate con sistemi di distribuzioni non uniformi. Uno passo importante per la rappresentatività del risultato finale sembra essere la composizione del campione di laboratorio.

Parole chiave: codex, random, PCA

SUMMARY

PESTICIDE ANALYSIS: INFLUENCE OF THE SAMPLING METHOD

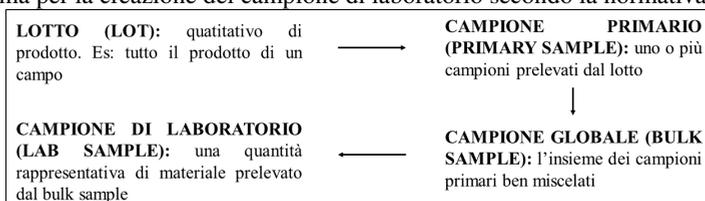
The differences between two methods for crop sampling were investigated using univariate and multivariate analyses. The sampled crops were first sprinkled with pesticides using different distribution systems: rods or atomizers. Two different sampling methods were then performed: a first method that follows the Codex guide (CAC/GL 33-1999), called Codex to make it simple, was performed by sampling 6 sub-samples walking across each field following an "X"-shaped path. The 6 sub-samples were then mixed and the laboratory samples were collected. The second kind of sample procedure, called Random, was performed walking randomly across the field and collecting 2 or 3 different laboratory samples, one for each sample point. All the samples were then sent to the laboratory that determined the pesticide residues and provided a complete replication of each single measurement. The data were then analyzed using first univariate statistical techniques and then investigated using Principal Component Analysis (PCA) followed by Analysis of variance (Anova). The aim of the analysis was to discover differences in pesticide concentration due to the different sampling procedures and to separate the uncertainty of the final data linked to the sampling system from the uncertainty linked to the measuring system. The analysis of the data leads to interesting conclusions: Codex seems to be the best sampling method especially when the distribution of pesticides is not uniform. The composition of the laboratory sample seems to be very important for the quality of the analytical results.

Keywords: codex, random, PCA

INTRODUZIONE

Il campionamento è riconosciuto come una fase determinate per l'utilità del dato analitico: una buona misurazione di laboratorio è spesso poco utile se a monte è stato effettuato un campionamento non rappresentativo del lotto oggetto di indagine. Anche per la ricerca di residui di agrofarmaci per il settore ortofrutticolo sono state ufficializzate linee guida per gli operatori del settore. Queste linee guida dovrebbero rappresentare l'approccio corretto per il "buon campionamento" ma troppo spesso per fretta o superficialità sono applicate in modo approssimativo (Figura 1).

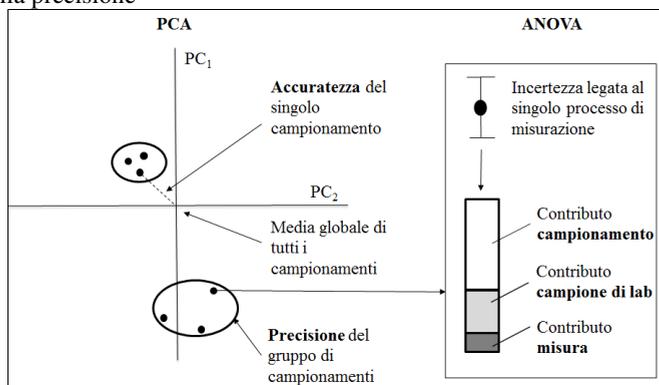
Figura 1. Schema per la creazione del campione di laboratorio secondo la normativa Codex



L'obiettivo del lavoro è confrontare due metodi di campionamento applicati in pre-raccolta su colture di sedano, insalata e pesche: il primo metodo segue la procedura di prelievo consigliata dal Codex Alimentarius (CAC/GL 33-1999) e dal DM 23 luglio 2003, prevedendo quindi la costituzione di un campione globale da cui si ricava il campione di laboratorio, mentre il secondo, denominato Random, non prevede la costituzione di un campione globale in quanto le aliquote di campione elementare prelevate in zone diverse del campo sono esse stesse già campioni di laboratorio.

Il presente studio approfondisce il lavoro presentato dagli stessi autori in occasione delle Giornate Fitopatologiche 2012 (Benzi *et al.*, 2012), con l'obiettivo di determinare almeno qualitativamente l'accuratezza e la precisione dei risultati analitici ottenuti dalle due procedure di campionamento (Figura 2).

