# ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ

**ΣΤΕΛΛΑ ΚΟΝΤΟΥ**,
**ΓΕΝΙΚΟ ΧΗΜΕΙΟ ΤΟΥ ΚΡΑΤΟΥΣ, Δ΄ ΧΗΜΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΑΘΗΝΩΝ,**
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ,**
**ΑΝ. ΤΣΟΧΑ 16, 115 21 ΑΘΗΝΑ**
**e-mail:** gxk-pest@ath.forthnet.gr

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μέθοδοι που βασίζονται στην τεχνική της φασματομετρίας μάζας διπλού ιονισμού (MS/MS) βρίσκουν τα τελευταία χρόνια αυξανόμενη εφαρμογή για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών στα τρόφιμα. Στην Ε.Ε. έχουν εκδοθεί κατευθυντήριες οδηγίες για την επικύρωση των αναλυτικών MS/MS μεθόδων και έχουν καθορισθεί τα κριτήρια που πρέπει να ικανοποιούνται για την αξιόπιστη ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των υπολειμμάτων, σε μία προσπάθεια εναρμόνισης των εργαστηρίων του επισήμου ελέγχου τροφίμων σε αυτόν τον τομέα. Στα πλαίσια αυτά, στην παρούσα εργασία, παρουσιάζεται η ανάπτυξη και επικύρωση GC/MS/MS μεθόδου για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων τεσσάρων αντιπροσωπευτικών δραστικών ουσιών: terbuthylazine, procymidone oxyfluorfen και λ-cyhalothrin σε ένα σύνθετο υπόστρωμα τροφίμου, το ελαιόλαδο, δίνοντας έμφαση στο στάδιο επιλογής των παραμέτρων του ανιχνευτή για να ικανοποιηθούν τα κριτήρια για την αξιόπιστη επιβεβαίωση της ταυτότητας του αναλύτη και στις δοκιμασίες που επιτρέπουν την εκτίμηση του σφάλματος που οφείλεται στην επίδραση μήτρας κατά τη βαθμονόμηση.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Επικύρωση είναι η διαδικασία κατά την οποία προσδιορίζονται τα χαρακτηριστικά ποιότητας μίας μεθόδου, προκειμένου να εκτιμηθεί, εάν η μέθοδος είναι κατάλληλη για το σκοπό για τον οποίο προορίζεται (fit for purpose). Είναι πλέον κοινώς αποδεκτό ότι για να διασφαλισθεί η αξιοπιστία των αναλυτικών δεδομένων που προκύπτουν από χημικές δοκιμές και χρησιμοποιούνται ως βάση για τη λήψη σημαντικών αποφάσεων, αλλά και για να είναι εφικτή η αμοιβαία μεταξύ διαφορετικών κρατών αναγνώριση των δοκιμών αυτών στα πλαίσια του διεθνούς εμπορίου, απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η χρήση επικυρωμένων μεθόδων ανάλυσης από τα διαπιστευμένα εργαστήρια.

Η επικύρωση των μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών, σύμφωνα με κατευθυντήριες οδηγίες που έχουν εκδοθεί στα πλαίσια της Ε.Ε. (οδηγία 96/46/ΕΕ, SANCO/10232/2006 και SANCO/825/00), περιλαμβάνει την εκτίμηση των παραμέτρων που προβλέπονται γενικά για τις μεθόδους ποσοτικοποίησης (ορθότητα, επαναληψιμότητα, όριο ποσοτικού προσδιορισμού, εκλεκτικότητα, γραμμικότητα ανιχνευτή), λαμβάνοντας ωστόσο υπόψη τις ιδιαιτερότητες που ενέχει ο προσδιορισμός ιχνοποσοτήτων μίας ουσίας σε ένα σύνθετο υπόστρωμα, όπως είναι αυτό των τροφίμων, αλλά και πρακτικά θέματα, όπως είναι για παράδειγμα η μη διαθεσιμότητα πιστοποιημένων υλικών αναφοράς (CRMs) για τις μεθόδους υπολειμμάτων. Επιπλέον καθώς το ιστορικό των δειγμάτων, δηλαδή της εφαρμογής φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων, είναι συνήθως άγνωστο, δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στην επιβεβαίωση της ταυτότητας του αναλύτη, μέσω της εφαρμογής των κατάλληλων μεθόδων επιβεβαίωσης

