«Ευέλικτο πεδίο διαπίστευσης : επικύρωση πολυ-δύναμης μεθόδου υγρής χρωματογραφίας-δίδυμης φασματομετρίας μαζών για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών σε τρόφιμα»

Ελένη Μποτίτση, Σπύρος Αντωνίου, Δέσποινα Τσίπη

Γενικό Χημείο του Κράτους,
Εργαστήριο Υπολειμμάτων Γεωργικών Φαρμάκων
Αθήνα, 115 21, Ελλάδα
e-mail: gxk-pest @ ath.forthnet.gr

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία, παρουσιάζεται η ανάπτυξη και επικύρωση μιας πολυ-υπολειμματικής μεθόδου για τον προσδιορισμό διαφόρων κατηγοριών φυτοπροστατευτικών ουσιών και των μεταβολιτών τους (πλήθος ουσιών : 100) σε διαφορετικά είδη τροφίμων-υποστρωμάτων, στηριζόμενη στην τεχνική της υγρής χρωματογραφίας – δίδυμης φασματομετρίας μαζών (LC-MS/MS) στο εργαστήριο μας που έχει διαπίστευση "ευέλικτου πεδίου" από τον UKAS κατά ISO/IEC 17025. Ο σχεδιασμός της ανάπτυξης και επικύρωσης στηρίζεται στις καταγεγραμμένες τυποποιημένες διαδικασίες λειτουργίας ευέλικτου πεδίου. Ειδικότερα, το εργαστήριο έχει καταγράψει σε δική του τυποποιημένη διαδικασία λειτουργίας (SOP) την πορεία ανάπτυξης και εφαρμογής μεθόδου "ευέλικτου πεδίου", όπου τεκμηριώνονται τα στάδια ανάπτυξης, επικύρωσης, ελέγχου ποιότητας και εκτίμησης της αβεβαιότητας της πολυδύναμης πολυ-υπολειμματικής μεθόδου, σύμφωνα με τις σχετικές οδηγίες της Ε.Ε. για την επικύρωση και τον έλεγχο ποιότητας στην ανάλυση των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές (SANCO 3131/2007). Η εφαρμογή μεθόδου"ευέλικτου πεδίου" συνέβαλε στην επικύρωση 1300 περίπου συνδυασμών φυτοπροστατευτικής ουσίας-υποστρώματος με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας – δίδυμης φασματομετρίας μαζών (LC-MS/MS) αυξάνοντας δραστικά την δυναμικότητα και παραγωγικότητα του εργαστηρίου.

Λέξεις-κλειδιά : ευέλικτο πεδίο, πολυ-υπολειμματική μέθοδος, LC-MS/MS

Abstract

EU in order to protect public health from the use of pesticides in food production recently adopted Regulation -396/2005 with continuous changes (148/2008, 839/2008) for the maximum permissible pesticide residues in food, the majority of which ranges over the concentration range 0,01-1 mg / kg. Multiple and different chemical groups of pesticides have been approved for use in agricultural practice (Directive 91/414/EE) as triazoles, strobilourines, carbamates, pyrethrins, organophosphates, sulfonylureas, triazines and others. For the control of residues of these categories of plant protection substances in different types of food, large scale multi-residue methods are needed now to be developed and validated in combination with modern instrumental analysis techniques such as - gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometry (tandem mass spectrometry, GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS/MS). An important role for laboratories involved in the official control of pesticide residues in food substances, has the development, validation and application of multi-residual methods accredited to 'flexible areas, according to ISO / IEC 17025. This work shows the development and validation of a multi-residue method for identifying different types of plant substances and their metabolites (substances number: 100) in different types of food matricies, based on the technique of liquid chromatography –tandem mass spectrometry (LC -MS/MS) in our laboratory that has accreditation in "flexible scope" by UKAS ISO / IEC 17025. The design of the development and validation is based on recorded SOPs flexible scope. In our laboratory, the standard operating procedure (SOP) for the development and implementation of a method of "flexible scope" has been recorded; the stages for development, validation, quality control and assessment of the uncertainties of a

multidimensional multi-residue method in accordance with the relevant EU directives for validation and quality control in the analysis of pesticide residues in food and feed (SANCO 3131/2007) have been described. The "flexible scope" accreditation helped to validate the 1300 combinations of plant protection substance-substrate using the technique of liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) increasing the capacity and productivity of the laboratory.