Figura 2. Rappresentazione schematica della accuratezza, precisione e scomposizione della varianza legata alla precisione



In Figura 2 sono rappresentati 6 risultati ottenuti da due tipologie di campionamento. Ogni punto rappresenta le coordinate in un sistema di assi ortogonali ottenuti dalla combinazione delle concentrazioni di residui rilevati sul set di campioni. La distanza di ogni oggetto (punto)

dal centro degli assi cartesiani (media globale delle concentrazioni misurate) rappresenta l'accuratezza con cui sono stati determinati i residui che caratterizzano il punto mentre la vicinanza dei punti appartenenti allo stesso tipo di campionamento rappresenta la precisione che ci si può aspettare dall'esecuzione di tutti i passi del processo (dal campionamento all'analisi di laboratorio). I risultati di ciascun singolo campionamento possono essere poi analizzati mediante tecniche statistiche per scomporre l'incertezza legata a ciascun campionamento secondo i contributi: tipo di campionamento, composizione del campione di laboratorio e sistema di misurazione utilizzato.

MATERIALI E METODI

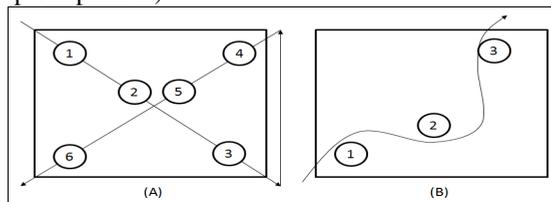
Campionamento: l'attività di campionamento ha coinvolto 4 aziende agricole, 3 in Piemonte (pesche e sedani) e 1 in Abruzzo (insalate) come descritto in Tabella 1. Le colture di sedano e insalate sono state trattate con differenti prodotti fitosanitari distribuiti con irroratrici a barra mentre le pesche sono state trattate con l'ausilio di atomizzatori.

Tabella 1. Campionamenti eseguiti

CODICE	COLTURA	REGIONE	PROVINCIA	CAMPIONAMENTI	DATA
In1	Insalata	Abruzzo	L'Aquila	1 Codex + 1 Random	3/7/2013
Sd1	Sedano	Piemonte	Alessandria	2 Codex + 2 Random	15/7/2013
Sd2	Sedano	Piemonte	Alessandria	1 Codex + 1 Random	30/7/2013
Ps1	Pesche	Piemonte	Cuneo	2 Codex + 2 Random	7/8/2013
Ps2	Pesche	Piemonte	Cuneo	2 Codex + 2 Random	30/8/2013

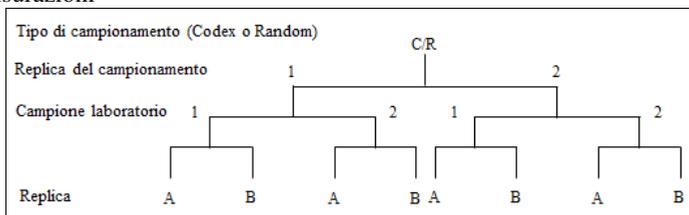
I campionamenti Codex e Random sono stati eseguiti secondo lo schema presentato in Figura 3. Il campionamento Codex è stato effettuato percorrendo una "X" nel campo ed effettuando 6 diversi prelievi (*primary sample* – Figura 1) coprendo così in modo omogeneo la superficie del campo. I campioni primari sono stati miscelati costituendo il *bulk sample* dal quale sono state prelevate 2 o 3 aliquote (*lab sample* – figura 1) poi inviate al laboratorio. Il campionamento Random è stato effettuato percorrendo un cammino casuale nel campo e prelevando 2 o 3 campioni che costituiscono direttamente i campioni inviati al laboratorio.

Figura 3. Esempio di campionamento Codex (a) effettuato prelevando 6 *primary sample* nel campo e campionamento Random (b) effettuato prelevando 3 campioni di laboratorio (coincidono con i campioni primari)



Ciascun campionamento è stato replicato due volte secondo lo schema gerarchico di figura 4. Ogni campione di laboratorio è stato misurato in doppio in modo da poter stimare tutti i contributi all'incertezza totale.

Figura 4. Disegno sperimentale gerarchico utilizzato per il ciascun campionamento. Ogni campionamento è stato replicato 2 volte e per ciascuna replica di campionamento sono stati raccolti da un minimo di 2 ad un massimo di 3 campioni da inviare al laboratorio. Ciascun campione di laboratorio è stato analizzato 2 volte. Per ciascun campionamento sono state così ottenute un minimo di 8 misurazioni



Misurazione: Le analisi sono state effettuate presso il laboratorio Cadir Lab srl (accreditato Accredia n.0221) secondo i principi e le specifiche del metodo di prova ufficiale QuEChERS (EN 15662, 2008). La determinazione dei residui è stata fatta in gas cromatografia o in cromatografia liquida, in entrambe le tecniche di separazione è stato utilizzato un rivelatore di massa. Il metodo multiresiduale applicato permette la ricerca di 337 principi attivi con un limite di quantificazione analitico (LQ) per ogni molecola pari a 0,005 mg/kg.