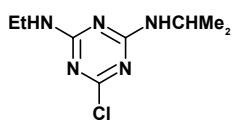
(confirmatory methods). Λόγω δε του μεγάλου αριθμού των συνδυασμών δραστική ουσία / υπόστρωμα, τα αρμόδια εργαστήρια ελέγχου χρησιμοποιούν ως επί το πλείστον τις λεγόμενες πολυ-υπολειμματικές (ή πολυ-δύναμες, multi-residue) μεθόδους με τις οποίες ανιχνεύεται και προσδιορίζεται ταυτόχρονα ένας μεγάλος αριθμός δραστικών ουσιών.

Οι μέθοδοι που βασίζονται στην τεχνική της φασματομετρίας μάζας διπλού ιονισμού (MS/MS) βρίσκουν ολοένα και αυξανόμενη εφαρμογή στον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών στα τρόφιμα καθώς οι απαιτήσεις της νομοθεσίας καθίστανται αυστηρότερες με στόχο τη διασφάλιση της υγείας του καταναλωτή και τα νομοθετικά όρια, τα Ανώτατα Όρια Υπολειμμάτων (MRL), καθίστανται αντιστοίχως χαμηλότερα. Η τεχνική MS/MS βασίζεται στην απομόνωση χαρακτηριστικού m/z ιόντος από την αρχική θραυσματοποίηση της ένωσης, το οποίο στη συνέχεια υφίσταται εκ νέου θραυσματοποίηση προκειμένου να διαχωρισθούν και να μετρηθούν τα παράγωγα ιόντα. Το κύριο πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι τόσο η υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα, όσο και η ικανότητα να παρέχει πληροφορίες για την ταυτότητα / χημική δομή του αναλύτη ώστε να μην απαιτείται η ποιοτική επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης. Οι αεριοχρωματογραφικές μέθοδοι σε συνδυασμό με ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας διπλού ιονισμού (GC/MS/MS) είναι κατάλληλες για σχετικά πτητικές και θερμικά σταθερές ενώσεις.

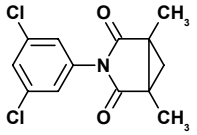
Με βάση όσα εκτέθηκαν ανωτέρω, για να θεωρηθεί η προς επικύρωση, διαμορφωμένη σε ένα εργαστήριο, GC/MS/MS μέθοδος κατάλληλη για τη «σκοπούμενη χρήση», θα πρέπει να αποδειχθεί ότι είναι αποδεκτή η ακρίβεια ως προς την ποσοτικοποίηση, και ταυτόχρονα ότι είναι δυνατή η ταυτοποίηση του αναλύτη σε ένα επιθυμητό επίπεδο εμπιστοσύνης. Η Απόφαση 2002/657/ΕΚ της Επιτροπής [1] καθορίζει ακριβώς τα σχετικά κριτήρια που πρέπει να ικανοποιούνται σε MS – μεθόδους, εισάγοντας ένα σύστημα ελάχιστων «βαθμών ταυτοποίησης» (identification points) που σχετίζονται με τον ελάχιστο αριθμό διαγνωστικών ιόντων, και τη μέγιστη επιτρεπτή διακύμανση στη σχετική αφθονία των ιόντων στο φάσμα. Μία σημαντική επομένως παράμετρος των μεθόδων αυτών είναι η επίτευξη χαμηλών ορίων ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού διασφαλίζοντας ταυτόχρονα ότι το αναλυτικό σήμα αντιστοιχεί στην προς προσδιορισμό ουσία για την αποφυγή ψευδώς-θετικών αποτελεσμάτων.

Η πορεία επικύρωσης μεθόδου GC/MS/MS είναι επιπλέον σκόπιμο να περιλαμβάνει στάδιο εκτίμησης του σφάλματος στο στάδιο της βαθμονόμησης που οφείλεται στην επίδραση μήτρας (matrix-effect), καθώς έχει παρατηρηθεί ότι συχνά συνεκλουόμενα συστατικά του υποστρώματος επηρεάζουν την μέτρηση του αναλύτη (λόγω αύξησης ή μείωσης του σήματος) χωρίς ωστόσο να παρέχουν σήμα στον ανιχνευτή στις συνθήκες μέτρησης. Η επίδραση μήτρας έχει επιπτώσεις στην ακρίβεια, αναπαραγωγιμότητα και ευαισθησία της μεθόδου και εφόσον κριθεί ότι είναι σημαντική θα πρέπει να υιοθετηθεί η κατάλληλη προσέγγιση για την αντιμετώπισή της.