Keywords: flexible scope, multi-residue method, LC-MS/MS

1. Εισαγωγή

Η ΕΕ με στόχο την προστασία της δημόσιας υγείας από την χρήση των φυτοπροστατευτικών ουσιών στην παραγωγή τροφίμων θέσπισε πρόσφατα τον κανονισμό – 396/2005 με συνεχείς τροποποιήσεις (148/2008, 839/2008), για τα ανώτερα επιτρεπόμενα όρια 470 περίπου καταλοίπων γεωργικών φαρμάκων σε 400 περίπου τρόφιμα, φυτικής ή ζωϊκής προέλευσης, η πλειοψηφία των οποίων κυμαίνεται στην περιοχή συγκεντρώσεων 0,01-1 mg/kg[1]. Πολλαπλές και χημικά διαφορετικές ομάδες φυτοφαρμάκων έχουν εγκριθεί για χρήση στην γεωργική πρακτική (Οδηγία 91/414/ΕΕ) όπως τριαζόλες, στρομπιλουρίνες, καρβαμιδικά, πυρεθρίνες, οργανοφωσφορικά, σουλφονυλουρίες, τριαζίνες και άλλα. Για τον έλεγχο καταλοίπων των ανωτέρω κατηγοριών φυτοπροστατευτικών ουσιών σε διαφορετικά είδη τροφίμων είναι αναγκαία πλέον η ανάπτυξη και επικύρωση πολυδύναμων πολυ-υπολειμματικών μεθόδων (large scale multi-residue methods) σε συνδυασμό με σύγχρονες ενόργανες τεχνικές ανάλυσης όπως – αέρια και υγρή χρωματογραφία με δίδυμη φασματομετρία μαζών (tandem mass spectrometry, GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS/MS). Σημαντικό ρόλο έχει η δυνατότητα ανάπτυξης, επικύρωσης και εφαρμογής των πολυ-υπολειμματικών μεθόδων στα διαπιστευμένα σε «ευέλικτο πεδίο», κατά ISO/IEC 17025, εργαστήρια επισήμου ελέγχου υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών στα τρόφιμα. Ευέλικτο πεδίο διαπίστευσης είναι το πεδίο που επιτρέπει στο εργαστήριο να αναλαμβάνει αναλύσεις που δεν περιλαμβάνονται στο επίσημο πεδίο του να τις διεκπεραιώνει και να τις αναφέρει ως διαπιστευμένες. Ευέλικτο πεδίο διαπίστευσης μπορεί να επιτευχθεί μετά από μια περίπου πενταετία από την αρχική διαπίστευση του εργαστηρίου κατά ISO/IEC 17025[2]. Το εργαστήριο θα πρέπει να έχει αποδεδειγμένη εμπειρία στην ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων in-house και ο φορέας διαπίστευσης, υψηλή στάθμη εμπιστοσύνης προς το προσωπικό του εργαστηρίου. Οι κατηγορίες ευέλικτου πεδίου περιλαμβάνουν τις εξής περιπτώσεις: α) ευελιξία στα προϊόντα που αναλύονται με χρήση ήδη διαπιστευμένων μεθόδων β) ευελιξία στις παραμέτρους που αναλύονται με χρήση ήδη διαπιστευμένων μεθόδων γ) ευελιξία στις αναλυτικές μεθόδους με χρήση της ίδιας τεχνικής ανάλυσης. Οι απαιτήσεις του φορέα διαπίστευσης από το εργαστήριο είναι οι εξής: 1). Να διαθέτει εκτεταμένο σύστημα διαχείρισης αλλαγών(management) 2). Καθιέρωση στρατηγικής επικύρωσης αλλαγών-κριτήρια αποδοχής (validation-acceptance) 3). Καθιέρωση πρωτοκόλλου εργασίας 4). Καθιέρωση αρμοδιοτήτων (1 άτομο υπεύθυνο για την επικύρωση) 5). Καταγραφή και αρχειοθέτηση κάθε αλλαγής 6). Ενημέρωση του φορέα διαπίστευσης ανά τακτά χρονικά διαστήματα Το εργαστήριο θα πρέπει να συντάξει τυποποιημένες διαδικασίες λειτουργίας τις οποίες θα πρέπει να τηρεί ώστε να μπορεί να λειτουργεί σε ευέλικτο πεδίο.

