

Indagine sulla presenza di Glifosate ed AMPA in acque interne della Provincia di Ragusa mediante lo sviluppo e l'applicazione di un nuovo metodo di analisi in UPLC-ESI-MS/MS



a cura della ST-Ragusa; Mara Antoci, Marcella Barbera, Francesco Morreale

Novembre 2017



SITO ISTITUZIONALE www.arpa.sicilia.it

E-MAIL arpa@arpa.sicilia.it; comunicando@arpa.sicilia.it

PEC: arpa@pec.arpa.sicilia.it

Indagine sulla presenza di Glifosate ed AMPA in acque interne della Provincia di Ragusa mediante lo sviluppo e l'applicazione di un nuovo metodo di analisi in UPLC-ESI-MS/MS

Novembre 2017

Abstract:

Il Glifosate è il diserbante più venduto su scala mondiale. L'ampia diffusione è correlata al massiccio utilizzo di semi geneticamente modificati in grado di resistere all'azione del pesticida. Per la tossicità sugli ecosistemi ed i possibili effetti sulla salute umana è da tempo al centro di una complessa controversia concernente l'autorizzazione all'impiego che coinvolge organismi internazionali di valutazione, ditte produttrici, agricoltori, consumatori ed associazioni ambientaliste.

Nel Rapporto Nazionale sui residui di pesticidi nelle acque, pubblicato da Ispra del 2016, l'Istituto ha evidenziato l'importanza dell'inclusione del Glifosate e del suo principale metabolita, l'AMPA, nei protocolli di monitoraggio dell'ambiente idrico delle Agenzie Regionali per l'Ambiente, che tutt'ora in ambito nazionale, mostrano per tale fitofarmaco livelli d'indagine inadeguati. Infatti, se elevato è il tasso di riscontro di Glifosate, soprattutto nelle acque superficiali, poche sono le ARPA Regionali che ne effettuano sistematicamente la ricerca. La causa del mancato inserimento nei programmi di monitoraggio è correlata alle difficoltà analitiche che rendono impossibile l'impiego dei metodi multi-residuo ordinariamente in uso nei laboratori.

La Struttura Territoriale di Ragusa di ARPA Sicilia, centro di riferimento regionale per la tematica pesticidi, grazie all'acquisizione di strumentazione di ultima generazione (UPLC-MS/MS) ha proceduto all'applicazione e validazione di un nuovo metodo per la determinazione del Glifosate e dell'AMPA, proposto dalla Ditta Waters. I parametri di robustezza, sensibilità e ripetibilità, del metodo sono stati testati su acque superficiali e sotterranee mentre l'accuratezza è stata verificata con la partecipazione a test interlaboratorio. Le prestazioni del metodo e le caratteristiche di rapidità e facilità di esecuzione ne fanno una valida alternativa ai metodi di determinazione tradizionali. L'applicazione all'analisi di 100 campioni, prelevati nel 2016 nell'ambito del monitoraggio delle acque interne ricadenti nella Provincia di Ragusa, ha evidenziato per il Glifosate percentuali di positività, che nel caso delle acque sotterranee, superano il dato nazionale anche per l'incidenza di campioni con concentrazioni maggiori dello Standard di Qualità ambientale (SQA). Per l'AMPA le percentuali di campioni positivi e con tenori più elevati dello SQA superano il dato nazionale, sia per le acque superficiali che sotterranee.



1

Struttura:
ST – Ragusa

Direttore Struttura:
dott. ssa Maria Antoci

Autori:
Maria Antoci,
Francesco Morreale, Marcella Barbera

Data:
27/10/2017

Indice

1.Introduzione	3
2.Caratteristiche chimico-fisiche del Glifosate	4
3.Dati di impiego	5
4.Monitoraggio del Glifosate in Italia	6
5.Problematiche analitiche connesse alla determinazione del Glifosate	7
6.Approccio metodologico per la determinazione del Glifosate	8
7.Messa a punto e sperimentazione del metodo sviluppato da WATERS	8
8.Sviluppo del metodo	9
9.Rivelazione di Glifosate e AMPA nelle acque interne del monitoraggio della provincia di Ragusa	13
9.1.Risultati della ricerca di Glifosate e AMPA nelle acque sotterranee	15
9.1.1. Concentrazioni medie di Glifosate	15
9.1.2. Concentrazioni medie di AMPA	18
9.2.Risultati della ricerca di Glifosate e AMPA nelle acque superficiali	21
9.2.1. Concentrazioni medie di Glifosate	21
9.2.1. Concentrazioni medie di AMPA	22
10. Conclusioni	23

1. Introduzione

La Struttura Territoriale di Ragusa di ARPA Sicilia, centro di riferimento regionale per la tematica fitofarmaci, ha consolidato una pluriennale esperienza nell'ambito della valutazione della pressione antropica correlata all'impiego dei pesticidi. Attraverso il monitoraggio dell'ambiente idrico ed il continuo aggiornamento del set analitico di principi attivi ricercati nelle diverse matrici ambientali, secondo i criteri definiti dalle Linee Guida ISPRA [1], è stato evidenziato il consistente impatto ambientale determinato da un uso dei pesticidi che nel territorio ragusano rappresenta circa un terzo dei consumi dell'intera regione.

Il recente potenziamento del parco strumentale del laboratorio della Struttura, con l'acquisizione di un cromatografo liquido ad alte prestazioni UPLC (Acquity) accoppiato con lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo Xevo TQ-S della Ditta Waters, ha portato all'adozione di metodi multiresiduo che consentono la determinazione simultanea di centinaia di pesticidi, attraverso l'iniezione diretta di campioni acquosi senza preventiva pre-concentrazione. Tale modalità di analisi assicura un notevole risparmio di risorse, il raggiungimento di limiti di quantificazione molto più bassi ed idonei ai requisiti previsti dalla legislazione ambientale [2]. Grazie al potenziamento del parco strumentale ed al supporto di personale specializzato, che collabora con l'Agenzia nell'ambito delle Convenzioni con il Dipartimento Regionale delle Acque e dei Rifiuti finalizzata all'aggiornamento del quadro conoscitivo dello stato di qualità delle acque interne, è stata avviata la sperimentazione per la verifica dell'applicabilità di nuovo metodo di prova, per la determinazione in matrici acquose dei residui di Glifosate, sostanza prioritaria per vendite in ambito regionale e provinciale.

La metodica sviluppata a partire da una applicazione della Waters, che consente anche la determinazione dell'AMPA (acido amminometilfosfonico), principale prodotto di degradazione del Glifosate, prevede, rispetto ai metodi tradizionali, l'utilizzo di un derivatizzante alternativo all'FMOC [3], modalità di esecuzioni rapide, utilizzo di volumi ridotti di campione e la successiva determinazione mediante cromatografia liquida ad alta prestazione con rivelatore di massa a triplo quadrupolo, senza step preliminari di pre-concentrazione. Il metodo garantisce il raggiungimento dei livelli prestazionali richiesti dalla vigente Normativa sulle acque [2].

2 Caratteristiche chimico-fisiche del Glifosate

Le caratteristiche chimico-fisiche del Glifosate hanno importanti implicazioni nella modalità di azione come erbicida e sulla sua persistenza nell'ambiente. Il Glifosate è un composto altamente solubile in acqua, praticamente insolubile nei più comuni solventi organici (Tab. 1).