Elaborazione dei dati: le concentrazioni di residui rilevate sono state ricombinate per ogni singolo campionamento nella matrice dei dati x che ha come variabili (colonne) i residui rilevati e come oggetti (righe) le misurazioni ottenute per ciascun campionamento. Per ciascuna variabile di ciascuna matrice x sono stati effettuati i test di normalità di Shapiro-Wilk e il test di Grubbs per l'individuazione di valori anomali e/o straggler. Le matrici x relative allo stesso tipo di campionamento ripetuto nella stessa data sulla stessa coltura sono poi state ricombinate (Codex con Codex e Random con Random). Su ciascuna matrice x così ottenuta è stata applicata l'analisi della varianza (Anova) (Box *et al.*, 2005). La tecnica può essere utilizzata in sostituzione del test t di Student nel caso di confronto tra più gruppi o molto più semplicemente per avere una stima della varianza di ciascun gruppo di misure legata ad un determinato fattore come ad esempio la tipologia di campionamento, la composizione del campione di laboratorio e la ripetizione della singola analisi (Box *et al.*, 2005). Le matrici x , relative ai campionamenti Random e Codex effettuati lo stesso giorno sulla medesima coltura, sono poi state riunite e successivamente autoscalate (Edward, 1991). Le nuove matrici x composte come descritto precedentemente sono state analizzate con *Principal Component Analysis* (PCA) con per fornire una visione sintetica in termini di accuratezza e precisione di ciascun singolo campionamento effettuato. L'autoscalatura è una trasformazione importante al fine di ottenere una buona interpretabilità dei dati attraverso PCA. PCA è una tecnica per la semplificazione dei dati utilizzata nell'ambito della statistica multivariata (Hotelling, 1933): i dati vengono organizzati in una matrice detta x come descritto precedentemente, opportunamente scalati ed elaborati con l'utilizzo di algoritmi come NIPALS (*Non Iterative Partial Least Squares*) (Varmuza, 2009) che scindono l'informazione di x in due matrici dette degli *scores* (t) e dei *loadings* (l) (Todeschini, 1998). La matrice degli *scores* rappresenta le stesse analisi contenute nella matrice x in un nuovo sistema di assi cartesiani dove ogni singolo asse è la combinazione lineare delle variabili originali (concentrazioni di residui) pesate per il rispettivo *loading*. In questo modo è possibile passare da sistemi di rappresentazione grafica complessa (es: rappresentare con un grafico a dispersione la concentrazione di 5 diversi principi attivi assegnando ad ogni asse un principio attivo diverso) a sistemi dove è sufficiente rappresentare le prime due o tre colonne della matrice degli *scores*

(Componenti Principali o PC) per cogliere con un singolo colpo d'occhio tutta l'informazione presente nella matrice. La percentuale d'informazione riassunta da ogni singola PC è rappresentata dagli autovalori.

RISULTATI

In Tabella 2 è riassunto il numero di principi attivi rilevati per ciascun campionamento; ad ogni diverso residuo è stata associata una etichetta da A a U.

Tabella 2. Residui rilevati in ciascun campionamento. Per ciascun campionamento sono riportati il numero di residui rilevati, il tipo di residui elencati utilizzando etichette da A a U, le variabili non normali riportate in grassetto, le variabili che contengono *stragglers* contrassegnate da un asterisco e le variabili con *outlier* contrassegnate da due asterischi

CODICE	CAMPIONAMENTI	N residui	Etichette	CODICE	CAMPIONAMENTI	N residui	Etichette
In1	C1	8	S,B,E,G,O,R,U,H	Ps1	C1	4	B,O,T,M
In2	R1	8	S*,B,E*,G,O,R,U,H	Ps1	C2	4	B*,O,T,M
Sd1	C1	7	L,N,C,E*,P,Q,I	Ps1	R1	4	B,O,T,M
Sd1	C2	7	L,N,C,E,P,Q,I	Ps1	R2	4	B,O,T,M
Sd1	R1	7	L,N,C,E,P,Q,I	Ps2	C1	3	B,O,F
Sd1	R2	7	L,N,C,E,P,Q,I	Ps2	C2	3	B,O,F
Sd2	C1	9	L,N,A,C*,E,P,Q,D,I	Ps2	R1	3	B,O,F
Sd2	R1	9	L,N,A,C,E,P,Q,D,I	Ps2	R2	3	B,O,F

Tabella 3. Per ciascuna combinazione residuo-campionamento-coltura sono riportate le somme dei quadrati ANOVA. La colonna M contiene la media espressa in mg/kg del residuo rilevato e la colonna Sd tot contiene la deviazione standard dell'intero set di repliche effettuate per ciascun campionamento