Στην παρούσα εργασία, παρουσιάζεται η ανάπτυξη και επικύρωση μιας πολυ-υπολειμματικής μεθόδου για τον προσδιορισμό διαφόρων κατηγοριών φυτοπροστατευτικών ουσιών και των μεταβολιτών τους (πλήθος ουσιών : 100) σε διαφορετικά είδη τροφίμων-υποστρωμάτων, στηριζόμενη στην τεχνική της υγρής χρωματογραφίας – δίδυμης φασματομετρίας μαζών (LC-MS/MS) στο εργαστήριο μας που έχει διαπίστευση "ευέλικτου πεδίου" από τον UKAS κατά ISO/IEC 17025. Ο σχεδιασμός της ανάπτυξης και επικύρωσης στηρίζεται στις καταγεγραμμένες τυποποιημένες διαδικασίες λειτουργίας ευέλικτου πεδίου. Ειδικότερα, το εργαστήριο έχει καταγράψει σε δική του τυποποιημένη διαδικασία λειτουργίας (SOP) την πορεία ανάπτυξης και εφαρμογής μεθόδου "ευέλικτου πεδίου", όπου τεκμηριώνονται τα στάδια ανάπτυξης, επικύρωσης, ελέγχου ποιότητας και εκτίμησης της αβεβαιότητας της πολυδύναμης

πολυ-υπολειμματικής μεθόδου, σύμφωνα με τις σχετικές οδηγίες της Ε.Ε. για την επικύρωση και τον έλεγχο ποιότητας στην ανάλυση των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές (SANCO 3131/2007). Η εφαρμογή μεθόδου"ευέλικτου πεδίου" συνέβαλε στην επικύρωση 1300 περίπου συνδυασμών φυτοπροστατευτικής ουσίας-υποστρώματος με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας – δίδυμης φασματομετρίας μαζών (LC-MS/MS) αυξάνοντας δραστικά την δυναμικότητα και παραγωγικότητα του εργαστηρίου.

2. Μεθοδολογία

2.1 Υλικά

Χρησιμοποιήθηκαν πιστοποιημένες πρότυπες ουσίες φυτοφαρμάκων του οίκου Dr Ehrenstorfer (Ausburg, Γερμανία). Μονήρη διαλύματα παρακαταθήκης προτύπων ουσιών συγκέντρωσης (> 100-400 μg/ml) παρασκευάσθηκαν σε pestiscan grade μεθανόλη (LAB-SCAN, Ιρλανδία) και φυλάσσονται στους -20°C . Ακετονιτρίλιο LC-MS grade και μυρμηγκικό αμμώνιο LC-MS grade additive, του οίκου Merck (Darmstadt, Γερμανία) και μυρμηγκικό οξύ του οίκου Sigma-Aldrich (Steinheim, Γερμανία) χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή κινητών φάσεων. Οι χρησιμοποιούμενοι διαλύτες, ακετόνη, διχλωρομεθάνιο και πετρελαϊκός αιθέρας είναι καθαρότητας pesticide grade από τον οίκο LAB-SCAN ενώ το άνυδρο θειϊκό νάτριο pesticide grade από τον οίκο Sigma-Aldrich. Οι στήλες για την εκχύλιση στερεάς φάσης είναι Oasis HLB 200 mg/6 ml (Waters Corp., Η.Π.Α.).

2.2 Προετοιμασία δείγματος

(α) Ποσότητα 10-g ομογενοποιημένου δείγματος φρούτου – λαχανικού εκχυλίζεται με 10 ml ακετόνης, 10 ml διχλωρομεθάνιο και 10 ml πετρελαϊκό αιθέρα παρουσία άνυδρου θειϊκού νατρίου [3] σε λουτρό υπερήχων για 30 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, παραλαβή του υπερκειμένου, συμπύκνωση και παραλαβή του υπολείμματος με 5 ml μεθανόλη. Τα εκχυλίσματα αραιώνονται με νερό, διηθούνται με φίλτρα 0.22 μm (Millex) και αναλύονται με LC-MS/MS [7].

(β) Η μέθοδος "QuEChERS" εφαρμόστηκε κυρίως σε προϊόντα δημητριακών (9)

(γ) Εκχύλιση στερεάς φάσης εφαρμόζεται στην περίπτωση των κρασιών σε στήλες Oasis HLB 200mg/6 ml .Η προκατεργασία των στηλών γίνεται με 6 ml διχλωρομεθάνιο, 6 ml μεθανόλη και 6 ml νερό. Τα διαλύματα των κρασιών διέρχονται με ταχύτητα ροής 6 ml /min. Οι στήλες εκλούονται με 5 ml μεθανόλη και 5 ml διχλωρομεθάνιο. Τα εκλούσματα συμπυκνώνονται και ακολουθεί παραλαβή του υπολείμματος με 5 ml μεθανόλη. Τα εκχυλίσματα αραιώνονται με νερό, διηθούνται και αναλύονται με LC-MS/MS [7].