Tab. 1 Valori di solubilità del Glifosate

Solvente	Solubilità
Acqua	pH2: 10,5 ± 0,2 g/l - 20 °C, 995 g/kg
Acetone	0,08 g/l
Diclorometano	0,23 g/l
Acetato di etile	0,01 g/l
Esano	0,03 g/l
Metanolo	0,23 g/l

Si presenta in forma zwitterionica, come mostrato nella Figura 1

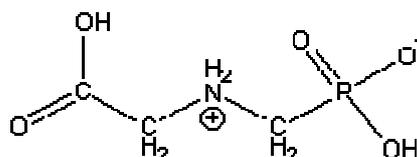


Fig. 1 Struttura dipolare del Glifosate

È una molecola non volatile e fotoresistente, possiede quattro valori di costante di dissociazione (pKa 2,0 – 2,6 – 5,6 e 10,6) [4] (Fig. 2)

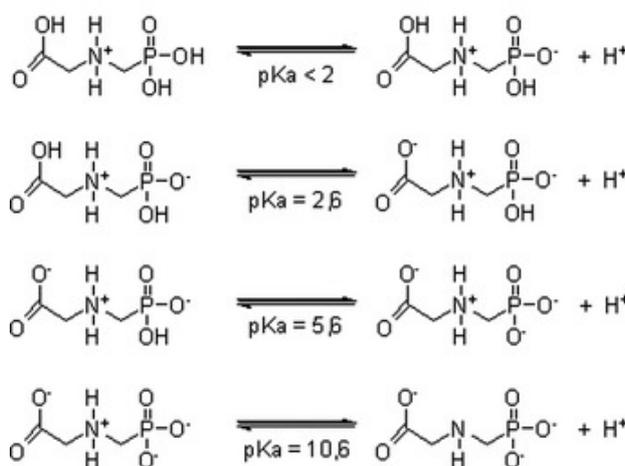


Fig. 2 Reazione di dissociazione del Glifosate

La dissociazione pH-dipendente determina la speciazione della molecola nei sistemi acquatici. Il Glifosate è un chelante polidentato che si lega ai "substrati" attraverso gli atomi di ossigeno determinandone l'assorbimento nel suolo/sedimenti, dove subisce una degradazione microbica con produzione del suo principale metabolita l' AMPA (Fig. 3).

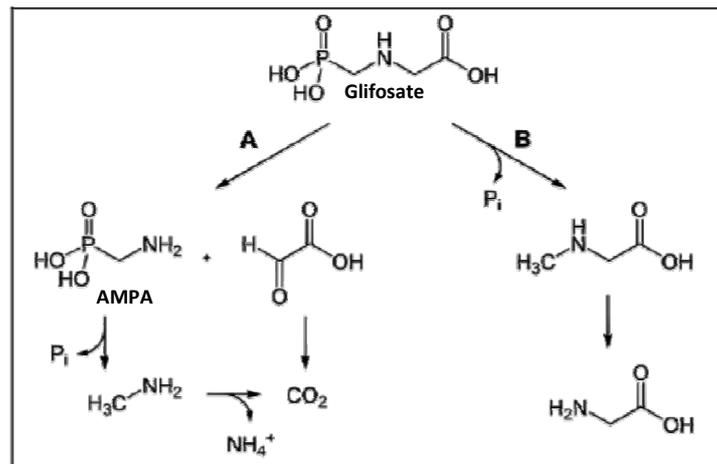


Fig. 3 Schema di degradazione del Glifosate nel suolo

L'AMPA ha una tossicità paragonabile a quella del composto parentale e pertanto, nonostante il Glifosate degradi rapidamente, gli effetti tossici su organismi bersaglio si protraggono nel tempo. Molto polare ed altamente solubile in acqua, gli studi di campo per l'AMPA riportano una maggior persistenza rispetto al parentale, con un tempo di dimezzamento pari a 240-958 giorni in alcuni tipi di suolo [1].

3 Dati di impiego

Il Glifosate è l'erbicida più diffuso al mondo. Entra nella composizione di almeno 750 prodotti commercializzati da un centinaio di aziende in più di 130 paesi. Tra il 1974, data del suo lancio sul mercato, ed il 2014, gli utilizzi del Glifosate sono passati da 3200 a 825.000 tonnellate all'anno. In Italia, le vendite medie superano le 4.000 tonnellate/anno [1]. In Sicilia i consumi si attestano intorno a circa 400 tonnellate annue, di cui circa il 10 % commercializzate nella Provincia di Ragusa dove, nel periodo 2008-2015, si registra complessivamente un trend in aumento dei consumi (Grafico 1).

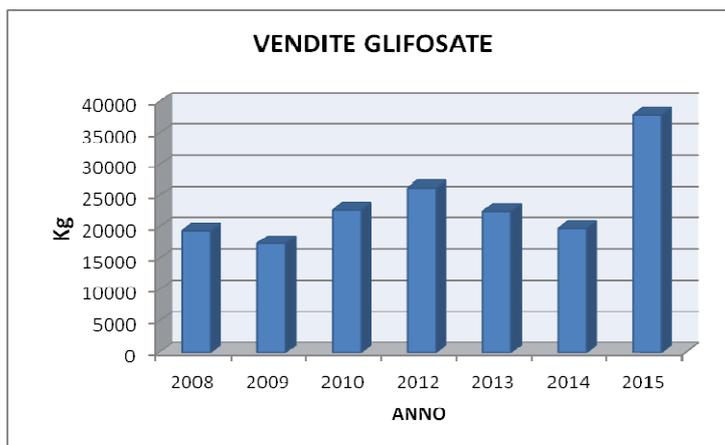


Grafico 1. Dati di vendita del Glifosate in provincia di Ragusa

L'ampia diffusione del Glifosate è dovuta all'azione ad ampio spettro, il basso costo ed all'impiego sempre più consistente di sementi geneticamente modificati (Ogm) resistenti al Glifosate stesso. Il Glifosate, la cui produzione ed utilizzo coinvolge notevoli interessi economici, è al centro di una accesa controversia sull'effettiva pericolosità del prodotto che vede coinvolti enti regolatori, aziende produttrici, associazioni ambientaliste e dei consumatori. Organismi diversi si sono espressi in maniera discordante circa i possibili effetti sulla salute umana e sull'ambiente. In particolare, il Glifosate, è stato classificato dallo IARC "come probabile cancerogeno per l'uomo (classe 2A)" [5]. Viceversa l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (Efsa) [6,7] ha affermato che è improbabile che il Glifosate costituisca un pericolo di cancerogenicità per l'uomo.

4 Monitoraggio del Glifosate in Italia

L'ultimo Rapporto nazionale sui pesticidi nelle acque redatto da ISPRA [1] segnala come nel 2014 il Glifosate sia stato trovato nel 39,7% dei siti di monitoraggio di acque superficiali in cui è stato cercato e nel 25,2% dei casi si è dimostrato responsabile del superamento degli standard di qualità ambientale (SQA). Nelle acque sotterranee, invece, è risultato presente nel 4,3% dei punti controllati e nel 1,1% dei campioni con valori superiori allo SQA.

Nel rapporto si segnala anche la contaminazione dovuta all'AMPA, presente nel 70,9% dei punti di monitoraggio delle acque superficiali indagati e nel 52,2% dei casi con valori superiori all' SQA. Nelle acque sotterranee è presente nel 4% dei punti ed il 2,3% dei campioni presenta valori superiori allo SQA. Il documento sottolinea un'inadeguata copertura del monitoraggio nazionale, considerato che solo poche Agenzie Regionali hanno provveduto all'inserimento del Glifosate e dell'AMPA nei protocolli di indagine.

Per quel che concerne i dati relativi alla Regione Sicilia, il rapporto, pur riconoscendo la capillarità del monitoraggio eseguito in Provincia di Ragusa, dove è indagato un numero di sostanze nettamente superiore alla media nazionale, rimarca la mancata ricerca del Glifosate e del metabolita AMPA. Da tali evidenze emerge come la determinazione del Glifosate e dell'AMPA rappresenti un obiettivo prioritario per il monitoraggio dell'ambiente idrico svolto dalle Agenzie Regionali del Sistema Nazionale per la Protezione dell'Ambiente (SNPA).

5 Problematiche analitiche connesse alla determinazione del Glifosate

Le difficoltà d'implementazione di un monitoraggio, in grado di restituire dei dati significati circa l'effettivo impatto sull'ambiente idrico correlato all'impiego del Glifosate sul territorio nazionale, può essere attribuita principalmente alle criticità analitiche connesse alla determinazione nelle diverse matrici ambientali. Infatti, le peculiari proprietà chimico-fisiche del Glifosate e dell'AMPA fanno sì che la loro ricerca costituisca una concreta sfida analitica. Si tratta di sostanze polari, con caratteristiche anfotere, non volatili e prive di gruppi cromofori, insolubili nei solventi organici e molto solubili in acqua, ciò rende di fatto impossibile il loro inserimento nei metodi di prova multi-residuo. Tale limite rappresenta una seria difficoltà per i laboratori che devono prevedere l'impiego di risorse dedicate. Vista l'importanza in campo ambientale e sanitario ricoperta da tali sostanze, nel tempo sono stati sviluppati specifici metodi di indagine, utili alla determinazione in matrici alimentari ed ambientali.