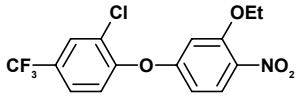
Στην εργασία αυτή παρουσιάζεται η πορεία και τα αποτελέσματα της επικύρωσης μεθόδου GC/MS/MS για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων αντιπροσωπευτικών δραστικών ουσιών: terbuthylazine, procymidone oxyfluorfen και λ-cyhalothrin (Σχήμα 1) σε ένα σύνθετο υπόστρωμα τροφίμου, το ελαιόλαδο, δίνοντας έμφαση στο στάδιο επιλογής των παραμέτρων του ανιχνευτή για να ικανοποιηθούν τα κριτήρια για την αξιόπιστη επιβεβαίωση της ταυτότητας του αναλύτη με βάση τις απαιτήσεις της κοινοτικής νομοθεσίας (επιλογή διαγνωστικών ιόντων, επαναληψιμότητα της σχετικής έντασης των παραγώγων ιόντων στο φάσμα MS/MS), και στις δοκιμασίες που επιτρέπουν την εκτίμηση του σφάλματος που οφείλεται στην επίδραση μήτρας κατά τη βαθμονόμηση.



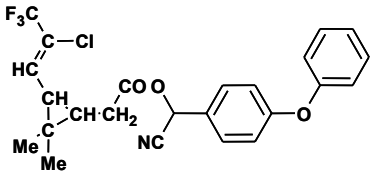

terbuthylazine




procymidone




oxyfluorfen




λ-cyhalothrin

Σχήμα 1. Χημική δομή των δραστικών ουσιών

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά, Αντιδραστήρια.

Η προμήθεια πιστοποιημένων προτύπων (certified standards) procymidone 98 %, oxyfluorfen 97,5 %, terbuthylazine 97,1 %, λ-cyhalothrin 98,5 % και heptachlor – endo – epoxide 99,5 % έγινε από τον οίκο Dr Ehrenstorfer (Augsberg, Germany). Αρχικά παρασκευάσθηκαν πυκνά stock διαλύματα μεμονωμένων προτύπων των ανωτέρω δραστικών ουσιών σε τολουόλιο, συγκέντρωσης 200 mg/L, εκ των οποίων στη συνέχεια παρασκευάστηκε διάλυμα εργασίας, συγκέντρωσης 2 mg/L, που περιείχε όλες τις προς προσδιορισμό ουσίες. Από το διάλυμα εργασίας προέκυψαν με κατάλληλη αραίωση τα διαλύματα βαθμονόμησης συγκέντρωσης 20 έως 200 μg/L. Η συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου (heptachlor – endo – epoxide) στα διαλύματα βαθμονόμησης ήταν σταθερή, ίση με 150 μg/L.

Οι διαλύτες ήταν pesticide grade. Χρησιμοποιήθηκαν στήλες εκχύλισης στερεάς φάσης Sep Pak ® Vac 6 cc (1g) Alumina N cartridges (WATERS, Part No WAT054575).

Αναλυτική μέθοδος

Ποσότητα δείγματος 5 g αραιώνεται με 40 mL ισοοκτανίου και εκχυλίζεται σε διαχωριστική χοάνη με 50 mL ακετονιτριλίου. Συλλέγεται η στιβάδα του ακετονιτριλίου η οποία συμπυκνώνεται σε συσκευή ταχείας εξάτμισης υπό κενό μέχρι όγκου 2 mL. Το συμπυκνωμένο εκχύλισμα εισάγεται σε στήλη εκχύλισης στερεάς φάσης Alumina N, η οποία έχει εξισορροπηθεί με 3 mL ακετονιτριλίου. Οι αναλύτες εκλούονται με 3 mL ακετονιτρίλιου. Το έκλουσμα συμπυκνώνεται σχεδόν μέχρι ξηρού. Το υπόλειμμα μεταφέρεται ποσοτικά με τολουόλιο σε ογκομετρική φιάλη των 2 mL όπου προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα του I.S (150 μL από διάλυμα 2 mg/L).