Coltura	Campionamento	Residuo	M (ppm)	Sd tot	SS MIS / SS TOT %	SS ALIQ / SS TOT %	SS CAMP / SS TOT %	Coltura	Campionamento	Residuo	M (ppm)	Sd tot	SS MIS / SS TOT %	SS ALIQ / SS TOT %	SS CAMP / SS TOT %
In1	CODEX	S	0,008	0,009	3	87	---	Sd1	CODEX	C	0,010	0,002	9	2	0
In1	CODEX	G	0,016	0,005	71	29	---	Sd1	CODEX	N	0,023	0,010	28	10	12
In1	CODEX	H	0,027	0,020	12	72	---	Sd1	CODEX	Q	0,047	0,020	9	20	11
In1	CODEX	U	0,059	0,030	2	94	---	Sd1	CODEX	P	0,050	0,010	6	35	4
In1	CODEX	O	0,102	0,060	3	95	---	Sd1	CODEX	I	0,148	0,030	1	12	17
In1	CODEX	E	0,171	0,090	2	75	---	Sd1	CODEX	E	0,189	0,050	1	33	28
In1	CODEX	R	0,308	0,100	1	92	---	Sd1	CODEX	L	1,111	0,300	15	3	8
In1	CODEX	B	1,197	0,600	6	89	---	Sd1	RANDOM	C	0,010	0,004	0	67	0
In1	RANDOM	G	0,008	0,002	1	95	---	Sd1	RANDOM	N	0,020	0,010	0	64	5
In1	RANDOM	S	0,010	0,008	14	55	---	Sd1	RANDOM	Q	0,063	0,020	0	3	1
In1	RANDOM	H	0,023	0,010	7	93	---	Sd1	RANDOM	P	0,063	0,050	1	61	11
In1	RANDOM	U	0,037	0,009	3	95	---	Sd1	RANDOM	I	0,164	0,050	1	53	1
In1	RANDOM	O	0,084	0,040	17	77	---	Sd1	RANDOM	E	0,199	0,050	2	79	0
In1	RANDOM	E	0,167	0,030	22	49	---	Sd1	RANDOM	L	1,116	0,200	7	41	2
In1	RANDOM	R	0,190	0,060	17	80	---	Sd2	CODEX	C	0,005	0,003	33	33	---
In1	RANDOM	B	0,983	0,440	32	64	---	Sd2	CODEX	N	0,008	0,002	30	30	---
Ps1	CODEX	M	0,006	0,003	5	49	27	Sd2	CODEX	Q	0,013	0,009	74	4	---
Ps1	CODEX	O	0,031	0,010	0	32	38	Sd2	CODEX	P	0,019	0,007	29	43	---
Ps1	CODEX	B	0,263	0,050	0	55	18	Sd2	CODEX	I	0,020	0,003	67	17	---
Ps1	CODEX	T	0,751	0,300	0	11	79	Sd2	CODEX	E	0,046	0,009	61	35	---
Ps1	RANDOM	M	0,008	0,002	0	0	91	Sd2	CODEX	L	0,120	0,030	4	35	---
Ps1	RANDOM	O	0,035	0,020	0	1	95	Sd2	RANDOM	N	0,003	0,004	95	3	---
Ps1	RANDOM	B	0,300	0,090	0	8	89	Sd2	RANDOM	P	0,007	0,005	64	3	---
Ps1	RANDOM	T	0,744	0,430	7	0	82	Sd2	RANDOM	I	0,016	0,010	76	0	---
Ps2	CODEX	O	0,014	0,005	2	43	9	Sd2	RANDOM	Q	0,018	0,020	88	0	---
Ps2	CODEX	F	0,053	0,005	9	17	8	Sd2	RANDOM	E	0,051	0,020	47	53	---
Ps2	CODEX	B	0,381	0,102	0	13	49	Sd2	RANDOM	L	0,097	0,080	55	19	---
Ps2	RANDOM	O	0,017	0,003	6	19	0	Sd2	RANDOM	C	---	---	---	---	---
Ps2	RANDOM	F	0,053	0,020	8	2	60								
Ps2	RANDOM	B	0,350	0,100	20	20	25								

La Tabella 3 riassume le media, la deviazione standard complessiva associate a ciascun processo di campionamento e misurazione e le somme dei quadrati relative a: campionamento, campioni di laboratorio e misurazioni. Le somme dei quadrati riportate in tabella, ricombinate tra di loro e pesate per gli opportuni gradi di libertà concorrono alla composizione dell'incertezza totale rappresentata dalla deviazione standard "Sd tot".

I risultati della PCA effettuata su ogni singola matrice x composta come descritto nel paragrafo relativo a materiale e metodi sono riepilogati nelle Figure 6,7,8 e 9. Ogni figura contiene un grafico degli scores, un grafico dei *loadings* e i gli autovalori calcolati per ciascuna PC.