Il metodo ad oggi più utilizzato prevede l'estrazione e la derivatizzazione pre-colonna con il cloruro di 9-fluorenilmetossicarbonilico (FMOC-Cl) [3]. La procedura è lunga e laboriosa, consente la determinazione di un numero limitato di campioni per batch di analisi, anche a causa del consistente rumore di fondo strumentale determinato dall'eccesso di derivatizzante che rende impossibile raggiungere, per iniezione diretta del derivatizzato, i limiti di quantificazione richiesti dalla Normativa vigente [2], a meno di non introdurre nell'analisi ulteriori fasi di pre-concentrazione /purificazione.

Nel "Quick Method for the Analysis of Highly Polar Pesticides" [8] proposto dal European Union Reference Laboratories (EURL), per la determinazione del Glifosate negli alimenti, è previsto per l'analisi di estratti non derivatizzati mediante LC/MS, l'utilizzo di speciali colonne cromatografiche idonee alla separazione di composti di elevata polarità.

Tale procedura, applicata alle matrici acquose per iniezione diretta, presenta diverse limitazioni prima tra tutte la necessità di drogaggio periodico della colonna e lavaggi specifici del sistema cromatografico che

condizionano le prestazioni del metodo in termini di sensibilità e ripetibilità, da qui la difficoltà di raggiungimento dei limiti di quantificazione richiesti dalla Normativa di riferimento [2].

I metodi in spettrometria di massa ad alta risoluzione accoppiata alla cromatografia ionica (IC/HPLC-HRMS), stanno progressivamente affermandosi nella determinazione per iniezione diretta di inquinanti emergenti. Nel caso della determinazione del Glifosate la tecnica IC/HPLC-HRMS risulta una valida alternativa ai metodi tradizionali. La diffusione è tuttavia limitata dai costi elevati della strumentazione e dall'utilizzo della stessa in maniera dedicata. Tali condizioni non sempre possono essere coniugate con le esigenze di efficienza ed economicità di cui un laboratorio deve tenere conto nelle strategie gestionali.

6 Approccio metodologico per la determinazione del Glifosate

Successivamente al potenziamento del parco strumentale, il laboratorio della Struttura ARPA ha sperimentato, sulla base di quanto riportato nel citato metodo dell'EURL, l'implementazione di una procedura di determinazione del Glifosate mediante iniezione diretta, con l'impiego di una colonna hypercarb PGC per composti polari. Le prestazioni in termini di robustezza, ripetibilità e sensibilità del metodo si sono tuttavia rilevate inadeguate alle esigenze della routine analitica del laboratorio.

7 Messa a punto e sperimentazione del metodo sviluppato da WATERS

Nel 2016 la Ditta WATERS ha presentato un metodo innovativo di determinazione del Glifosate e dell'AMPA semplice e veloce che prevede l'utilizzo, a pH controllato, di un derivatizzante (AccQ-Tag Ultra derivatization Kit) alternativo all'FMOC e la successiva identificazione e quantificazione con tecnica UPLC-MS/MS [9,10]. Sulla base della documentazione resa disponibile dalla Waters, la metodologia è apparsa idonea alle esigenze di fattibilità della Struttura. Il laboratorio ha così avviato, con il supporto degli specialisti della stessa Ditta, le prove analitiche finalizzate all'ottimizzazione delle condizioni strumentali utili alla verifiche di applicabilità della procedura.

L'approccio metodologico ha previsto una prima fase di valutazione delle prestazioni strumentali (intervallo di lavoro, linearità, limite di rilevabilità, sensibilità) attraverso l'applicazione del protocollo WATERS su soluzioni standard di riferimento di Glifosate ed AMPA, a diverse concentrazioni in acqua Milli-Q. Gli esiti delle prove sono risultati confacenti ai requisiti prestazionali previsti dalle Linee Guida Europee [11,12]. La successiva fase di sperimentazione ha comportato la verifica di applicabilità del metodo ai campioni reali

,attraverso la valutazione complessiva delle performance in termini di robustezza, precisione, accuratezza, recupero e limite di quantificazione. L'aggiunta di standard isotopicamente arricchiti ($1,2-^{13}\text{C}_2-^{15}\text{N}$ Glifosate e $^{13}\text{C}_2-^{15}\text{N}$ AMPA), prima della derivatizzazione, garantisce un adeguato controllo del processo analitico.

La validazione sia per le acque superficiali che sotterranee ha dimostrato l'idoneità del metodo a soddisfare le esigenze prestazionali richieste al laboratorio della Struttura ed in particolare i requisiti previsti dalla Normativa per le acque, che nel caso dei pesticidi non specificatamente riportati nell'elenco delle sostanze prioritarie fissa il limite parametrico in $0.1 \mu\text{g/L}$, con un LOQ pari almeno al 25% del limite stesso [2].

8 Sviluppo del metodo analitico

Il metodo prevede la derivatizzazione pre-colonna degli analiti con 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) secondo le seguenti reazioni (Fig. 4,5):

Fig.4. Reazione di derivatizzazione del Glifosate

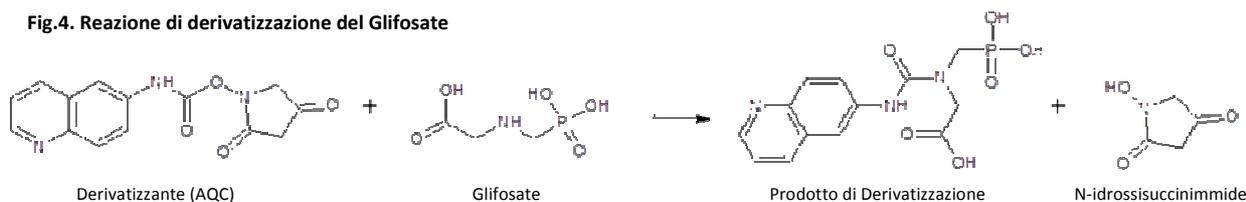
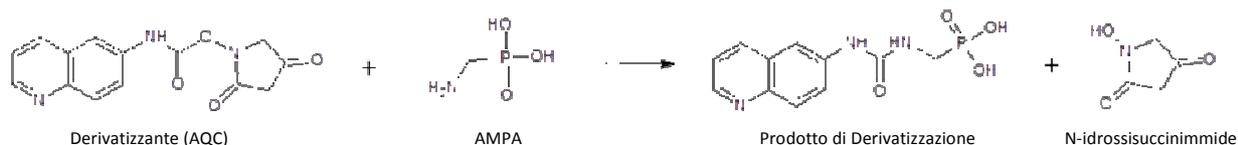


Fig. 5. Reazione di derivatizzazione dell'AMPA



L' identificazione e quantificazione è effettuata in cromatografia liquida ad alta prestazione accoppiata alla spettrometria di massa (UPLC–ESI–MS/MS).

Procedura analitica



Preparazione del campione

La preparazione del campione prevede l'aggiunta di una miscela di standard di riferimento isotopicamente arricchiti (1,2-¹³C₂¹⁵N Glifosate e ¹³C¹⁵N AMPA) e la successiva derivatizzazione, direttamente in vial.



Gli analiti sono separati in gradiente di eluizione e determinati secondo le condizioni ottimizzate in fase di sviluppo del metodo (Tab. 2).

Tab. 2 Condizioni cromatografiche

Principali parametri cromatografici	
Colonna	Acquity UPLC HSS T3 1.8µm 2.1 x 100 mm
Temperatura colonna	40°C
Fase eluente A	Acqua, acido formico 0,1%
Fase eluente B	Acetonitrile, acido formico 0,01%
Volume di iniezione	30 µL

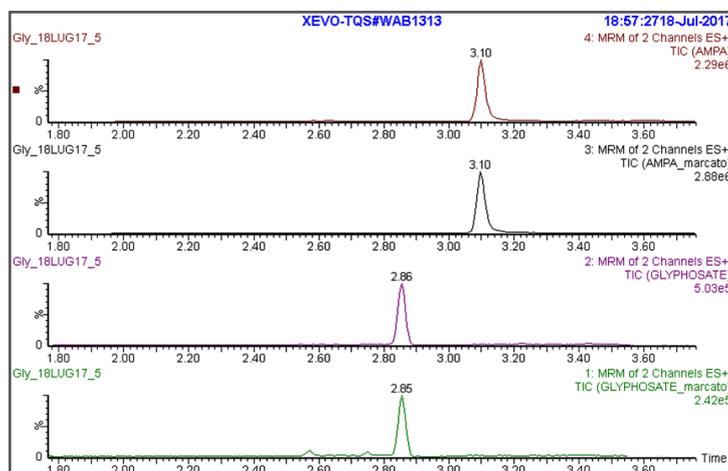
Il metodo di massa prevede una ionizzazione positiva mediante interfaccia ESI ed analisi in modalità MRM (Multiple Reaction Monitoring). I rapporti massa/carica (m/z) ricercati, caratteristici delle specie ioniche in oggetto, sono indicati in tabella 3