Αεριοχρωματογραφική ανάλυση με ανιχνευτή παγίδας ιόντων (τεχνική MS/MS)

Χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος με ανιχνευτή παγίδας ιόντων Thermo Finnigan GCQ, εφοδιασμένος με αυτόματο δειγματολήπτη AS 2000, και με τριχοειδή στήλη fused silica AT 5MS (Alltech) διαστάσεων 0,25 mm x 30 m και πάχους στιβάδος

0,25 μm. Σύμφωνα με το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου η αρχική θερμοκρασία των 60 ºC διατηρείται σταθερή για 1 min, στη συνέχεια αυξάνεται με 20 ºC / min έως τους 150 ºC, με 4 ºC / min έως τους 250 ºC, και τέλος με 40 ºC / min έως τους 270 ºC. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα split/splitless ήταν 220 ºC και ο όγκος του ενέσιμου δείγματος 2 μL. Η ροή του φέροντος αερίου (ήλιο) στη στήλη ήταν 1 mL $min^{-1}$.

Η θερμοκρασία της διόδου μεταφοράς (transfer line) ήταν 300 ºC / min και της πηγής ιονισμού (ion source) 180 ºC. Οι ρυθμίσεις των παραμέτρων MS/MS του ανιχνευτή ήταν οι ακόλουθες: precursor ion width 2, isolation time 16 ms, $q_z$ 0,225 (0,45 για την λ-cyhalothrin), excitation voltage 1.0, excitation time 30 ms.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

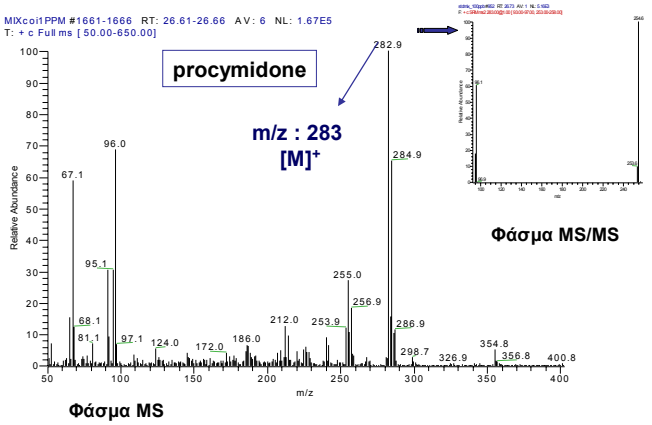
Επιλογή διαγνωστικών ιόντων – αριστοποίηση παραμέτρων ανιχνευτή MS/MS

Για τη μέτρηση ενός αναλύτη με την τεχνική MS/MS απαιτείται σε ένα αρχικό στάδιο η επιλογή των κατάλληλων διαγνωστικών ιόντων, δηλαδή του μητρικού ιόντος και των παράγωγων ιόντων, καθώς και η ρύθμιση των συνθηκών του ανιχνευτή ώστε η απομόνωση της μητρικής ένωσης και η απόδοση της θραυσματοποίησής της να είναι η βέλτιστη.

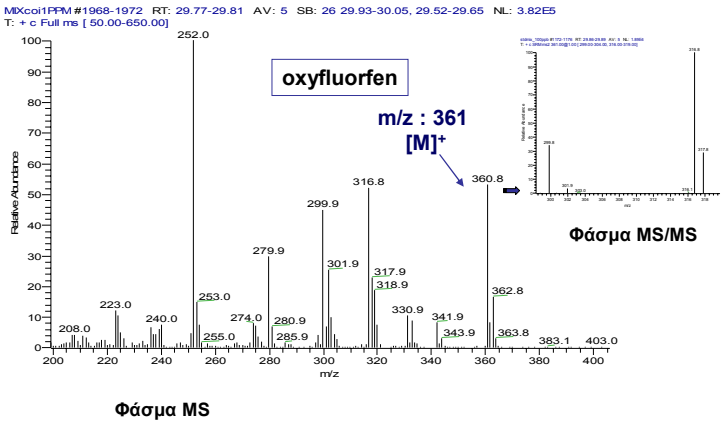
Για την επιλογή του μητρικού ιόντος ελήφθησαν υπόψη δύο παράγοντες: (α) το γεγονός ότι με την επιλογή του μοριακού ιόντος (ή ιόντος με υψηλή τιμή m/z) επιτυγχάνεται η βέλτιστη εκλεκτικότητα και (β) ότι η αφθονία του ιόντος στο αρχικό φάσμα καθορίζει την ευαισθησία. Επιπλέον στο MS/MS φάσμα θα πρέπει να παρακολουθούνται 2 τουλάχιστον παράγωγα ιόντα, τα πλέον άφθονα, δεδομένου ότι κριτήριο για την ασφαλή ταυτοποίηση μίας ένωσης αποτελεί η συμπλήρωση τριών (3) βαθμών ταυτοποίησης (identification points) όπου [1]:

— 1 βαθμός αντιστοιχεί για κάθε μητρικό ιόν και
— 1,5 βαθμός αντιστοιχεί για κάθε παράγωγο.

Ως αντιπροσωπευτικά παραδείγματα επιλογής διαγνωστικών ιόντων σύμφωνα με όσα εκτέθηκαν ανωτέρω, παρατίθενται στα σχήματα 2 και 3 τα MS φάσματα των δραστικών ουσιών procymidone και oxyfluorfen, καθώς και τα MS/MS φάσματα των μητρικών ιόντων που επιλέχθησαν. Στην πρώτη περίπτωση η επιλογή του μοριακού ιόντος (283 m/z) ως μητρικό ιόν είναι προφανής δεδομένου ότι είναι το πλέον άφθονο. Στη δεύτερη περίπτωση επιλέχθηκε επίσης το μοριακό ιόν (361 m/z) ως μητρικό ιόν, αν και είναι δεύτερο σε αφθονία στο φάσμα, με στόχο να επιτευχθεί υψηλότερη εκλεκτικότητα.



Σχήμα 2. Φάσμα full scan MS διαλύματος procymidone συγκέντρωσης 1 mg/L σε τολουόλιο. Στο ένθετο το MS/MS φάσμα του επιλεγμένου μητρικού ιόντος.




Σχήμα 3. Φάσμα full scan MS διαλύματος oxyfluorfen συγκέντρωσης 1 mg/L σε τολουόλιο. Στο ένθετο το MS/MS φάσμα του επιλεγμένου μητρικού ιόντος.

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα διαγνωστικά ιόντα για όλες τις προς προσδιορισμό ουσίες.

Πίνακας 1. Διαγνωστικά ιόντα για τον ποσοτικό προσδιορισμό και την ταυτοποίηση των προς προσδιορισμό ουσιών με την τεχνική GC/MS/MS.

| Χρόνος (min) | Αναλύτης | Μητρικό ιόν (m/z) | Παράγωγα ιόντα (m/z) |
|---|---|---|---|
| 10-20 | terbuthylazine | 214 | 131-137, 172-179 |
| 20-27 | heptachlor – endo - epoxide (IS) | 353 | 280-290, 314-326 |
| | procymidone | 283 | 93-97, 253-258 |
| 27-37 | oxyfluorfen | 361 | 299-304, 316-319 |
| 37-43 | λ-cyhalothrin | 181 | 151-153, 120-125 |

Οι παράμετροι του συστήματος ανίχνευσης που αριστοποιήθηκαν για κάθε ένωση-στόχο ήταν η παράμετρος $q_z$ (trapping parameter) που σχετίζεται με την απομόνωση της μητρικής ένωσης στην παγίδα ιόντων, καθώς και το δυναμικό που εφαρμόζεται για τη διέγερσή της (excitation voltage). Εξετάστηκαν 3 τιμές για την παράμετρο $q_z$ (από 0,2225 έως 0,45) και 4 τιμές για το δυναμικό διέγερσης (από 0,5 έως 2,0 V). Η βέλτιστη τιμή $q_z$ που βρέθηκε για όλες τις προς προσδιορισμό ουσίες ήταν 0,225 εκτός από την λ-cyhalothrin για την οποία η βέλτιστη τιμή βρέθηκε 0,45. Η βέλτιστη τιμή για το δυναμικό διέγερσης βρέθηκε 1 V.