Figura 6. PCA effettuata sui dati del campionamento di insalata In1- (a) score, (b) loadings, (c) autovalori

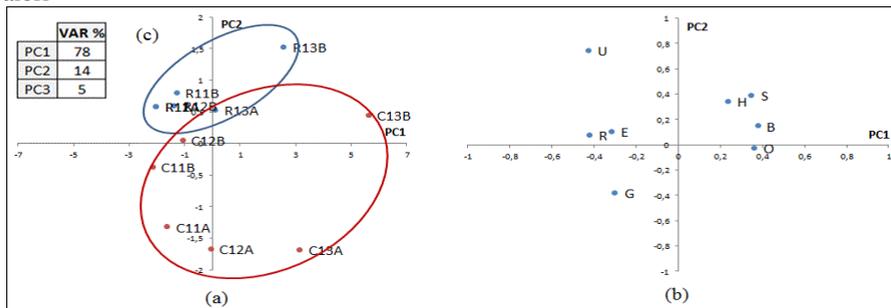


Figura 7. PCA effettuata sui dati dei campionamenti di sedano Sd1 e Sd2 - (a) score, (b) loadings, (c) autovalori

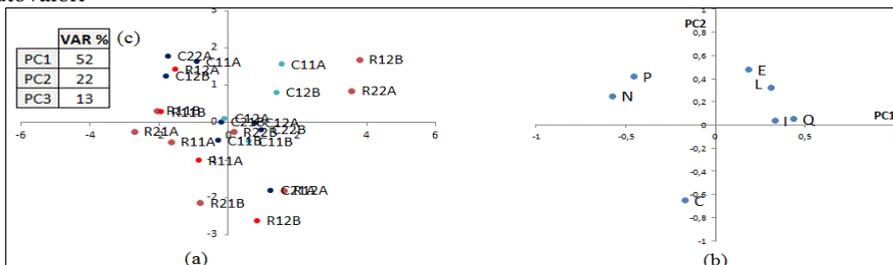


Figura 8. PCA effettuata sui dati del campionamento di pesche Ps1- (a) score, (b) loadings, (c) autovalori

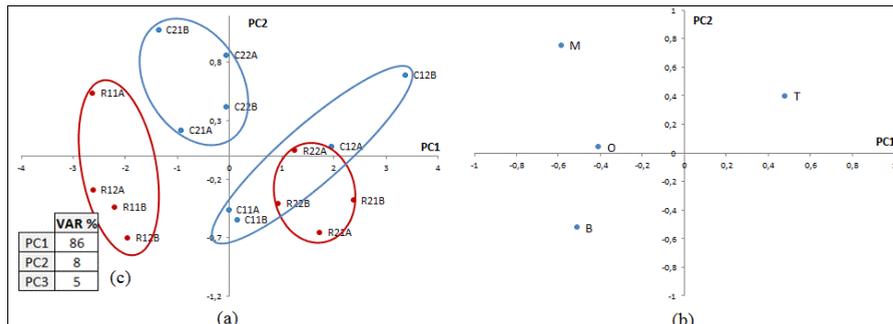
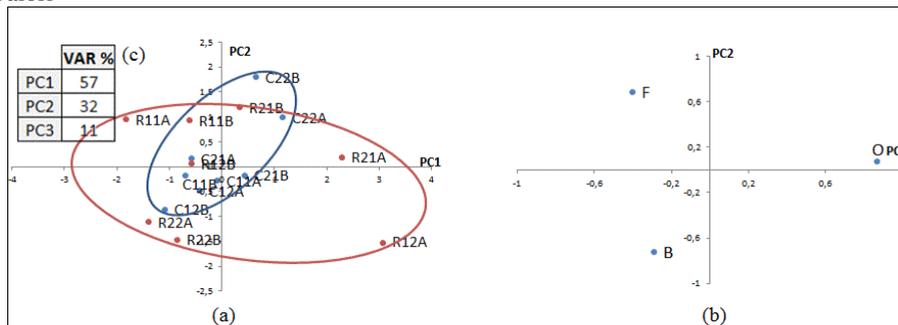


Figura 9. PCA effettuata sui dati del campionamento di pesche Ps2 - (a) score, (b) loadings, (c) autovalori