Tab. 3 Condizioni spettrometriche

Nome	Formula	Transizione Quantificatrice (m/z)	Transizione Qualificatrice (m/z)
Glifosate-AQC	C ₁₃ H ₁₄ N ₃ O ₆ P	340.1 > 171.10	340.1 > 116.25
1,2- ¹³ C ₂ ¹⁵ N Glifosate-AQC	C ₁₃ H ₁₄ N ₃ O ₆ P	342.1 > 171.10	342.1 > 116.25
AMPA-AQC	C ₁₁ H ₁₂ N ₃ O ₄ P	282.0 > 171.10	282.0 > 116.25
¹³ C ¹⁵ N AMPA-AQC	C ₁₁ H ₁₂ N ₃ O ₄ P	284.0 > 171.10	284.0 > 116.25

Di seguito sono riportati i cromatogrammi (TIC) relativi ai prodotti di derivatizzazione degli analiti (Glifosate-AQC, AMPA-AQC) e dei rispettivi standard marcati. (1,2-¹³C₂¹⁵N Glifosate-AQC, ¹³C¹⁵N AMPA-AQC) ottenuti mediante UPLC-ESI-MS/MS (Fig 6).

Fig. 6 Cromatogrammi di massa in total ion current (TIC)



La quantificazione è ricavata dal calcolo del rapporto tra la risposta del Glifosate nel campione rispetto a quello dello standard marcato, aggiunto prima della derivatizzazione, in funzione dei fattori di risposta eseguiti in isoconcentrazione per la coppia Glifosate 1,2-¹³C₂¹⁵N /Glifosate e AMPA/ ¹³C¹⁵N AMPA.

Il presente metodo è stato caratterizzato in termini di ripetibilità (CV%), linearità, limite di quantificazione (LOQ) (Tab. 4, Fig 7,8) ed esattezza.

Tab. 4 Parametri di ottimizzazione del metodo di prova

NOME	r ²	LOQ (µg/L)	CV %
Glifosate	0.999	0.01	<10
AMPA	0.999	0.01	<10
1,2- ¹³ C ₂ ¹⁵ N Glifosate	0.999	0.01	<10
¹³ C ¹⁵ N AMPA	0.999	0.01	<10

Fig. 7 Curve di calibrazione Glifosate e 1,2-¹³C₂¹⁵N Glifosate

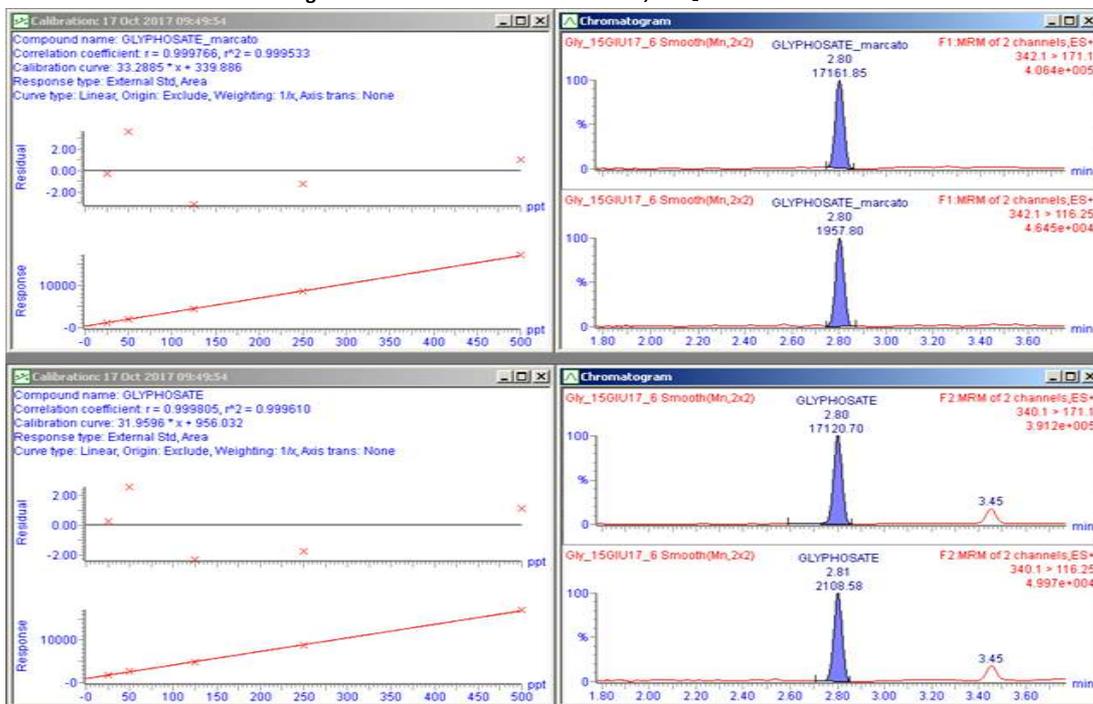
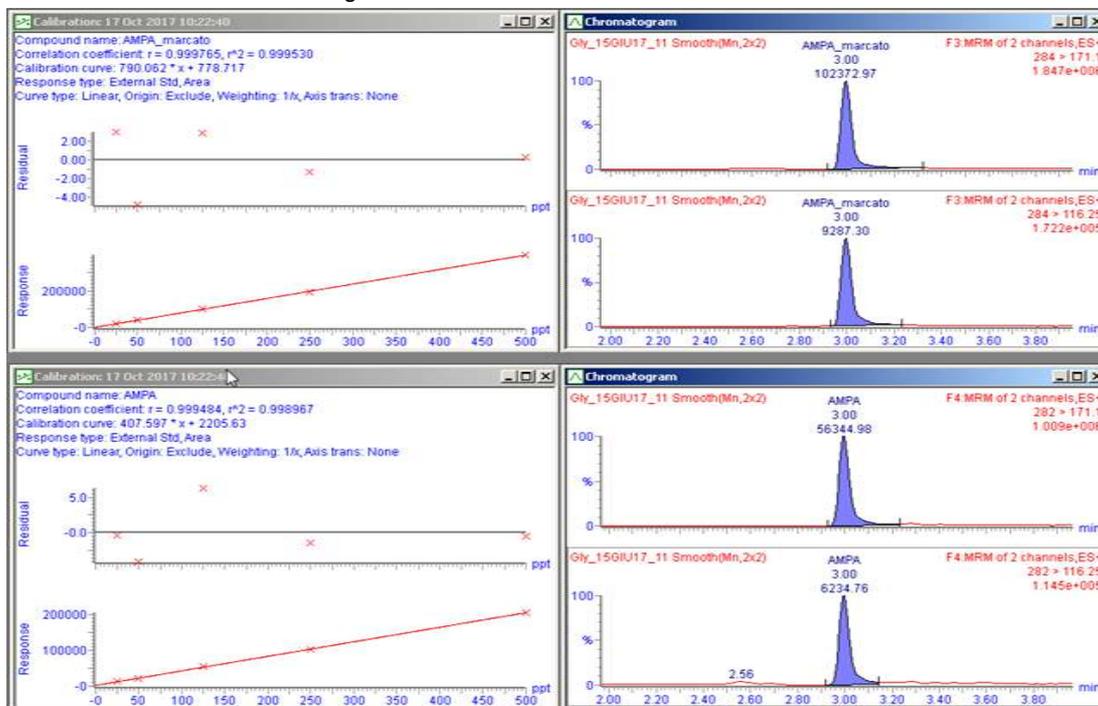


Fig. 8 Curve di calibrazione di AMPA e ¹³C¹⁵N AMPA



Gli esiti del circuito interlaboratorio Proficiency testing–LCG Standard Aquacheck AQ-08 per Glifosate e l'AMPA in acque sotterranee, a cui la Struttura ha partecipato nel settembre 2017, hanno restituito risultati soddisfacenti in termini accuratezza e precisione, dimostrando l' idoneità del laboratorio all'esecuzione della prova. Il campo di applicabilità è riferibile alle acque interne (superficiali, sotterranee) con un LOQ di 0.01 µg/L e un range di linearità fino a 5 µg/L.