Γραμμικότητα ανιχνευτή

Η γραμμικότητα του ανιχνευτή παγίδας ιόντων ελέγχθηκε στην περιοχή συγκεντρώσεων 20 έως 200 μg/L. Οι τιμές του συντελεστή συμμεταβολής $r^2$ βρέθηκαν υψηλότερες από 0,99. Επιπλέον κριτήριο αποδοχής της γραμμικότητας αποτέλεσε ο έλεγχος των υπολοίπων (residuals): η συγκέντρωση των προτύπων βαθμονόμησης δεν

διέφερε από την προβλεπόμενη από το γραμμικό μοντέλο τιμή περισσότερο από ± 10 % [2].

(Σημείωση: Η βαθμονόμηση πραγματοποίηθηκε με τη μέθοδο του εξωτερικού προτύπου. Μέσω του μεγέθους του σήματος του I.S. και των χαρακτηριστικών του MS/MS φάσματός του εκτιμάται η απόδοση του χρωματογραφικού συστήματος γενικά και του ανιχνευτή ειδικότερα στα πλαίσια του εσωτερικού ελέγχου ποιότητας.)

Επίδραση μήτρας (matrix effect)

Προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση μήτρας, συγκρίθηκε η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης που αντιστοιχεί σε πρότυπα διαλύματα των προς προσδιορισμό ουσιών σε καθαρό διαλύτη με αυτή που αντιστοιχεί σε πρότυπα παρασκευασμένα σε εκχύλισμα του μητρικού υλικού (εκχύλισμα λευκού δείγματος ελαιολάδου). Διαπιστώθηκε ότι η κλίση διαφέρει σημαντικά προκειμένου για τη δραστική ουσία procymidone, εύρημα που καταδεικνύει ότι η επίδραση μήτρας εξαρτάται όχι μόνο από τη σύσταση του μητρικού υλικού, αλλά και από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του αναλύτη.

Η πιο διαδεδομένη πρακτική για την αντιμετώπιση της επίδρασης μήτρας είναι ακριβώς η βαθμονόμηση με πρότυπα παρασκευασμένα σε μητρικό υλικό. Η χρήση σταθερού δευτεριωμένου ισοτόπου της προς προσδιορισμό ένωσης ως εσωτερικό πρότυπο σε φασματομετρικές μεθόδους αποτελεί τη βέλτιστη προσέγγιση όσον αφορά την ακρίβεια της μέτρησης, αλλά έχει υψηλό κόστος και δεν προσφέρεται για πολυ-υπολειμματικές μεθόδους ανάλυσης.

Ανάκτηση, επαναληψιμότητα

Δείγματα ελαιολάδου με μη ανιχνεύσιμες ποσότητες των προς προσδιορισμό δραστικών ουσιών εμβολιάσθηκαν σε 2 επίπεδα συγκέντρωσης, χαμηλό (10 μg/kg) και υψηλό (60 έως 100 μg/kg - περιοχή MRL), και εξετάσθηκαν υπό συνθήκες επαναληψιμότητας και ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας: 3 μετρήσεις δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές ημέρες ανά επίπεδο συγκέντρωσης.

Οι ανακτήσεις υπολογίσθηκαν με σύγκριση του εμβαδού της κορυφής του αναλύτη στο χρωματογράφημα του εμβολιασμένου δείγματος με την αντίστοιχη κορυφή του προτύπου διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό, μετά από κατάλληλη αραίωση (σε όγκο ίσο με τον όγκο του τελικού εκχυλίσματος του δείγματος). Η συγκέντρωση κάθε αναλύτη στα δείγματα υπολογίσθηκε με τη μέθοδο του εξωτερικού προτύπου, με τη βοήθεια καμπύλης βαθμονόμησης που κατασκευαζόταν την ημέρα της ανάλυσης, και από τα δεδομένα αυτά προσδιορίσθηκε η τυπική απόκλιση υπό συνθήκες επαναληψιμότητας ($s_r$) και ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας ($s_R$) με βάση τις επαναλαμβανόμενες $n$ μετρήσεις δειγμάτων σε $p$ διαφορετικές ημέρες σύμφωνα με τις ακόλουθες εξισώσεις [3]:

$$\sqrt{s_r^2} = \sqrt{\sum_{i=1}^{p} \frac{s_i^2}{p}} \qquad \text{(εξ. 1)}$$

$$s_R = \sqrt{s_L^2 + s_r^2} = \sqrt{\left[ \frac{p \sum_{i=1}^{p} \chi_i^2 - \left( \sum_{i=1}^{p} \chi_i \right)^2}{p(p-1)} - \frac{s_r^2}{n} \right] + s_r^2} \qquad \text{(εξ. 2)}$$

όπου $s_i$ η τυπική απόκλιση των μετρήσεων μίας ημέρας, $\chi_i$ η μέση τιμή των μετρήσεων μίας ημέρας και $s_L$ η τυπική απόκλιση των μετρήσεων που οφείλεται στην επίδραση της ημέρας.