2.3 LC-MS/MS ανάλυση

Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας αποτελείται από αντλία Surveyor LC και αυτόματο δειγματολήπτη Surveyor (ThermoElectron, ΗΠΑ). Ο διαχωρισμός του πλήθους των χημικών ενώσεων που μελετώνται γίνεται σε στήλη υγρής χρωματογραφίας Xterra® MS C18 column (2.1 mm x 150 mm, 3.5μm) με σύστημα βαθμιδωτής έκλουσης δύο διαλυτών - ήτοι κινητή φάση A (5mM μυρμηγκικό αμμώνιο - 0.1% μυρμηγκικό οξύ σε νερό) και κινητή φάση B (5mM μυρμηγκικό αμμώνιο - 0.1% μυρμηγκικό οξύ σε ακετονιτρίλιο) - με ταχύτητα ροής 0.2 ml/min και σε χρονικό διάστημα τριάντα λεπτών.

Το σύστημα δίδυμης φασματομετρίας μαζών αποτελείται από σύστημα τριών διαδοχικών τετραπολικών αναλυτών μάζας, TSQ Quantum Ultra, και πηγή ιονισμού με ηλεκτροδιάχυση, Ion Max API Source, (ThermoElectron, ΗΠΑ). Το λογισμικό του οργάνου είναι το Xcalibur 1.4 .

2.4 Επικύρωση μεθόδου

Η ακρίβεια της μεθόδου μελετήθηκε με δοκιμές ανάκτησης σε δείγματα χωρίς κατάλοιπα, εμβολιασμένα με πρότυπο διάλυμα φυτοφαρμάκων (100 ενώσεις) σε συγκεντρώσεις , 0.010 και 0.050 mg/ kg ή 0.010 and 0.050 mg/ L στην περίπτωση των κρασιών. Πραγματοποιήθηκαν έξι επαναλήψεις σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης και σε κάθε διαφορετικό υπόστρωμα, σύμφωνα με τις απαιτήσεις της SANCO 3131/2007 [6]

3. Αποτελέσματα – συζήτηση

3.1 Βελτιστοποίηση παραμέτρων-συνθηκών ESI -MS/ MS

Η LC-MS/MS ανάλυση πραγματοποιείται μέσω της παρακολούθησης συγκεκριμένων ιόντων για κάθε ουσία η επιλογή των οποίων γίνεται πειραματικά με απευθείας έγχυση προτύπων διαλυμάτων στην πηγή του φασματογράφου μάζας χωρίς προηγούμενη χρωματογραφική ανάλυση. Το πρωτονιωμένο ή αποπρωτονιωμένο μοριακό ιόν $[M+H]^+$ /$[M-H]^-$ των ενώσεων επιλέγεται συνήθως σαν πρόδρομο ιόν, θραυσματοποιείται σε διάφορα ιόντα, και η ανίχνευση γίνεται με παρακολούθηση επιλεγμένων αντιδράσεων μετάπτωσης του μητρικού ιόντος στα πιο ισχυρά και χαρακτηριστικά της δομής της ουσίας (MRM) .

Οι φασματομετρικές παράμετροι όπως ενέργεια θραυσματοποίησης, πίεσης και άλλες, βελτιστοποιήθηκαν για κάθε ουσία με εφαρμογή της αυτόματης βαθμονόμησης του συστήματος με πειράματα έγχυσης μονήρων διαλυμάτων των πρότυπων ενώσεων και δίνονται στον Πίνακα 1[7] . Κριτήρια ταυτοποίησης των «ενώσεων –στόχων» είναι ο χρόνος κατακράτησης και ο λόγος των αφθονιών των επιλεγμένων αντιδράσεων [6]. Στο Σχήμα 1(α) παρουσιάζεται το LC-MS/MS χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος αλεύρου με πρότυπο διάλυμα φυτοφαρμάκων σε επίπεδο συγκέντρωσης 50μg/kg και στο Σχήμα 1(β) το διάγραμμα κατανομής του πλήθους των φυτοφαρμάκων σε σχέση με το χρόνο έκλουσης κατά την LC-MS/MS χρωματογραφική ανάλυση

3.2 Επικύρωση μεθόδου

Η ακρίβεια της μεθόδου μελετήθηκε με πειράματα ανάκτησης στα επίπεδα συγκεντρώσεων 0.010-0.050 mg/kg δείγματος. Η ορθότητα (τιμές ανάκτησης στα δύο επίπεδα συγκέντρωσης μεταξύ 70 και 120%) και η ακρίβεια της μεθόδου (σχετικές τυπικές αποκλίσεις σε συνθήκες ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας μικρότερες του 20%) κρίνονται ικανοποιητικές σύμφωνα με τα κριτήρια επίδοσης της SANCO 3131/2007 [6], για τους 1300 περίπου συνδυασμούς φυτοπροστατευτικής ουσίας-υποστρώματος που μελετήθηκαν. Βάσει των δοκιμών αυτών, όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου ορίστηκε η συγκέντρωση των 0.010 mg/kg για τους περισσότερους από τους μελετηθέντες συνδυασμούς ενώ τα όρια ανίχνευσης κυμαίνονται σε χαμηλότερα επίπεδα συγκεντρώσεων. Στην περίπτωση των παιδικών τροφών – μιγμάτων ομογενοποιημένων φρούτων και λαχανικών – το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου κυμάνθηκε στη συγκέντρωση των 0.005 mg/kg για τους περισσότερους από τους συνδυασμούς τροφίμων/φυτοφαρμάκων που εξετάσθηκαν, σύμφωνα με τις απαιτήσεις της οδηγίας ΕΕ 1999/50 [8].

Το φαινόμενο της επίδραση υποστρώματος που αποτελεί ένα από τα εγγενή μειονεκτήματα της τεχνικής, μελετήθηκε κατά την ανάπτυξη και την εφαρμογή της μεθόδου σε ποικίλα υποστρώματα, επιτυγχάνοντας ικανοποιητική αντοχή και ανθεκτικότητα .

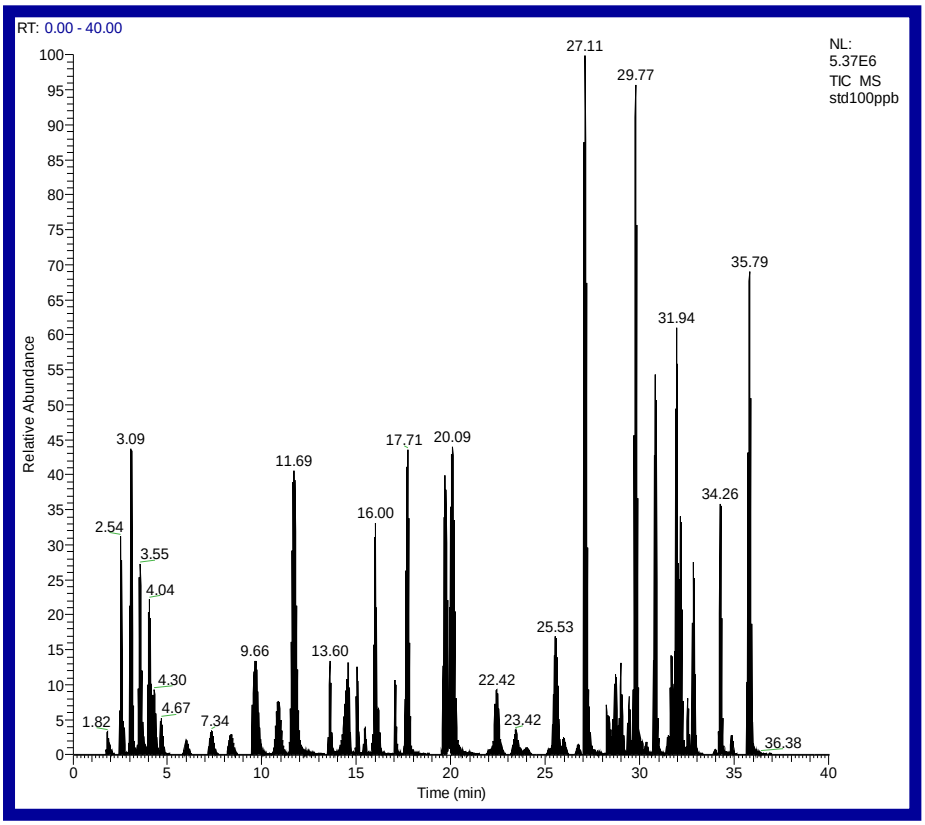
4. Συμπεράσματα

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε είναι αρκετά ακριβής και ευαίσθητη για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων σε διάφορα είδη τροφίμων . Η γρήγορη αυτή μέθοδος καθώς δεν απαιτεί ειδικά βήματα καθαρισμού έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στις αναλύσεις των δειγμάτων του εργαστηρίου.