9 Rilevazione di Glifosate ed AMPA nelle acque interne del monitoraggio della Provincia di Ragusa

Il metodo di prova è stato applicato alla ricerca di Glifosate ed AMPA in campioni di acque superficiali e sotterranee prelevati nel 2016 nell'ambito del monitoraggio effettuato dalla Struttura di Ragusa dei corpi idrici appartenenti al territorio ragusano (Tab. 5,6).

Tab.5 Anagrafica siti di prelievo acque sotterranee

CODICE STAZIONE	LATITUDINE	LONGITUDINE	DESTINAZIONE
1	36°57'46.42"N	14°26'5.70"E	uso potabile
2	36°54'3.38"N	14°52'56.34"E	
3	36°47'59.02"N	14°53'36.72"E	uso potabile
4	36°44'39.62"N	14°50'51.44"E	uso potabile
5	36°45'14.79"N	14°57'44.46"E	uso potabile
6	36°56'28.29"N	14°36'17.89"E	uso potabile
7	36°44'31.71"N	14°52'57.28"E	uso potabile
8	36°44'53.27"N	14°50'26.84"E	uso potabile
9	36°54'27.30"N	14°44'26.36"E	uso potabile
10	36°53'4.04"N	14°44'4.27"E	
11	36°58'50.19"N	14°27'53.95"E	
12	36°53'2.73"N	14°31'23.65"E	
13	36°53'2.65"N	14°31'26.05"E	
14	36°49'50.48"N	14°31'55.98"E	uso potabile
15	36°52'55.10"N	14°31'19.85"E	
16	36°48'48.78"N	14°30'40.94"E	uso potabile
17	36°56'58.20"N	14°34'14.52"E	uso potabile
18	36°56'58.95"N	14°34'12.04"E	uso potabile
19	36°56'59.65"N	14°34'10.10"E	uso potabile
20	36°56'45.24"N	14°34'52.86"E	uso potabile
21	36°57'12.97"N	14°29'50.16"E	
22	36°57'1.62"N	14°29'45.96"E	
23	36°57'14.99"N	14°28'15.51"E	
24	36°58'14.29"N	14°28'53.60"E	
25	36°58'4.97"N	14°26'31.92"E	
26	36°56'30.61"N	14°24'59.17"E	
27	36°58'25.62"N	14°28'36.04"E	
28	36°52'35.20"N	14°27'4.27"E	
29	36°54'19.88"N	14°28'9.19"E	
30	36°59'24.00"N	14°25'23.00"E	
31	36°59'27.25"N	14°25'11.01"E	
32	36°59'26.6"N	14°25'32.44"E	

33	36°58'59.34"N	14°26'2.00"E	
34	37° 3'11.82"N	14°49'7.01"E	uso potabile
35	36°54'51.07"N	14°49'48.05"E	uso potabile
36	37°3'24.82"N	14°46'9.40"E	uso potabile
37	36°54'21.06"N	14°26'32.25"E	
38	36°57'8.28"N	14°29'41.87"E	
39	36°57'13.85"N	14°29'54.91"E	
40	36°57'26.31"N	14°29'34.58"E	
41	36°57'17.96"N	14°29'31.96"E	
42	36°57'33.11"N	14°29'18.39"E	
43	36°57'21.53"N	14°29'24.35"E	
44	37° 3'18.47"N	14°41'4.98"E	
45	36° 57'47.08"N	14°48'21.54"E	uso potabile

Tab. 6 Anagrafica siti di prelievo acque superficiali

CODICE STAZIONE	LATITUDINE	LONGITUDINE
46	36°58'30.20"N	14°46'35.10"E
47	37° 1'6.96"N	14°25'59.36"E
48	36°44'48.50"N	14°55'5.90"E
49	36°55'48.80"N	14°55'15.80"E
50	36°53'21.80"N	14°28'55.90"E
51	37° 3'45.90"N	14°34'45.70"E
52	36°56'48.30"N	14°32'35.70"E
53	36°59'44.20"N	14°46'41.40"E
54	37° 3'19.60"N	14°34'27.00"E
55	36°47'18.14"N	14°36'5.88"E
56	36°59'44.20"N	14°46'41.40"E
57	36°51'52.40"N	14°43'37.29"E
58	36°55'40.60"N	14°45'10.84"E

In particolare per le acque sotterranee sono stati selezionati campioni prelevati in siti della rete di monitoraggio, ricadenti in aree adibite prevalentemente all'agricoltura intensiva in serra, nei quali è evidenziato uno stato della risorsa "non buono" per il superamento dello SQA del parametro pesticidi.

Le frequenze di rilevazione di Glifosate ed AMPA (Tab. 7), soprattutto per quel che riguarda le acque sotterranee, superano il dato nazionale restituito da ISPRA nel report del 2016 [1].

Tab. 7 Frequenze di rivelazione di Glifosate e AMPA

CAMPIONI ANALIZZATI		GLIFOSATE		AMPA	
		% campioni positivi (*)	% campioni superiori allo SQA-MA(**)	% campioni positivi(*)	% campioni superiori allo SQA-MA(**)
Acque superficiali	42	42.8	16.7	97.6	59.5
Acque sotterranee	58	79.3	55.1	68.9	15.5

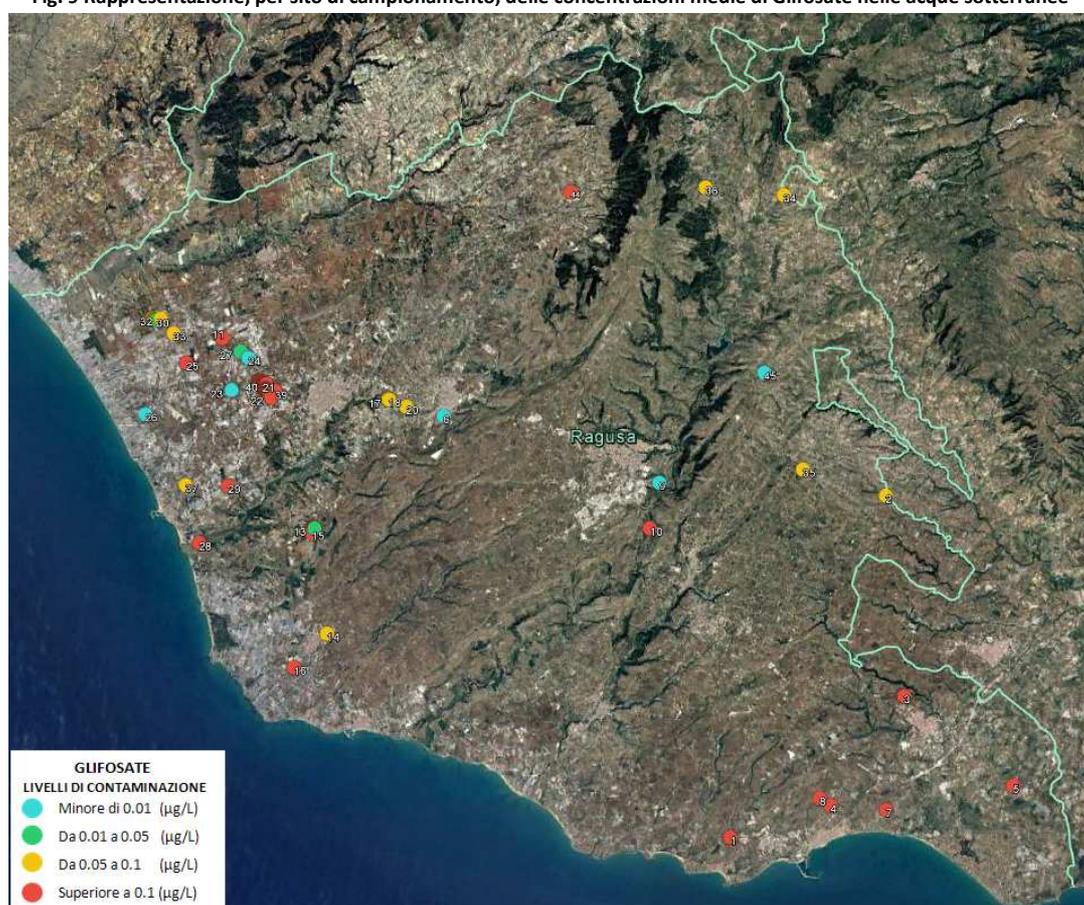
(*)Concentrazione superiore a 0.01 µg/L - (***)Concentrazione superiore a 0.1 µg/L

9.1 Risultati della ricerca di Glifosate e AMPA nelle acque sotterranee

9.1.1 Concentrazioni medie di Glifosate

Nella Figura 9 sono rappresentate le concentrazioni medie di Glifosate misurate nelle acque sotterranee nel 2016

Fig. 9 Rappresentazione, per sito di campionamento, delle concentrazioni medie di Glifosate nelle acque sotterranee



Il 13.3 % dei siti indagati non ha mostrato positività (valori medi annui < 0.01 µg/L), nel 6.7 % e nel 31.1 % dei casi sono stati riscontrati rispettivamente valori medi annui compresi tra 0.01 e 0.05 µg/L e tra 0.05 e 0.1 µg/L. Nel 48.9 % dei siti le medie annue sono maggiori dello SQA. I valori sono riportati in Tabella 8.

Tab. 8 Concentrazione media rilevata, per sito di campionamento di Glifosate nelle acque sotterranee

CODICE STAZIONE	MISURE TOTALI	Valore minimo (µg/L)	Valore massimo (µg/L)	Valore medio (µg/L)
1	3	< 0.01	0.17	0.11
2	1	0.08	0.08	0.08
3	1	0.16	0.16	0.16
4	1	0.15	0.15	0.15
5	1	0.17	0.17	0.17
6	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
7	2	0.14	0.19	0.17
8	2	0.18	0.77	0.47
9	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
10	1	0.20	0.20	0.20
11	1	0.13	0.13	0.13
12	1	0.20	0.20	0.20
13	1	0.04	0.04	0.04
14	2	0.03	0.16	0.09
15	1	0.21	0.21	0.21
16	2	0.08	0.17	0.12
17	2	< 0.01	0.17	0.09
18	2	0.02	0.14	0.08
19	2	< 0.01	0.16	0.08
20	2	< 0.01	0.15	0.08
21	2	0.04	0.16	0.10
22	1	0.12	0.12	0.12
23	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
24	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
25	1	0.84	0.84	0.84
26	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
27	1	0.02	0.02	0.02
28	1	0.23	0.23	0.23
29	1	0.13	0.13	0.13
30	1	0.04	0.04	0.04
31	1	0.07	0.07	0.07
32	1	0.08	0.08	0.08
33	1	0.06	0.06	0.06
34	1	0.06	0.06	0.06
35	1	0.08	0.08	0.08
36	1	0.10	0.10	0.10
37	2	< 0.01	0.16	0.08
38	2	< 0.01	0.15	0.07
39	1	0.17	0.17	0.17
40	1	0.16	0.16	0.16
41	1	0.16	0.16	0.16
42	1	0.19	0.19	0.19
43	1	0.17	0.17	0.17
44	1	0.17	0.17	0.17
45	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01

Livelli di contaminazione :  Minore di 0.01 µg/L  Da 0.01 a 0.05 µg/L  Da 0.05 a 0.1 µg/L  Superiore a 0.1 µg/L

Particolarmente significativi appaiono i risultati delle indagini su alcuni pozzi destinati all'uso potabile, di cui è di seguito riportata l'anagrafica (Tab. 9).

Tab. 9 Concentrazione media rilevata, per sito con destinazione ad uso potabile, di Glifosate nelle acque sotterranee

CODICE STAZIONE	MISURE TOTALI	Valore medio (µg/L)
1	3	0.11
3	1	0.16
4	1	0.15
5	1	0.17
6	1	< 0.01
7	2	0.17
8	2	0.47
9	1	< 0.01
14	2	0.09
16	2	0.12
17	2	0.09
18	2	0.08
19	2	0.08
20	2	0.08
35	1	0.08
36	1	0.10
45	1	< 0.01

Livelli di contaminazione

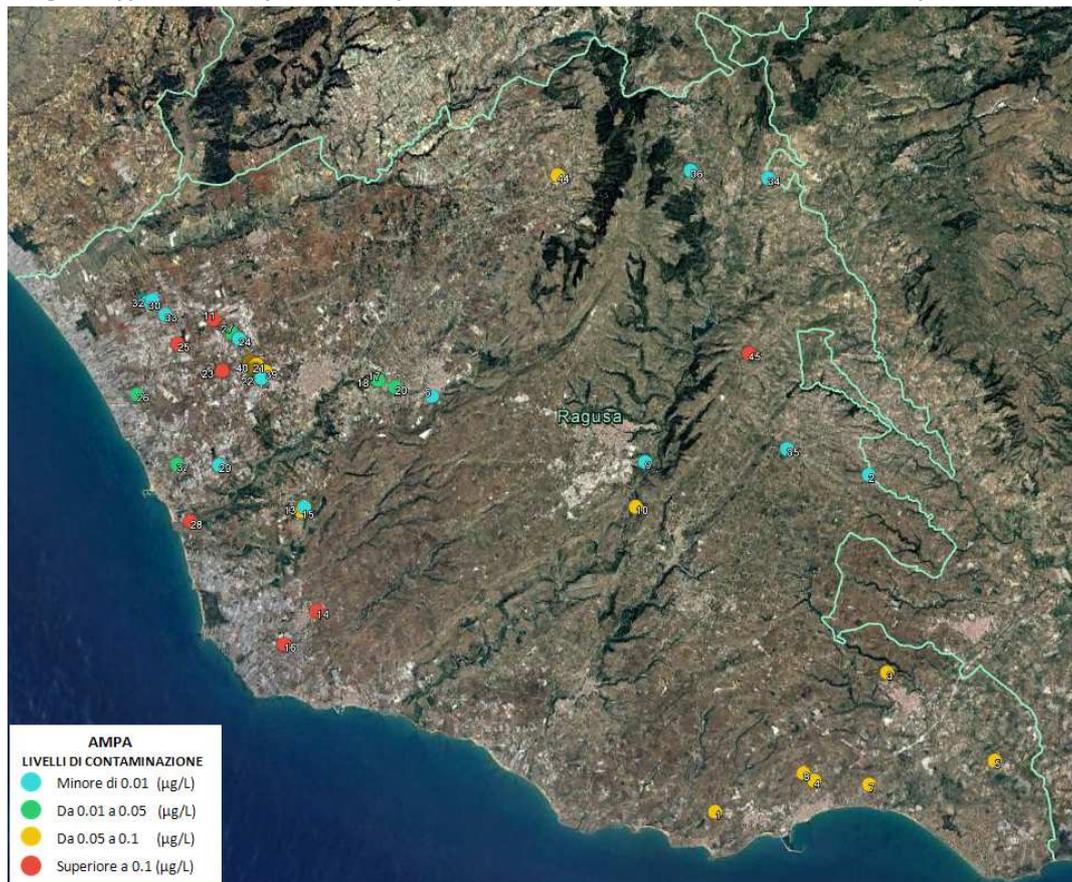
■ Minore di 0.01 (µg/L)	■ Da 0.01 a 0.05 (µg/L)	■ Da 0.05 a 0.1 (µg/L)	■ Superiore a 0.1 (µg/L)
--	--	--	---

L'82% dei pozzi di acque destinate al consumo umano presenta delle positività mentre il 41 % mostra il superamento dello SQA.

9.1.2 Concentrazioni medie di AMPA

Nella Figura 10 sono rappresentate le concentrazioni medie di AMPA riscontrate nelle acque sotterranee nel 2016.

Fig. 10 Rappresentazione, per sito di campionamento, delle concentrazioni medie di AMPA nelle acque sotterranee



Il 31.1 % dei siti indagati non ha mostrato positività (valori medi annui $< 0.01 \mu\text{g/L}$), nel 17.7 % e 35.6 % dei casi sono stati riscontrati rispettivamente valori medi compresi tra 0.01 e $0.05 \mu\text{g/L}$ e tra 0.05 e $0.1 \mu\text{g/L}$. Il 15.6% dei siti ha mostrato tenori superiori allo SQA. Le concentrazioni sono riportate in Tabella 10

Tab.10 Concentrazione media rilevata, per sito di campionamento di AMPA nelle acque sotterranee

CODICE STAZIONE	MISURE TOTALI	Valore minimo (µg/L)	Valore massimo (µg/L)	Valore medio (µg/L)
1	3	0.03	0.09	0.06
2	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
3	1	0.08	0.08	0.08
4	1	0.06	0.06	0.06
5	1	0.06	0.06	0.06
6	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
7	2	0.03	0.10	0.07
8	2	0.06	0.10	0.08
9	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
10	1	0.10	0.10	0.10
11	1	0.99	0.99	0.99
12	1	0.09	0.09	0.09
13	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
14	2	0.06	0.15	0.11
15	1	0.10	0.10	0.10
16	2	0.04	0.43	0.24
17	2	0.03	0.06	0.05
18	2	0.03	0.05	0.04
19	2	0.04	0.05	0.05
20	2	< 0.01	0.04	0.02
21	2	< 0.01	0.10	0.05
22	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
23	1	0.16	0.16	0.16
24	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
25	1	0.22	0.22	0.22
26	1	0.01	0.01	0.01
27	1	0.03	0.03	0.03
28	1	1.82	1.82	1.82
29	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
30	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
31	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
32	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
33	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
34	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
35	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
36	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
37	2	< 0.01	0.05	0.03
38	2	< 0.01	0.04	0.02
39	1	0.09	0.09	0.09
40	1	0.05	0.05	0.05
41	1	0.06	0.06	0.06
42	1	0.08	0.08	0.08
43	1	0.09	0.09	0.09
44	1	0.10	0.10	0.10
45	1	0.16	0.16	0.16

Livelli di contaminazione : ■ Minore di 0.01 µg/L ■ Da 0.01 a 0.05 µg/L ■ Da 0.05 a 0.1 µg/L ■ Superiore a 0.1 µg/L

Relativamente ai pozzi di acque destinate al consumo umano, anche nel caso dell'AMPA sono state riscontrate concentrazioni superiori al limite di legge, sebbene con frequenza minore rispetto al Glifosate (Tab.11).

Tab. 11 Concentrazione media rilevata, per sito con destinazione ad uso potabile, di AMPA nelle acque sotterranee

CODICE STAZIONE	MISURE TOTALI	Valore medio ($\mu\text{g/L}$)
1	3	0.06
3	1	0.08
4	1	0.06
5	1	0.06
6	1	< 0.01
7	2	0.07
8	2	0.08
9	1	< 0.01
14	2	0.11
16	2	0.24
17	2	0.05
18	2	0.04
19	2	0.05
20	2	0.02
35	1	< 0.01
36	1	< 0.01
37	2	0.03

Livelli di contaminazione

	Minore di 0.01 ($\mu\text{g/L}$)		Da 0.01 a 0.05 ($\mu\text{g/L}$)		Da 0.05 a 0.1 ($\mu\text{g/L}$)		Superiore a 0.1 ($\mu\text{g/L}$)
---	------------------------------------	---	------------------------------------	---	-----------------------------------	--	-------------------------------------

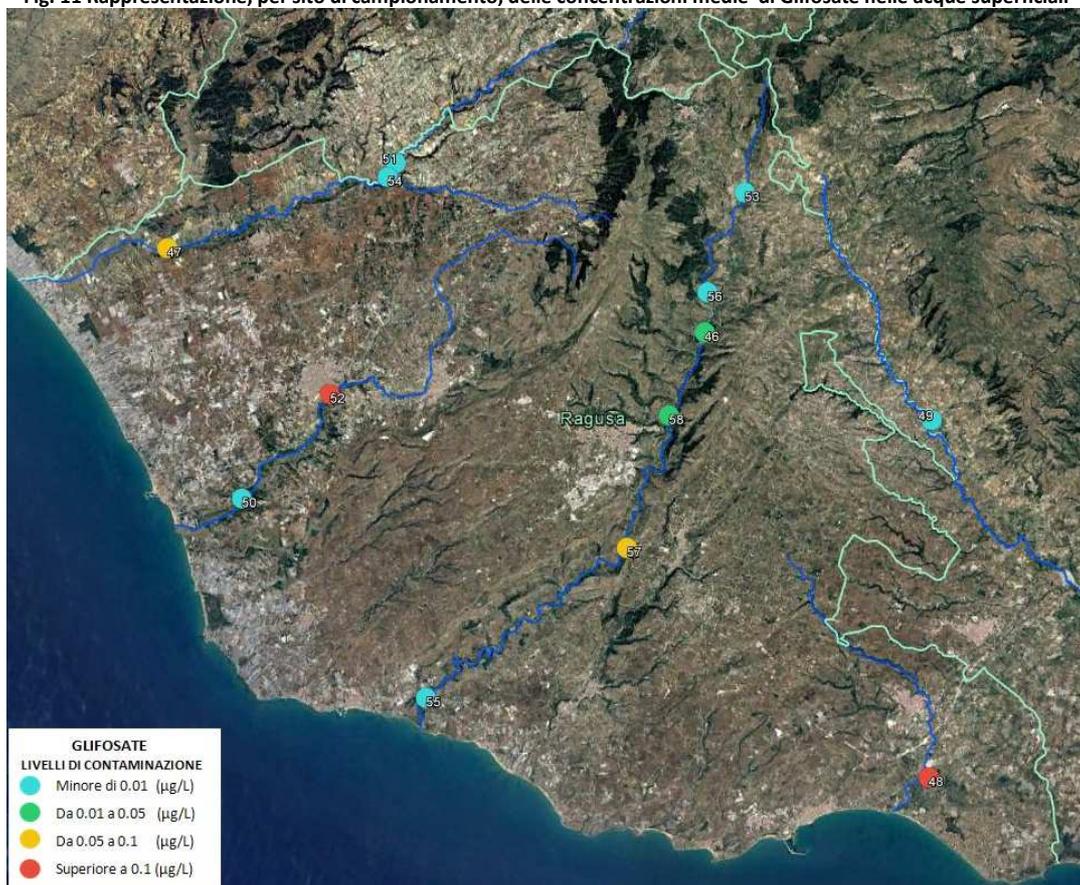
Tenori superiori a 0.05 $\mu\text{g/L}$ sono state rilevate nel 35.3% dei siti. L'11.7% dei campioni ha mostrato il superamento dello SQA.

9.2 Risultati della ricerca di Glifosate e AMPA nelle acque superficiali

9.2.1 Concentrazioni medie di Glifosate

Nella Figura 11 sono rappresentate le concentrazioni medie di Glifosate misurate in alcuni campioni del monitoraggio delle acque superficiali, svolto dalla Struttura di Ragusa nel 2016.

Fig. 11 Rappresentazione, per sito di campionamento, delle concentrazioni medie di Glifosate nelle acque superficiali



Il 53.8 % dei siti indagati non ha mostrato positività (valori medi annui < 0.01 µg/L), nel 15.4 % dei casi sono stati riscontrati rispettivamente valori compresi tra 0.01 e 0.05 µg/L e tra 0.05 e 0.1 µg/L. Il 15 % dei siti ha mostrato tenori superiori allo SQA. I valori sono riportati in Tabella 12.

Tab. 12 Concentrazione media rilevata, per sito di campionamento di Glifosate nelle acque superficiali

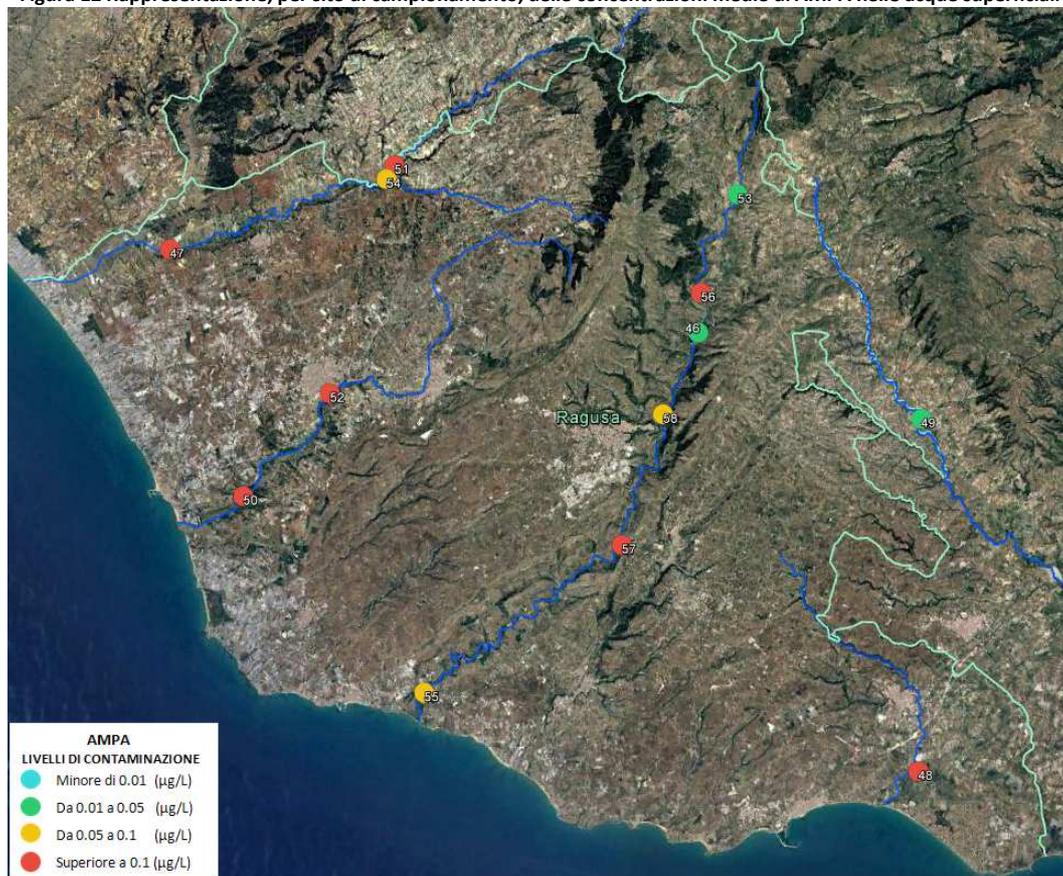
CODICE STAZIONE	MISURE TOTALI	Valore minimo (µg/L)	Valore massimo (µg/L)	Valore medio (µg/L)
46	8	< 0.01	0.08	0.01
47	4	< 0.01	0.23	0.07
48	2	0.14	0.20	0.17
49	4	< 0.01	< 0.01	< 0.01
50	4	< 0.01	< 0.01	< 0.01
51	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
52	3	0.23	0.37	0.32
53	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
54	1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
55	2	< 0.01	0.02	< 0.01
56	4	< 0.01	< 0.01	< 0.01
57	4	0.03	0.10	0.07
58	4	0.02	0.03	0.02

Livelli di contaminazione : ■ Minore di 0.01 µg/L ■ Da 0.01 a 0.05 µg/L ■ Da 0.05 a 0.1 µg/L ■ Superiore a 0.1 µg/L

9.2.2 Concentrazioni medie di AMPA

Nella Figura 12 sono rappresentate le concentrazioni medie dell'AMPA rilevate nelle acque superficiali nel 2016.

Figura 12 Rappresentazione, per sito di campionamento, delle concentrazioni medie di AMPA nelle acque superficiali



Tutti i siti indagati hanno mostrato positività (valori medi annui > 0.01 µg/L), nel 23.1 % dei casi sono stati riscontrati rispettivamente valori compresi tra 0.01 e 0.05 µg/L e tra 0.05 e 0.1 µg/L. Il 35.8 % dei siti ha mostrato valori superiori allo SQA. Le concentrazioni sono riportate in Tabella 13

Tab. 13 Concentrazione media rilevata, per sito di campionamento di AMPA nelle acque superficiali

CODICE STAZIONE	MISURE TOTALI	Valore minimo (µg/L)	Valore massimo (µg/L)	Valore medio (µg/L)
46	8	0.01	0.03	0.02
47	4	0.24	2.07	1.25
48	2	1.54	2.15	1.84
49	4	< 0.01	0.06	0.03
50	4	1.25	3.23	2.36
51	1	0.22	0.22	0.22
52	3	1.61	2.55	1.97
53	1	0.01	0.01	0.01
54	1	0.09	0.09	0.09
55	2	0.03	0.11	0.07
56	4	0.22	1.04	0.48
57	4	0.41	0.97	0.74
58	4	0.06	0.14	0.10

Livelli di contaminazione: ■ Minore di 0.01 µg/L ■ Da 0.01 a 0.05 µg/L ■ Da 0.05 a 0.1 µg/L ■ Superiore a 0.1 µg/L

10 Conclusioni

Lo sviluppo e la validazione del metodo di determinazione del Glifosate proposto dalla Ditta Waters e la successiva applicazione a campioni del monitoraggio idrico, eseguita dalla Struttura Territoriale di Ragusa, ha permesso di verificare l'applicabilità del metodo alla routine analitica di un laboratorio che esegue ordinariamente l'indagine di pesticidi su campioni d'acqua, dotato di strumentazione di ultima generazione. I tempi rapidi di derivatizzazione, l'impiego di volumi ridotti di campione, la stabilità dei composti derivatizzati, l'idoneità a garantire limiti di quantificazione coerenti alle prestazioni richieste dalla Normativa ambientale, ne fanno una valida alternativa ai metodi d'analisi tradizionali ed a quelli che prevedono l'impiego di strumentazione dedicata.

L'esperienza maturata dal laboratorio della Struttura di Ragusa pone ARPA Sicilia nelle condizioni di rispondere all'esigenza di monitoraggio del Glifosate richiamata dall'ISPRA nel rapporto 2016.

L'indagine su alcuni campioni di acque sotterranee e superficiali, prelevati nell'ambito del monitoraggio dell'ambiente idrico svolto dalla Struttura nel 2016, ha confermato anche per il territorio Ragusano la rilevanza ambientale del Glifosate. Infatti ad una pressione potenziale sugli ecosistemi rilevante, per consumi e caratteristiche intrinseche del pesticida, corrisponde un impatto ambientale notevole che la determinazione del fitofarmaco e del suo prodotto di degradazione in campioni del monitoraggio,

restituisce in termini di frequenze di rilevazione e percentuali di superamento dello standard di qualità ambientale anche in acque destinate al consumo umano.

La ricerca del Glifosate e dell'AMPA, in relazione alle risorse umane e materiali assegnate al laboratorio della Struttura, verrà estesa a tutti i siti del monitoraggio dell'ambiente idrico, gestiti nel 2017 dalla ST di Ragusa, così da assicurare un maggiore approfondimento conoscitivo sui livelli di contaminazione della risorsa idrica correlati all'utilizzo di tale pesticida.

Bibliografia

- [1] [ISPRA, 2016] Rapporto nazionale pesticidi nelle acque. Dati 2013-2014. Rapporti ISPRA 244/2016
- [2] [D.Lgs. 152/2006] Decreto Legislativo del 3 aprile 2006, n.152, recante norme in materia ambientale. (G.U. n. 88 del 14 aprile 2006 - suppl. ord. n. 96).
- [3] Meyer, M. T., Loftin, K. A., Lee, E. A., Hinshaw, G. H., Dietze, J. E., & Scribner, E. A. (2009). Determination of glyphosate, its degradation product aminomethylphosphonic acid, and glufosinate, in water by isotope dilution and online solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry (No. 5-A10). US Geological Survey.
- [4] Shoval, S., and S. Yariv. "The interaction between roundup (glyphosate) and montmorillonite. Part I, Infrared study of the sorption of glyphosate by montmorillonite." *Clays Clay Miner* 27.1 (1979): 19-28.
- [5] IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. Lyon, France, 20 March 2015 International Agency Research on Cancer, Q&A on Glyphosate (IARC), 1 March 2016 Ionization
- [6] EFSA (European Food Safety Authority), 2015a. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal* 2015;13(issue):NNNN, 35 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.NNNN
- [7] EFSA (European Food Safety Authority), 2015b. Peer Review Report to the conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. Available at www.efsa.europa.eu
- [8] Anastassiades; D. I. Kolberg; E. Eichhorn; A. Benkenstein; S. Lukačević; D. Mack; C. Wildgrube; I. Sigalov; D. Dörk; A. Barth "Quick Method for the Analysis of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin via LC-MS/MS involving Simultaneous Extraction with Methanol (QuPPE-Method)" - EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides Version 8.1(March 2015)
- [9] Salazar, C., Armenta, J. M., & Shulaev, V. (2012). An UPLC-ESI-MS/MS assay using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate derivatization for targeted amino acid analysis: application to screening of arabidopsis thaliana mutants. *Metabolites*, 2(3), 398-428.
- [10] tecnLAB. Un nuovo metodo per l'analisi delle acque. ANNO V- N.5 settembre7ottobre
- [11] Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11945 /2015 Supersedes SANCO/ 12571/2013 Implemented by 01/01/2016
- [12] Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11945/2015.) nell'appendice A al Documento SANTE/11945/2015