Η μέση ανάκτηση στα διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης κυμάνθηκε από 85 έως 110 %, ενώ οι τιμές της % $RSD_R$ ήταν μικρότερες από 13 % (Πίνακας 2), και επομένως ικανοποιούν τα κριτήρια αποδοχής ως προς την ακρίβεια των μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων, σύμφωνα με τα οποία η μέση τιμή ανάκτησης θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 70 και 110 % και η $RSD_R$ να μην υπερβαίνει το 22 % [2].

Πίνακας 2. Ανάκτηση, επαναληψιμότητα (εκφρασμένη ως εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση $RSD_r$) και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (εκφρασμένη ως εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση $RSD_R$) της μεθόδου.

| | επίπεδο εμβολιασμού 10 μg/kg | | | επίπεδο εμβολιασμού 60-100 μg/kg | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Δραστική ουσία | Ανάκτηση (%) | $RSD_r$ (%) | $RSD_R$ (%) | Ανάκτηση (%) | $RSD_r$ (%) | $RSD_R$ (%) |
| terbuthylazine | 85 | 9 | 11 | 83 | 4 | 5 |
| procymidone | 98 | 7 | 10 | 104 | 5 | 13 |
| oxyfluorfen | 79 | 5 | 11 | 101 | 3 | 10 |
| λ-cyhalothrin | 110 | 9 | 12 | 81 | 4 | 8 |

Στο Σχήμα 4 παρουσιάζεται αντιπροσωπευτικό GC/MS/MS χρωματογράφημα δείγματος ελαιολάδου εμβολιασμένου σε επίπεδο συγκέντρωσης 60 – 100 mg/kg.

Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)

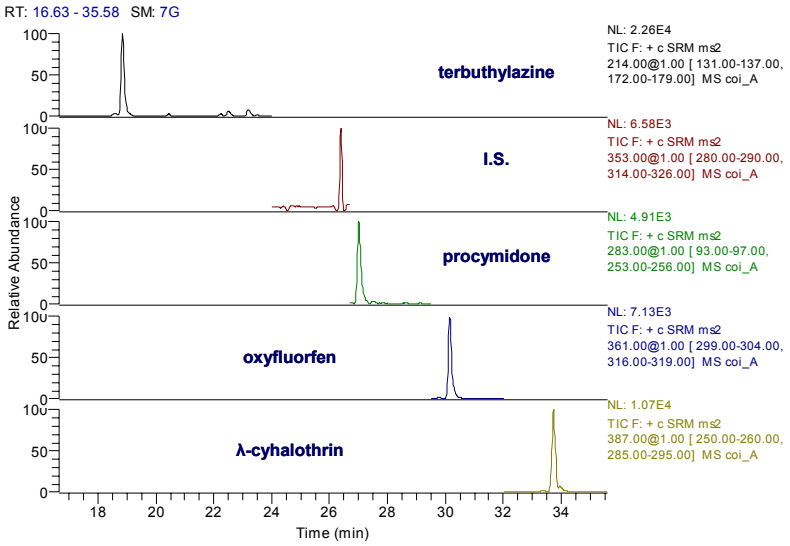
Το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου, οριζόμενο ως το χαμηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης που μπορεί να προσδιορισθεί με ικανοποιητική ακρίβεια [2], είναι βάσει των στοιχείων του Πίνακα 2 το επίπεδο των 10 μg/kg. Επιπλέον επιβεβαιώθηκε για κάθε δραστική ουσία ότι στο επίπεδο αυτό η κορυφή που προκύπτει από την ολοκλήρωση κάθε χαρακτηριστικού παράγωγου ιόντος, ακόμα και του λιγότερο άφθονου στο MS/MS φάσμα, έχει S/N > 3, ώστε να είναι δυνατή η αξιόπιστη ταυτοποίηση της ουσίας, σύμφωνα και με όσα αναφέρονται στην επόμενη παράγραφο.