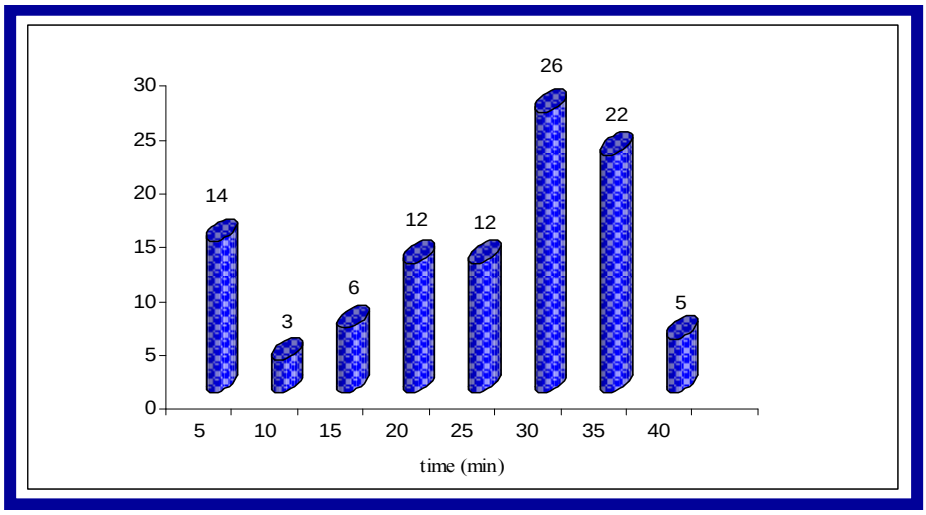
Πίνακας 1. ESI-MS/MS βέλτιστες πειραματικές συνθήκες.

Spray voltage	4000 V
Shealth gas pressure (N2)	40 (A.U)[a]
Auxiliary gas pressure (N2)	10 (A.U)[a]
Ion transfer capillary temperature	350 °C
Collision gas pressure (Ar)	1.0 mTorr
Q1 : peak width	0.2 Da (FWHM)[b]
Q3 : peak width	0.7 Da (FWHM)[b]
Dwell time	10-50 msec

[a] (A.U) : Arbitary Units, [b] FWHM : Full width half maximum



Σχήμα 1(α) LC-MS/MS χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος αλεύρου με πρότυπο διάλυμα φυτοφαρμάκων σε επίπεδο συγκέντρωσης 50μg/kg



Σχήμα 1(β). Διάγραμμα κατανομής του πλήθους των φυτοφαρμάκων σε σχέση με το χρόνο έκλουσης κατά την LC-MS/MS χρωματογραφική ανάλυση.

5.Βιβλιογραφία

(1) http://www.europa.eu.int/comm/food/plant/protection/pesticides/index_en.htm

(2) UKAS Guidance on the Implementation and Management of Flexible Scopes of Accreditation within Laboratories (Lab 39)

(3) M. Hiemstra, A. de Kok. J of Chrom. A, 1154 (2007) 3-25.

(4) B. Kmellαr, P. Fodor, L. Pareja, C. Ferrer, M.A. Martνnez-Uroz, A. Valverde, A.R. Fernandez-Alba. J of Chrom. A, 1215 (2008) 37–50.

(5) Imma Ferrer, E. Michael Thurman J of Chrom. A, 1175 (2007) 24–37.

(6) "Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed" Document No SANCO 2007/3131.

(7) Helen Botitsi, Anastasios Economou and Despina Tsipi. Anal BioAnal Chem (2007) 389 : 1685-1695.

(8) Commission Directive 1999/50/EC of 25 May 1999 Amending Directive 91/321/EEC on infant formulae and follow-on formulae. *Official Journal of the European Communities* L 139: 29-31.

(9) Payá P., Anastassiades M., Mack M., Sigalova I., Tasdelen B., Oliva J., Barba A. Anal Bioanal Chem (2007) 389:1697–1714.