DISCUSSIONE

Su un totale di 16 campionamenti sono stati rilevati 90 residui appartenenti a 19 diversi principi attivi catalogati da A ad U in un range di concentrazione da 0,003 a 1,197 mg/kg. Dal punto di vista qualitativo, residui dei principi attivi sono stati trovati su tutte le colture con entrambe le tipologie di campionamento, tranne in un caso: sui sedani del secondo campionamento (Sd2) il principio attivo C è stato rilevato con il campionamento Codex ad una concentrazione media di 0,005 ppm mentre non è stato rilevato con il campionamento Random. La normalità delle 90 serie di dati è stata testata utilizzando il test di Shapiro-Wilk con un probabilità del 95%; solo 2 serie di dati su 90 hanno evidenziato distribuzioni non assimilabili alla normalità (Tabella 2). La presenza di outlier o straggler è stata testata attraverso test di Grubbs effettuato con un livello fiduciario del 5% (ricerca di straggler) e dell'1% (ricerca di outlier); sono stati individuati 5 soli straggler (tabella 2). Visto l'esiguo numero di dati non normali e l'assenza di dati fortemente anomali si è deciso di non eliminare nessun valore e di procedere all'elaborazione di tutte le misurazioni effettuate. Le matrici x relative ai campionamenti Codex e Random ottenute dalla combinazione dei campionamenti effettuati lo stesso giorno sulla stessa coltura sono state analizzate mediante Anova (Tabella 3). Sulle colture di pesche (Ps1 e Ps2) e di sedano (Sd1) sono stati effettuati campionamenti ripetuti ed è stato perciò possibile determinare tutte le componenti dell'incertezza finale osservata. Per il test insalata In1 e per il test sedano Sd2 non è stato possibile eseguire più di un campionamento per tipologia senza arrecare disagio alle aziende, di conseguenza l'informazione sull'incertezza di campionamento non è disponibile. Per tutti i campionamenti sono disponibili sufficienti gradi di libertà per il calcolo delle incertezze relative all'aliquota (campione di laboratorio) e alla misurazione. Dall'analisi dei dati di tabella 3 dove sono riepilogate le somme dei quadrati parziali dei vari contributi all'incertezza totale, si evidenzia la rilevanza dei contributi delle somme dei quadrati legate al campionamento e alla composizione del campione di laboratorio. Una certa differenza nella composizione dell'incertezza totale si nota tra i dati di pesche, sedano e insalate; i dati relativi ai campioni di pesche (Ps1 e Ps2) presentano un contributo non trascurabile dell'incertezza di campionamento nella composizione dell'incertezza totale, mentre i campioni di sedano e insalata (Sd1, Sd2 e In1) mostrano una rilevanza delle somme dei quadrati dei campioni di laboratorio. Questa differenza può essere ragionevolmente spiegata considerando che le unità di sedano e insalata sono ben più grandi come massa rispetto alla singola mela. Per ciascun campione di laboratorio è stata raccolta all'incirca la stessa massa di campione (variabile tra 1 e 1,5 kg) perciò i campioni di laboratorio di pesche contengono un numero più elevato di unità

elementari con una conseguente probabilità di avere un campione più rappresentativo della popolazione dal quale è stato estratto. Ciò si può tradurre in una minore varianza tra i campioni di laboratorio di pesche rispetto ai relativi campioni di sedano. Per i risultati del secondo campionamento di sedano (Sd2) si evince un contributo dell'incertezza di misura paragonabile all'incertezza dovuta alla composizione del campione di laboratorio e ben più alto degli altri campionamenti. Per questi campioni si osservano anche livelli di concentrazione di residui sensibilmente più bassi rispetto agli altri campionamenti in virtù del fatto che il campionamento è stato fatto circa 10 giorni dopo la data dell'ultimo trattamento effettuato sulla coltura; la concentrazione media dei vari principi attivi si attesta ad un valore di 0,03 ppm mentre in tutti gli altri campionamenti la media globale è circa 0,2 ppm. L'incertezza espressa come deviazione standard totale sulle stesse misure è sensibilmente più piccola rispetto agli altri casi; ciò che cambia è la composizione di questa incertezza. Nel caso dei campionamenti Sd2 la componente dell'incertezza legata alla misurazione sembra essere equivalente a quella proveniente dal campione di laboratorio mentre negli altri casi analizzati la stessa componente è sensibilmente più piccola rispetto a quella generata dalle differenze nei campioni di laboratorio e/o metodica di campionamento. Si può ipotizzare che a basse concentrazioni di residui la disomogeneità di distribuzione dei fitofarmaci in campo (che si riflette sulla composizione del campione di laboratorio) perda importanza rispetto all'incertezza proveniente dall'analisi in quanto le concentrazioni misurate sono prossime al limite di quantificazione della tecnica analitica utilizzata, quindi una zona di indagine afflitta da incertezza (Gibbons *et al.*, 2001). I dati relativi ai campionamenti effettuati sulla stessa coltura il medesimo giorno, sono stati ricombinati e autoscalati. Ogni matrice x è stata analizzata mediante PCA. Per i campioni di insalate (In1) le prime due componenti principali spiegano complessivamente il 90% della varianza e dall'analisi del grafico degli scores sono evidenti due gruppi di valori in funzione del tipo di campionamento. Le analisi relative al campionamento Random risultano meno disperse delle relative analisi effettuate sul campionamento Codex. Il primo gruppo di analisi ha una media globale pari a circa 0,18 ppm mentre il secondo gruppo ha una media circa pari a 0,24 ppm. In accordo con l'analisi della varianza di questi campioni si può affermare che l'incertezza di misura del laboratorio è sostanzialmente paragonabile in entrambe le serie di misurazioni e dello stesso ordine di grandezza rispetto all'incertezza proveniente dalla composizione dei campioni di laboratorio. Se si osservano le repliche genuine degli esperimenti (ad esempio la distanza tra C13A e C13B) si noterà che esse si disperdono con distanze paragonabili a quelle tra misure ottenute dai diversi campioni di laboratorio (ad esempio C13B con C12B). La minor precisione delle repliche effettuate utilizzando il sistema di campionamento Codex è possibile sia imputabile al fatto che in questo tipo di campionamento il campione di laboratorio era costituito da un numero minimo di due cespi di insalata: la massa totale del campione di laboratorio, come già ipotizzato nell'analisi della varianza, è perciò facilmente influenzabile dalla concentrazione di uno dei due cespi. Questa ipotesi è in buona parte confermata osservando che alcune misure come ad esempio C13A e C13B, repliche genuine dello stesso campione, si differenziano su PC_1 rispetto agli altri campioni per la concentrazione di principi attivi come B, O e S (grafico dei loading) che risultano anche da un confronto dei dati originali non scalati sensibilmente più grande delle rispettive concentrazioni rilevate negli altri campioni.

Per l'analisi dei campioni di sedano Sd1 e Sd2 invece si assiste ad una sostanziale equivalenza dei due sistemi di campionamento in termini di accuratezza e precisione. Tutti e due i campionamenti hanno una media globale di principi attivi rilevati circa pari a 0,23 ppm. Tutte le misurazioni Sd1 si raccolgono intorno all'origine degli assi cartesiani e si disperdono allo stesso modo. Ciascuna unità elementare di sedano ha una massa inferiore al singolo cespo

di insalata, per cui il campione di laboratorio era costituito da una numero maggiore di unità elementari, di conseguenza le differenze osservate tra i campioni di laboratorio sembrano essere meno importanti rispetto alla composizione dell'incertezza totale. Osservando le distanze tra i campioni repliche genuine, tra i diversi campioni di laboratorio e tra i campionamenti ripetuti si può affermare, in accordo con l'analisi della varianza, che su ciascuna singola misurazione i tre contributi sembrano essere grosso modo equivalenti in termini di peso sull'incertezza totale stimata. Il secondo campionamento Sd2 è stato proiettato sul sistema cartesiano composto dalle prime due PC ottenute da Sd1, in quanto questo campionamento è stato fatto sullo stesso campo circa 20 giorni dopo la prima serie di campionamenti Sd1. Anche in questo caso non si osservano grandi differenze tra le misurazioni effettuate con i due diversi tipi di campionamento. L'analisi delle Componenti Principali fatta sui dati del primo campionamento di pesche (Ps1) mostra invece 4 distinti gruppi di oggetti che si riferiscono a ciascun singolo campionamento. La media globale calcolata per tipo di campionamento è di circa 0,26 e 0,27 ppm, rispettivamente per Codex e Random. La precisione dei due tipi di campionamenti sembra comparabile e l'accuratezza media dei campionamenti Codex sembra essere lievemente migliore rispetto all'accuratezza dei campionamenti Random, i cui gruppi contengono valori mediamente più estremi. Questa tendenza si accentua se si osservano i risultati ottenuti per il secondo campionamento di pesche (Ps2) dove i due gruppi di risultati dei campionamenti Codex e Random sono centrati sull'origine degli assi formati da PC₁ e PC₂ e quindi egualmente accurati. Il valore medio globale delle concentrazioni di principi attivi è di circa 0,15 ppm. La dispersione dei dati Codex intorno all'origine è tuttavia decisamente più contenuta rispetto alla dispersione delle analisi effettuate sui campionamenti Random; se ne deduce che il campionamento Codex in questo caso è stato sensibilmente più preciso rispetto al campionamento Random (fornisce dati in un intorno stretto rispetto alla media globale di tutti i campioni, considerata come valore vero rappresentativo della media di residui in campo). In tutti i casi di campionamento su pesche i valori analitici hanno evidenziato una forte dipendenza dal tipo di campionamento indicata anche dall'ANOVA realizzata su ciascuna singola serie di dati.

CONCLUSIONI

Riassumendo le informazioni ottenute dai campionamenti è possibile affermare che:

- Il campionamento ha un ruolo non trascurabile nella determinazione dell'accuratezza e della precisione del dato analitico. Questo risulta particolarmente evidente nel caso di colture trattate con atomizzatori, macchine che presentano una distribuzione di fitofarmaci piuttosto disomogenea in campo (Balsari *et al.*, 1990; 2000) che si riflette a seconda delle modalità di campionamento sul risultato analitico finale; si vedano ad esempio i risultati ottenuti per le pesche. Se si è interessati a conoscere una distribuzione media dei principi attivi su tutto il lotto che rappresenta l'insieme dei frutti di un campo allora è conveniente, per ottenere dati più riproducibili, attenersi il più possibile alle buone norme di campionamento dettate dal CODEX. Viceversa nel caso di trattamenti effettuati con irroratrice a barra la metodologia di campionamento sembra essere meno determinante ai fini della qualità del risultato analitico.
- L'attività di composizione del campione di laboratorio ottenuta dal mescolamento dei campioni individuali, alla quale spesso non si pone la necessaria attenzione, rappresenta invece un passaggio importante per ottenere valori analitici il più possibile rappresentativi della media in campo. Nella composizione di tale campione non è da trascurare, come sottolineato anche dalle norme di campionamento Codex, la dimensione dei campioni elementari da prelevare dal bulk sample e il loro numero; la sola massa di campione inviato al laboratorio non sembra di per se un parametro sufficiente a garantire un campionamento

rappresentativo. E' dunque molto delicata la gestione di referenze che hanno un peso unitario importante (in questo lavoro insalate e sedano); in questi casi è buona norma inviare al laboratorio un campione composto da un significativo numero di unità di prodotto.

- L'incertezza associata al sistema di misurazione è un parametro qualitativo importante, tuttavia dai dati analizzati si evince come questo contributo tenda a essere solitamente troppo enfatizzato dimenticando che un buon campionamento è la base per ottenere dati analitici affidabili e soprattutto utili. Esperienza, personale addestrato e una buona conoscenza di sistemi di campionamento che spesso non possono essere demandati a operatori non esperti sono essenziali per ottenere dati analitici rappresentativi.

- La scelta tra campionamento Random e Codex e l'esecuzione di più analisi di aliquote del bulk sample oppure l'analisi dei singoli campioni elementari è sicuramente da demandare a personale specializzato ed è da effettuare in funzione degli obiettivi del campionamento. Si pensi ad esempio al campionamento da un lotto di prodotti con una distribuzione di principi attivi con sospetta elevata disomogeneità di concentrazione; in questo caso potrebbe essere utile conoscere la stima delle concentrazioni di più campioni elementari piuttosto che la sola stima di una concentrazione media se l'obiettivo è quello di verificare che un successivo campionamento casuale effettuato in occasione di un controllo non dia adito a valori di concentrazione estremamente alti. In altri casi, ad esempio in condizione di omogeneità di distribuzione dei fitofarmaci, potrebbe essere utile contenere il numero di analisi determinando soltanto le concentrazioni delle aliquote prelevate dal bulk sample. In ogni caso un campionamento il più possibile esaustivo del lotto è sicuramente da preferire a procedure di campionamento più sbrigative ma che forniscono campioni poco rappresentativi della popolazione oggetto di analisi.

LAVORI CITATI

- Balsari P., Airoidi G., 1990. Guida all'impiego delle irroratrici a barra nelle colture erbacee, Regione Piemonte, Assessorato Agricoltura e Foreste.
- Balsari P., 2000. Il controllo funzionale delle irroratrici per le colture arboree in Piemonte, Regione Piemonte, Assessorato Agricoltura e Foreste.
- Benzi D., Demaestri T., Rinaldi L., Capurro R., 2012. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 33-41
- Box G. E. P., Hunter J. S., Hunter W. G., 2005. *Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery*, 2nd Edition, John Wiley & Sons., Hoboken New Jersey.
- CAC/GL 33-1999, Recommended methods of sampling for the determination of pesticide residues for compliance with MLRS.
- Edward J. J., 1991, *A User's Guide to Principal Components*, John Wiley & Sons., Hoboken New Jersey.
- EN 15662:2008, Foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and cleanup by dispersive SPE - QuEChERS-method.
- Gibbons R. D., Coleman D. E. 2001, *Statistical Methods for Detection and Quantification of Environmental Contamination*, John Wiley & Sons., Hoboken, New Jersey
- Hotelling H., 1933, Analysis of a complex of statistical variables into principal components, *Journal of Educational Psychology*, 24(6), 417-441.
- Todeschini R., 1998, *Introduzione alla chemiometria*, Edises, Milano.
- Varmuza K., Filzmoser P., 2009, *Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics*, Taylor & Francis Group, Boca Raton FL