Ταυτοποίηση

Για την ταυτοποίηση της προς προσδιορισμό ουσίας στο χρωματογράφημα άγνωστου δείγματος θα πρέπει [1]:

- ο σχετικός χρόνος κατακράτησης της χρωματογραφικής κορυφής ως προς το χρόνο κατακράτησης του I.S. να είναι ίσος με τον αντίστοιχο σχετικό χρόνο κατακράτησης του προτύπου με ανοχή ± 0,5 %.
- τα χαρακτηριστικά θραύσματα του αντίστοιχου προτύπου αναφοράς (Πίνακας 1) να παρατηρούνται στο MS/MS φάσμα της άγνωστης κορυφής με την ίδια σχετική ένταση εντός συγκεκριμένων ορίων ανοχής:

| Σχετική ένταση θραύσματος (% ως προς το ιόν με τη μέγιστη αφθονία) | Μέγιστη ανεκτή ανοχή (σχετική) |
|---|---|
| > 50 % | ± 20 % |
| > 20 % έως 50 % | ± 25 % |
| > 10 % έως 20 % | ± 30 % |
| < = 10 % | ± 50 % |




Σχήμα 4. Χρωματογράφημα GC/MS/MS δείγματος ελαιολάδου εμβολιασμένου σε επίπεδο συγκέντρωσης 60 – 100 mg/kg.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η προτεινόμενη GC/MS/MS μέθοδος για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων των terbuthylazine, procymidone oxyfluorfen και λ-cyhalothrin σε ελαιόλαδο διαθέτει αποδεκτή ακρίβεια με βάση τα κριτήρια που έχουν θεσπισθεί στα πλαίσια της Ε.Ε. για τις αναλύσεις υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών στα τρόφιμα (η μέση ανάκτηση κυμάνθηκε από 85 έως 110 %, και οι τιμές της % $RSD_R$ ήταν μικρότερες από 13 %). Ταυτόχρονα επιτρέπει την αξιόπιστη επιβεβαίωση της ταυτότητας των προς προσδιορισμό ουσιών ακόμη και στο επίπεδο των 10 μg/kg (LOQ), καθώς ικανοποιεί το κριτήριο των ελάχιστων «βαθμών ταυτοποίησης» (λαμβάνει χώρα παρακολούθηση 3 διαγνωστικών ιόντων - εκτός του μητρικού ιόντος, 2 τουλάχιστον παράγωγων ιόντων).

Από όσα εκτέθηκαν καθίσταται εμφανές ότι η επιλογή των διαγνωστικών ιόντων και η αριστοποίηση των παραμέτρων του ανιχνευτή αποτελεί ένα κρίσιμο στάδιο στην ανάπτυξη μίας MS/MS μεθόδου, καθοριστικό για την εκλεκτικότητα και την ευαισθησία της μεθόδου. Επιπλέον θα πρέπει να συνεκτιμηθεί ότι η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα για κάθε αναλύτη ξεχωριστά, γεγονός που την καθιστά σχετικά χρονοβόρα. Αντίθετα στις

αεριοχρωματογραφικές μεθόδους προσδιορισμού υπολειμμάτων κατά τις οποίες χρησιμοποιούνται πιο «συμβατικοί», λιγότερο εκλεκτικοί ανιχνευτές όπως FPD, NPD, ECD, το στάδιο της επεξεργασίας / καθαρισμού (cleanup) του δείγματος είναι το πλέον επίπονο κατά την ανάπτυξη της μεθόδου.

Επιπροσθέτως, διαπιστώθηκε ότι είναι απαραίτητο να εκτιμηθεί στο στάδιο ανάπτυξης της μεθόδου, με εφαρμογή της κατάλληλης δοκιμασίας, η επίδραση του μητρικού υλικού στο μέγεθος του παρεχόμενου από τον αναλύτη σήματος. Από τα πειραματικά δεδομένα προέκυψε επιπλέον ότι το φαινόμενο της επίδρασης μήτρας εξαρτάται όχι μόνο από τη σύσταση του μητρικού υλικού, αλλά και από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του αναλύτη.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ


[1] Commission Decision of 12 August 2002 (2002/657/EC) implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.

[2] Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis. Document No SANCO/10232/2006. 24/March/2006.

[3] ISO 5725-1. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions.