

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΙΑΣ ΠΟΛΥΥΠΟΛΕΥΜΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ GC- MS/MS ΚΑΙ LC-MS/MS ΣΕ ΕΛΙΕΣ ΚΑΙ ΛΑΔΙ

Αναγνωστόπουλος Χ.Ι., Μηλιάδης Γ., Φωτεινοπούλου Ε., Λιαπής Κ.

Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Εργαστήριο Υπολειμμάτων Γεωργικών Φαρμάκων Εκλαλής 7, Κηφισιά, 14561.

Περίληψη

Η βασικότερη καλλιέργεια στην περιοχή της Μεσογείου από την αρχαιότητα έως σήμερα είναι η ελιά. Η Ευρωπαϊκή Ένωση είναι ο μεγαλύτερος καταναλωτής ελαιόλαδου με 1,3 εκατομμύρια τόνους ετήσιως. Σύμφωνα με στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων στην Ελλάδα το 2009 καλλιεργήθηκαν πάνω από 150 εκατομμύρια δέντρα για παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς και ελαιολάδου. Η σημαντικότητα της καλλιέργειας στην Ευρώπη αλλά και παγκόσμια καθιστά σημαντική την εντατική χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Στην Ελλάδα μόνο, υπάρχουν περίπου 180 εγκεκριμένα σκευάσματα για την καλλιέργεια τις ελιάς, με δραστικές ουσίες διαφορετικών χημικών ομάδων.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται μια πολυυπολειμματική μέθοδος με σύντομο στάδιο εκχύλισης με ακετονιτρίλιο και προσδιορισμό με την τεχνική της δίδυμης φασματομετρίας μάζας σε συνδυασμό τόσο με αέρια όσο και με υγρή χρωματογραφία (LC-MS/MS και GC-MS/MS), για τον προσδιορισμό διαφόρων κατηγοριών φυτοπροστατευτικών ουσιών και των μεταβολιτών τους σε ελιά και λάδι. Η μέθοδος αναπτύχθηκε στο εργαστήριο και επικυρώθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της Ε.Ε. για τις μεθόδους υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων (SANCO Doc. No 10684/2009). Από τα στοιχεία επικύρωσης προκύπτει ότι η μέθοδος για τις περισσότερες φυτοπροστατευτικές ουσίες παρουσιάζει αποδεκτή γραμμικότητα με $r \geq 0,99$, αποδεκτή ορθότητα, με ποσοστά ανάκτησης 70-120% και πιστότητα με $RSD \leq 20\%$. Το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου βρέθηκε 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Η μέθοδος είναι σύντομη, απλή, με μικρή κατανάλωση αντιδραστηρίων, χαρακτηρίζεται από αξιοπιστία, ευαισθησία και συνεπώς κρίνεται κατάλληλη για αναλύσεις ρουτίνας υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε ελιές και λάδι.

Λέξεις-Κλειδιά: GC-MS/MS, LC-MS/MS, ελιές, λάδι, επικύρωση

Abstract

The most important cultivation in the Mediteranian region since ancient times to today is the olive tree. The European Union is the biggest consumer of olive oil by 1.3 million tones annually. According to Ministry of Rural Development and Food in Greece in 2009 over 150 million trees were cultivated to produce table olives and olive oil. The importance of the cultivation in Europe and Wordwide makes the intensive use of agrochemical essential. In Greece alone, there are about 180 formulations approved for the cultivation of olives, with active substances of different chemical groups.

In the present study a gas and liquid chromatography -tandem mass spectrometry multiresidue method with a short sample preparation step, based on acetonitrile extraction is developed in house. The method was validated according to the European Union guidleines (SANCO Doc. No 10684/2009) in olives and olive oil with a large scope that includes pesticides from different chemical classes. Good sensitivity and selectivity of the method

were obtained with limits of quantification at 10 µg/kg. Most of the pesticides gave recoveries in the range of 70– 120 %, with relative standard deviations less than 20%, for both validation levels. Excellent linearity was achieved with $r \geq 0,99$.

The method is quick, simple, with low consumption of reagents, is characterized by reliability, sensitivity and therefore is suitable for routine analysis of pesticide residues in olives and olive oil.

Keywords: GC-MS/MS, LC-MS/MS, olive, olive oil, validation

1. Εισαγωγή

Ο προσδιορισμός των φυτοφαρμάκων σε λάδι και ελιές είναι μια πολύπλοκη διαδικασία λόγω της πολυπλοκότητας του υποστρώματος, το οποίο είναι πλούσιο σε χρωστικές και σε λιπαρές ουσίες. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών σε προϊόντα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά περιλαμβάνουν συνήθως πολλά στάδια ανάλυσης και είναι χρονοβόρες. Τρία είναι τα σημαντικά στάδια των μεθόδων: εκχύλιση, καθαρισμός και χρωματογραφία. Οι περισσότερες μέθοδοι βασίζονται στην εκχύλιση μεταξύ 2 υγρών (LLE) ή στην εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) [Yagüe (2005), Rastrelli (2002), Di Muccio (1999), Esteve-Turrillas (2005), Lentza-Rizos (2001)]. Διάφορες τεχνικές καθαρισμού εφαρμόζονται, όπως η χρωματογραφία πηκτής [Ballesteros (2006), García-Sánchez (2006), Guardia-Rubio (2007)] και διασποράς στερεής φάσης υποστρώματος (MSPD) [Ferrer (2005)].

Η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας αποτελούσαν για πολλά έτη την πιο διαδεδομένη τεχνική προσδιορισμού, λόγω της φύσης των φυτοπροστατευτικών ουσιών που χρησιμοποιούνταν στην καλλιέργεια της ελιάς, όπως τα χαμηλής πολικότητας οργανοχλωριωμένα, πυρεθρίνες και οργανοφωσφορικά. Η εισαγωγή στη φυτοπροστασία τα τελευταία χρόνια νέων ουσιών, υψηλότερης πολικότητας, καθιστά την χρήση της υγρής χρωματογραφίας αναγκαία για έλεγχο των ενώσεων αυτών.

Με την κυκλοφορία στην εσωτερική και διεθνή αγορά ελαιολάδων και ελαιοκάρπου ονομασίας προέλευσης, γεωγραφικών ενδείξεων και με σήμα ποιότητας καθιστά φανερό ότι απαιτούνται εργαστηριακές αναλύσεις μέσω των οποίων επιβεβαιώνεται η πιστοποιημένη ποιότητα του προϊόντων. Προκειμένου η αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιεί το εργαστήριο να ικανοποιεί τα κριτήρια για τη σκοπούμενη χρήση της πραγματοποιείται επικύρωση της μεθόδου μέσω δοκιμών. Παράλληλα εκτιμάται η αβεβαιότητα των μετρήσεων, ως μια σημαντική απαίτηση του προτύπου ISO 17025.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη και επικύρωση μιας απλής, γρήγορης, και οικονομικής πολυπολεμιατικής μεθόδου στηριζόμενης στην τεχνική της δίδυμης φασματομετρίας μάζας σε συνδυασμό με αέρια και υγρή χρωματογραφία (LC-MS/MS και GC-MS/MS), για τον προσδιορισμό διαφόρων κατηγοριών φυτοπροστατευτικών ουσιών και των μεταβολιτών τους σε ελιά και λάδι.

2. Υλικά και Μέθοδοι

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 180 φυτοπροστατευτικές ουσίες και μεταβολίτες τους διαφόρων χημικών κατηγοριών και διαφόρων φυσικοχημικών ιδιοτήτων. Οι επιλεγθέντες αναλύτες είναι αντιπροσωπευτικοί της κατηγορίας τους, δηλαδή οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες (διαλυτότητα σε νερό, τάση ατμών, logP_{ow}) έχουν εύρος τιμών που καλύπτει το εύρος τιμών των φυσικοχημικών ιδιοτήτων όλων των ενώσεων της κατηγορίας που ανήκουν. μελετήθηκαν 26 οργανοφωσφορικά, 15

καρβαμιδικά, 13 τριαζόλες, 11 οργανοχλωριομένα, 10 πυρεθρίνες, 6 σουλφονυλουρίες, 4 φαινυλουρίες, 2 ουρίες, 4 στρομπυλουρίες, 5 νεονικοτινοειδή, 4 τριαζίνες, 3 βενζιμιδαζόλες, 3 ανιλοπυρομιδίνες, 3 ιμιδαζόλες, 3 μορφολίνες, 2 δικαρβοξυμίδια, 2 χλωροακεταμίδια, 2 δινιτροανιλίνες 2 πυραζόλες, και 65 ενώσεις διαφόρων χημικών ομάδων.

Αναλυτικά οι 180 ουσίες που μελετήθηκαν είναι: *acetamiprid, acrinathrin, alachlor, aldicarb, aldicarb sulfone, aldicarb sulfoxide, aldrin, ametryn, atrazine, azimsulfuron, azinphos ethyl, azinphos methyl, azoxystrobin, benalaxyl, benfuracarb, bensulfuron methyl, benzoxydate, bifenthrin, bitertanol, boscalid, bromacil, bromuconazole, bupirimate, buprofezin, caduzafos, carbaryl, carbendazim, carbofuran, carbofuran 3 hydroxy, carbosulfan, chlorobenzilate, chlorobromuron, chlorpyrifos ethyl, chlorpyrifos methyl, chlorsulfuron, chlorthal dimethyl, clofentezine, clothianidin, cyanazine, cyfluthrin, cyhalothrin lamda, cymoxanil, cypermethrin, cyprodinil, cyromazine, DDD op, DDD pp, DDE op, deltamethrin, demeton S methyl, demeton S methyl sulfone, demeton S methyl sulfoxide, desmetryn, diazinon, dichlofluanid, dichlorvos, dicloran, difenoconazole, dimethoate, dimethomorph, diniconazole, dinitramine, diphenylamine, disulfoton, disulfoton sulfone, disulfoton sulfoxide, dodemorph, endosulfan A, endosulfan b, endosulfan sulfate, endrin, EPN, epoxiconazole, ethion, ethofumesate, ethoprophos, etofenprox, etoxazole, famoxadone, fenamidone, fenamiphos, fenamiphos sulfone, fenarimol, fenazaquin, fenbuconazole, fenoxycarb, fenpropathrin, fenpropymorph, fenpyroximate, fensulfothion, fensulfothion oxon, fenthion, fenthion oxon, fenthion oxon sullfoxide, fenthion sulfone, fenthion sulfoxide, fluazifop, flucythrinate, flusilazole, flutriafol, fosthiazate, furathiocarb, haloxyfop ethyl ester, haloxyfop methoxyethyl ester, HCH a, HCH b, HCH -gamma (lindane), heptachlor, hexaconazole, hexythiazox, imazalil, imidacloprid, iprodione, iprovalicarb, isoproturon, kresoxyl methyl, lamda cyhalothrin, linuron, malaoxon, malathion, mepanipyrim, metalaxyl M, metamitron, methacrifos, methamidophos, methidathion, methiocarb sulfoxide, methomyl, metoxuron, monocrotophos, monolinuron, myclobutanil, nicosulfuron, oxadiazon, oxadixyl, oxamyl, paclobutazole, penconazole, pencycuron, pendimethalin, permethrin, phosalone, phoxim, pirimicarb, pirimiphos methyl, primisulfuron methyl, procloraz, profenofos, propachlor, propagite, propyconazole, propyzamide, pyrazophos, pyrimethanil, pyriproxifen, quintozene, simazine, spiroxamine, tebuconazole, tebufenozide, tebufenpyrad, temephos, terbufos, terbufos sulfone, thiabentazole, thiacloprid, thiamethoxam, thifensulfuron methyl, thiodicarb, thiophanate methyl, tolclofos methyl, tolyfluanid, triadimefon, triadimenol, triazophos, trifloxystrobin, triticonazole, vamidothion, vinclozolin, και zoaxamide.*

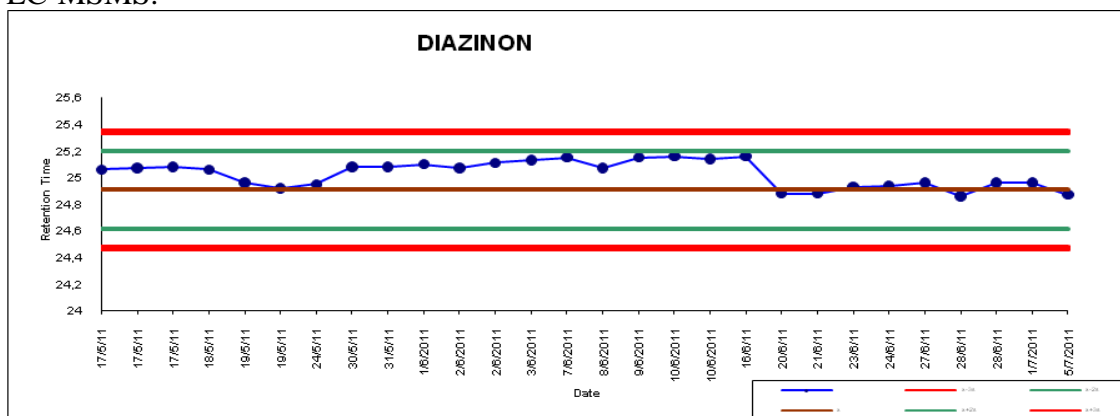
3. Πρότυπα διαλύματα για την ποσοτικοποίηση των αναλυτών

Για κάθε αναλύτη παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης (stock solutions) 1000, 500 ή 250 mg/L σε ακετονιτρίλιο, ακετόνη ή μεθανόλη αναλόγα με την διαλυτότητα του κάθε αναλύτη. Τα διαλύματα παρακαταθήκης αποθηκεύονται στους -20 °C. Από αυτά παρασκευάζεται ένα πρότυπο διάλυμα εργασίας (working solution) συγκέντρωσης 1 mg/L σε ακετονιτρίλιο. Από αυτό παρασκευάζονται διαλύματα διαφόρων συγκεντρώσεων σε εκχύλισμα μάρτυρα ελιάς ή λαδιού για τη βαθμονόμηση των αναλυτικών συσκευών. Τα διαλύματα αυτά χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των αναλυτών που ανιχνεύονται στα δείγματα.

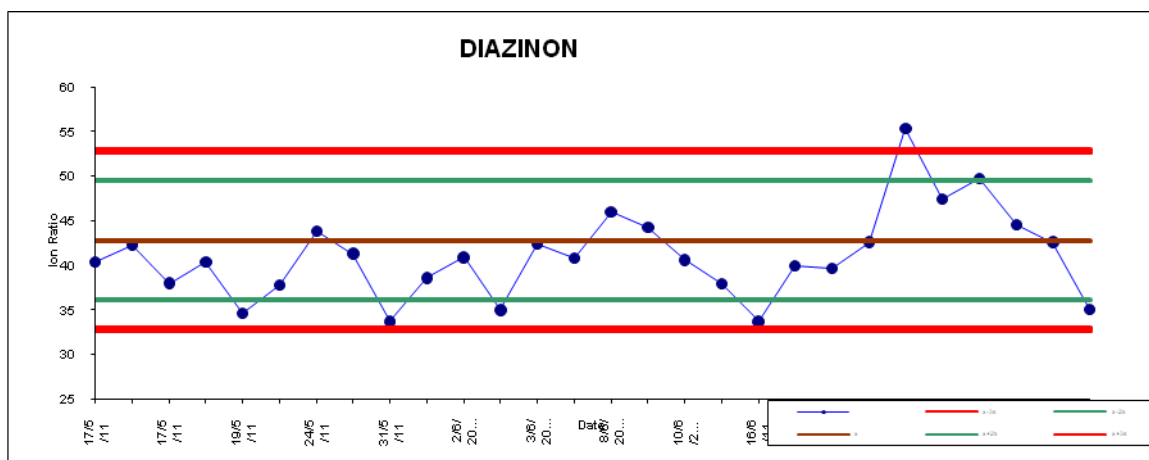
Η παρασκευή των διαλυμάτων σε εκχύλισμα ελιάς ή λαδιού γίνεται προκειμένου να αναιρεθεί η πιθανή επίδραση του υποστρώματος στη μέτρηση (matrix effect).

4. Διαλύματα Ελέγχου Καταλληλότητας (Δ.Ε.Κ.)

Τα διαλύματα Δ.Ε.Κ. χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της καταλληλότητας των αναλυτικών συσκευών. Παρασκευάζονται με διάλυση σε ακετονιτρίλιο κατάλληλα επιλεγμένων αναλυτών, έτσι ώστε η κάθε ουσία να έχει στο διάλυμα συγκέντρωση 0,01 μg/mL. Οι αναλύτες αυτοί για το GC-MS/MS είναι οι ουσίες diazinon, parathion methyl, chlorpyrifos ethyl, β-endosulfan και λ-cyhalothrin, ενώ για το LC-MS/MS οι ουσίες oxamyl, diazinon, tebuconazole και etoxazole. Οι τιμές από τις μετρήσεις των διαλυμάτων Δ.Ε.Κ. τοποθετούνται σε διαγράμματα ελέγχου. Για την δημιουργία του διαγράμματος έγιναν 15 τουλάχιστον ανεξάρτητες εγχύσεις του Δ.Ε.Κ. και από τις τιμές της μετρούμενης παραμέτρου (χρόνος κατακράτησης και αναλογία ιόντων), υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση s . Ως «όρια ελέγχου» ορίστηκαν οι τιμές $\bar{x} \pm 3s$ ενώ ως «όρια προειδοποίησης» οι τιμές $\bar{x} \pm 2s$. Στην καθημερινή εργασία με δείγματα ελέγχεται πρώτα ένα διάλυμα Δ.Ε.Κ. για να διαπιστωθεί αν η αναλυτική συσκευή λειτουργεί εντός των αποδεκτών ορίων. Στα **Σχήματα 1** και **2** φαίνονται τα διαγράμματα ελέγχου καταλληλότητας για το σύστημα LC-MS/MS.



Σχήμα 1. Διάγραμμα ελέγχου καταλληλότητας για το LC-MS/MS: Παράμετρος χρόνος κατακράτησης της ουσίας diazinon.



Σχήμα 2. Διάγραμμα ελέγχου καταλληλότητας για το LC-MS/MS: Παράμετρος αναλογία ιόντων.

5. Εκχύλιση

- Ζυγίζεται μάζα δείγματος 5g (m) σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 50 mL.
- Προστίθενται 10 mL (V_1) ακετονιτρίλιο, ισχυρή ανάδευση με το χέρι επί 1min.
- Κατάψυξη στους -20°C για > 12 ώρες. Εκεί καθιζάνουν ορισμένα συνεκχυλισμάτα, τα οποία έχουν μικρή διαλυτότητα στο ακετονιτρίλιο. Έτσι καθιζάνει η μεγαλύτερη ποσότητα των λιπαρών ουσιών.
- Μεταφέρονται εν ψυχρώ 6 mL (V_2) από το υπερκείμενο υγρό σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 15 mL, που περιέχει 900 mg of MgSO_4 , 150 mg PSA, και 12,5mg graphitized carbon black (GCB).
- Ανακινείται ισχυρά με το χέρι για 1min και φυγοκεντρείται στις 4000 στροφές/min για 5 min.
- Ποσότητα από το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται σε φιαλίδιο αυτόματου δειγματολήπτη, σφραγίζεται με πώμα από PTFE και εγχύεται διαδοχικά στο LC-MS/MS και στο GC-MS/MS.

6. Οργανολογία

6.1. GC-MS/MS

Αεριοχρωματογράφος - φασματογράφος μάζας τριπλού τετραπόλου, με ιονισμό EI^+ , με εγχυτή PTV, με πρόγραμμα: 90°C (0,75 min) άνοδο στους 280°C με $200^{\circ}\text{C}/\text{min}$ και κάθοδο στους 90°C με $200^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Στήλη VF-5 MS (30m \times 0.25mm ID \times 0.25 μm film thickness) με προστήλη deactivated cyano-phenyl-methyl (5m \times 0.53mm ID), ροή He 1,3 ml/min. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα διαχωρισμού από 70°C (2min), στους 180°C με $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$, στους 230°C με $1,8^{\circ}\text{C}/\text{min}$, στους 280°C με $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (30 min). Παράμετροι MS/MS: θερμοκρασία πηγής: 250°C , θερμοκρασία διασυνδετή 280°C , solvent delay: 6 min. Εγχύονται 5 μL δείγματος ως εξής:

0 min	Split on, 60:1
0,75 min	Split off
3 min	Split on, 50:1
6 min	Split 10:1

6.2. LC-MS/MS

Υγροχρωματογράφος με στήλη Eclipse XDB C-18, 15cm, 2,1 mm, 3,5 μm . Θερμοκρασία στήλης 30°C και ροή 0,3 mL/min. Διαλύτης έκλουσης A: 5mM HCCONH_4 , 0,1% HCOOH και 0,02% CH_3CN σε νερό. Διαλύτης έκλουσης B: 5mM HCCONH_4 και 0,1% HCOOH σε μεθανόλη. Το πρόγραμμα έκλουσης είναι:

Χρόνος (min)	%A	%B
0,00	80,0	20,0
2,00	80,0	20,0
12,00	40,0	60,0
30,00	0	100,0

35,00	0	100,0
35,10	80,00	20,00

Εγχύονται 5 µL δείγματος με την τεχνική partial loop. Η πηγή ηλεκτροδιάχυσης επιλέγεται σε ESI⁺, ESI⁻ ή APCI ανάλογα με τον αναλύτη. Πηγή στους 250 °C, αέριο ξήρανσης 11L/min, εκνέφωσης 45 psi, capillary 3000V.

7. Ταυτοποίηση

Η ταυτοποίηση στον ανιχνευτή MS/MS περιλαμβάνει τρεις απαιτήσεις: α) στο χρωματογράφημα να εμφανιστεί κορυφή σε χρόνο πλησίον ($\pm 1,5\%$ για GC και 3% για LC) των χρόνων κατακράτησης των αναλυτών της προς ταυτοποίηση ένωσης με τον αντίστοιχο χρόνο της πρότυπης ουσίας, β) να εμφανιστούν κορυφές και για τις 2 κύριες μεταπτώσεις ιόντων, και γ) ο λόγος ιόντων των 2 μεταπτώσεων να πλήρη τις απαιτήσεις του παρακάτω πίνακα [European Commission (2009)]:

Σχετική ένταση ιόντος	GC-MS/MS, LC-MS/MS (απόκλιση %)
> 50 %	± 20 %
> 20 % ως 50 %	± 25 %
> 10 % ως 20 %	± 30 %
$\leq 10\%$	± 50 %

8. Προσδιορισμός

Ο προσδιορισμός γίνεται με 3 τρόπους: (α) απ'ευθείας σύγκριση, (β) τεχνική «εγκλωβισμού», (γ) χρήση καμπύλης αναφοράς.

Απ' ευθείας σύγκριση της επιφάνειας της κορυφής του δείγματος με ένα μόνο πρότυπο γίνεται όταν οι κορυφές δείγματος και προτύπου δε διαφέρουν περισσότερο από 50% για περιπτώσεις μη υπερβάσεων ή περισσότερο από 10% για περιπτώσεις υπερβάσεων [European Commission (2009)].

Η τεχνική «εγκλωβισμού» γίνεται με χρήση 2 προτύπων διαλυμάτων, ενώ η συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα πρέπει να βρίσκεται ανάμεσα στις συγκεντρώσεις του στα πρότυπα και η σειρά έγχυσης τέτοια ώστε τα 2 πρότυπα να είναι αμέσως πριν και μετά το δείγμα, ενώ οι συγκεντρώσεις του αναλύτη στα 2 πρότυπα θα πρέπει να μη διαφέρουν περισσότερο από 50% μεταξύ τους [European Commission (2009)].

Μέτρηση με χρήση καμπύλης αναφοράς που δεν έχει κατασκευαστεί την ίδια μέρα με τις μετρήσεις δειγμάτων γίνεται αν ικανοποιούνται τα κριτήρια γραμμικότητας της και εφόσον εξακολουθεί η καμπύλη να είναι έγκυρη, έλεγχος της γίνεται με αναμνηστικό διάλυμα ελέγχου.

Η περιεκτικότητα του αναλύτη στα δείγματα δίνεται από την εξίσωση $C = \frac{V_1}{m} * c_i$

(σε mg/kg δείγμα), όπου c_i η συγκέντρωση (ng/µL) της ουσίας, όπως υπολογίστηκε στο εγχυόμενο διάλυμα του δείγματος από τη σύγκριση με διαλύματα της προτύπου ουσίας.

9. Αποτελέσματα

9.1. Έλεγχος αβεβαιότητας της δειγματοληψίας κατά την ομοιογενοποίηση

Ένας σημαντικός παράγοντας αβεβαιότητας είναι η υποδειγματοληψία εντός του εργαστηρίου. Ο παράγων είναι ιδιαίτερα σημαντικός στα στερεά δείγματα, αφού τα υγρά έχουν καλύτερη ομοιογένεια. Για την εκτίμηση της σημαντικότητας της υποδειγματοληψίας στην ελιά εμβολιάστηκε δείγμα μάρτυρα ελιάς με μίγμα 150 φυτοφαρμάκων σε επίπεδο 0,025mg/kg και αναλύθηκαν εις διπλούν 10 υποδείγματα του μίγματος. Αρχικά πραγματοποιήθηκε το στατιστικό κριτήριο Levene για τον έλεγχο της ομοιογένειας των διασπορών και στην συνέχεια μονόδρομη ανάλυση διασποράς (ANOVA) για τον έλεγχο της σημαντικότητας της υποδειγματοληψίας. Σύμφωνα με το κριτήριο Levene προέκυψε ότι οι διασπορές των υπό εξέταση δειγμάτων και για τις 150 ουσίες, είχαν ομοιογένεια, συνεπώς μπορέσαμε να προβούμε με ασφάλεια στην διεξαγωγή της ανάλυσης διασποράς. Από την εξέταση των διαφορετικών υποδειγμάτων δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ [F (2)-1, (10)-(2), $p > 0.05$] των υποδειγμάτων που ελήφθησαν για καμία από τις 150 ουσίες καθιστώντας τα υποδείγματα ομοιογενή.

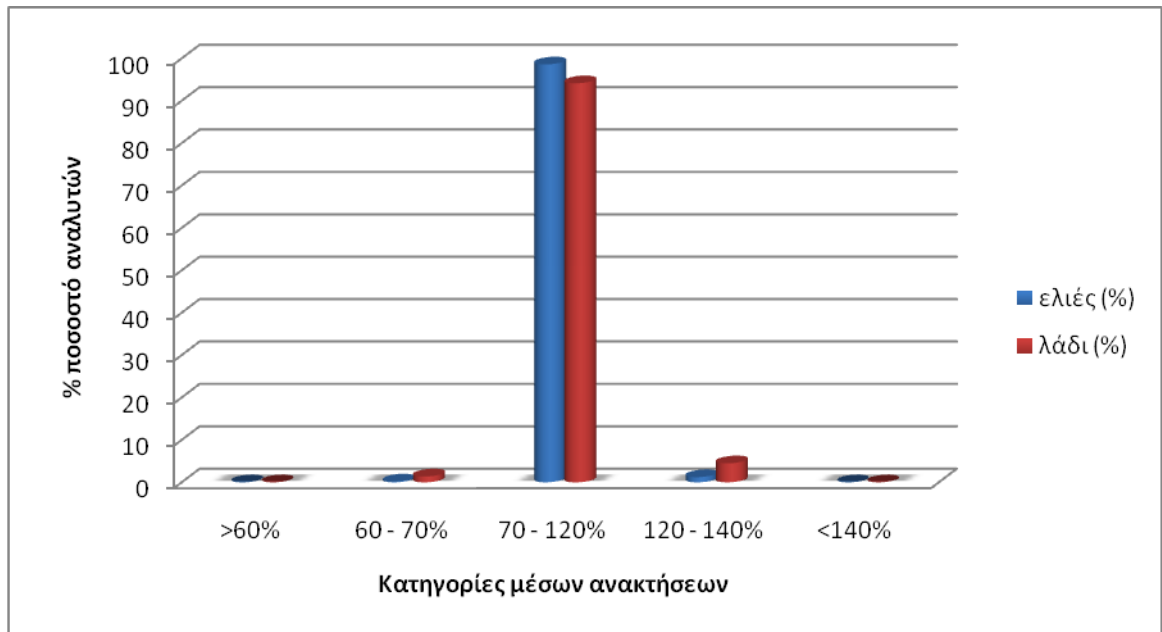
9.2. Εκτίμηση της ορθότητας και της πιστότητας της μεθόδου

Η εκτίμηση της ορθότητας πραγματοποιήθηκε με ανάλυση σε δείγματα μάρτυρα τα οποία εμβολιάστηκαν τεχνητά στο εργαστήριο με γνωστές συγκεντρώσεις των αναλυτών και υπολογισμό της ανάκτησης. Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε σε 2 επίπεδα, 0,01 mg/kg που αποτελεί τη μικρότερη τιμή από τα μέγιστα όρια υπολείμματος σε λάδι και ελιές και 0,1 mg/kg. Σε κάθε επίπεδο έγιναν 5 επαναλήψεις.

Η πιστότητα εκτιμήθηκε στα 2 επίπεδα συγκεντρώσεων με την επαναληψιμότητα, που είναι το μέτρο της διασποράς μιας σειράς μετρήσεων μεταξύ τους υπό όμοιες συνθήκες και εκφράζεται με την σχετική τυπική απόκλιση (RSD).

Ως αποδεκτές τιμές θεωρούνται μέσες ανακτήσεις 70-120% και $RSD \leq 20\%$. Μικρότερες τιμές ανάκτησης είναι δυνατόν να γίνουν αποδεκτές εφ' όσον συνοδεύονται από ικανοποιητικά στοιχεία επαναληψιμότητας ($RSD \leq 20\%$) [European Commission (2009)].

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι οι περισσότεροι αναλύτες παρουσιάζουν ανακτήσεις και τιμές RSD εντός των αποδεκτών ορίων. Αναλυτικότερα, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 3**, το ποσοστό των αναλυτών με ορθότητα εντός των αποδεκτών ορίων είναι 98,6 και 94,14 % για την ελιά και το λάδι αντίστοιχα.



Σχήμα 3. Κατανομή αναλυτών ανάλογα με το ποσοστό των μέσων ανακτήσεων τους σε υπόστρωμα λάδι και ελιά

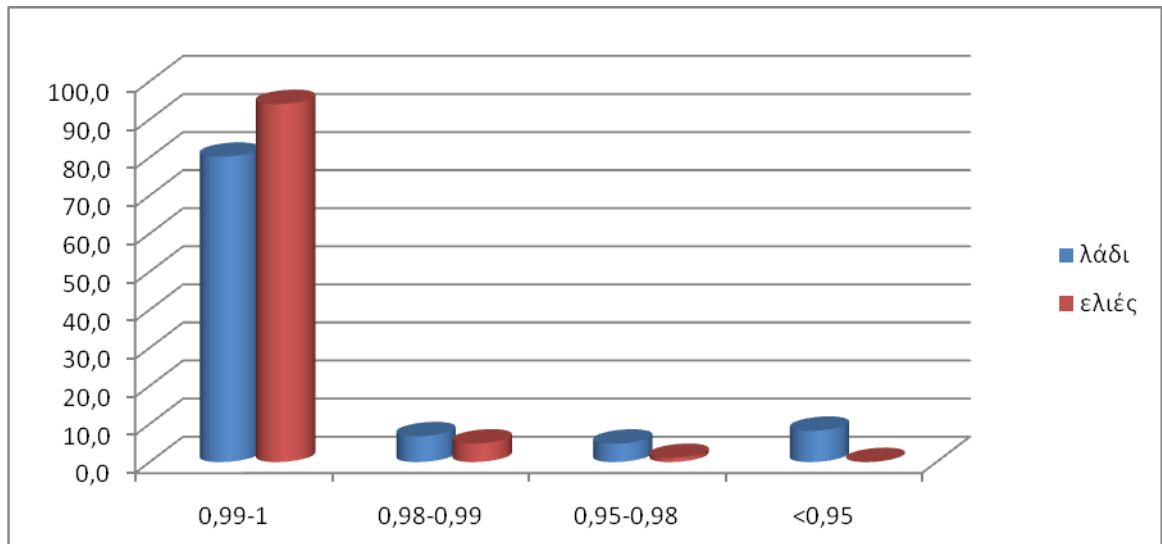
9.3. Εκτίμηση της γραμμικότητας της μεθόδου

Η γραμμικότητα μελετήθηκε στην περιοχή συγκεντρώσεων 10 – 25 – 50 – 75 – 100 – 150 – 200 – 300 $\mu\text{g/mL}$, με εξέταση του διαγράμματος απόκρισης του ανιχνευτή ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του αναλύτη. Σχεδιάστηκε η γραμμή παλινδρόμησης με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Στις αναλύσεις υπολειμμάτων η γραμμή θεωρείται ευθεία όταν ο συντελεστής συσχέτισης r έχει τιμές $\geq 0,98$. Έγινε προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στην εξίσωση $A = (a \pm t_{0,99} \times s_a) + (b \pm t_{0,99} \times s_b) \times c$, όπου A η επιφάνεια κορυφής και c η συγκέντρωση του αναλύτη. Η αβεβαιότητα στη συγκέντρωση που προκύπτει από τη χρήση της γραμμής

παλινδρόμησης, S_u , δίνεται από την εξίσωση $S_u = \frac{S_{A/c}}{b}$, όπου $S_{A/c} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}{n-2}}$, b η

κλίση της γραμμής παλινδρόμησης. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η συνεισφορά της καμπύλης αναφοράς στην ολική αβεβαιότητα της μεθόδου δεν ξεπερνάει το 4,2%.

Γενικά οι αναλύτες παρουσιάζουν καλή γραμμικότητα, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 4**, το ποσοστό των αναλυτών με $r \geq 0,98$ είναι 87% για υπόστρωμα λάδι και 99% για υπόστρωμα ελιές. Το ποσοστό των αναλυτών με $r < 0,95$ είναι 8,2% και αυτό μόνο για την περίπτωση που το υπόστρωμα είναι λάδι.



Σχήμα 4. Κατανομή τιμών του συντελεστή συσχέτισης r για τους υπο εξέταση αναλύτες σε υποστρώματα λάδι και ελιά.

9.4. Εκτίμηση της επίδρασης του υποστρώματος

Με τον όρο «επίδραση υποστρώματος» (matrix effect) νοείται η συνολική επίδραση των επιμέρους συστατικών του δείγματος στη μετρούμενη συγκέντρωση του αναλύτη [McNaught (1997)]. Μπορεί να λάβει χώρα με διάφορους τρόπους, επηρεάζοντας είτε το διαχωρισμό των αναλυτών είτε τον ιονισμό τους. Για τον λόγο αυτό οι περισσότερες μέθοδοι περιλαμβάνουν διάφορα στάδια καθαρισμού όπως εκχύλιση στερεής φάσης [Yagüe (2005), Rastrelli (2002), Di Muccio (1999), Esteve-Turrillas (2005), Lentza-Rizos (2001)], χρωματογραφία πηκτής [Ballesteros (2006), García-Sánchez (2006), Guardia-Rubio (2007)] και καθαρισμό με κατάψυξη [CRL for Single Residue Methods (2009)] για τη μείωση της συγκέντρωσης των συνεκλουσμάτων στο τελικό εκχύλισμα. Η επίδραση του υποστρώματος μπορεί να οδηγήσει στην ενίσχυση ή στην υποβάθμιση του σήματος του ανιχνευτή για τον υπό εξέταση αναλύτη. Χρήση προτύπων διαλυμάτων που περιέχουν υπόστρωμα παρόμοιο με αυτό του δείγματος αναιρεί την επίδραση του υποστρώματος στη μέτρηση σε σημαντικό βαθμό. Η εκτίμηση της επίδρασης του υποστρώματος στη μέτρηση, εκφραζόμενη ως μεταβολή της απόκρισης του ανιχνευτή, πραγματοποιήθηκε συγκρίνοντας τις κλίσεις των γραμμών παλινδρόμησης των αναλυτών σε διαλύτη (ακετονιτρίλιο) χωρίς υπόστρωμα (λάδι ή ελιά) και σε διαλύτη με υπόστρωμα.

Μια ταχεία δοκιμασία τύπου Student βασίζεται στον προσδιορισμό του

$$t_{\text{παρ}} = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{S_{b_1}^2 - S_{b_2}^2}}$$

Όπου b_1 και b_2 οι κλίσεις των γραμμών παλινδρόμησης των αναλυτών σε διαλύτη χωρίς υπόστρωμα και σε διαλύτη με υπόστρωμα και S_{b_1} και S_{b_2} οι τυπικές αποκλίσεις των b_1 και b_2 αντίστοιχα.

Η πειραματική τιμή $t_{\text{πειρ}}$ συγκρίνεται με την θεωρητική τιμή $t_{\text{θεωρ}}$ που αντιστοιχεί στην επιθυμητή στάθμη εμπιστοσύνης για $v = (n_1 - 2) + (n_2 - 2)$ βαθμούς ελευθερίας, όπου n_1 και n_2 ο αριθμός των ζευγών τιμών (C, Area) που χρησιμοποιείται σε κάθε ένα από τα διαγράμματα για τον προσδιορισμό των κλίσεων b_1 και b_2 . Η επίδραση του υποστρώματος είναι διαφορετική ανάλογα με τον αναλύτη και το υπόστρωμα. Από την σύγκριση αυτή για υπόστρωμα λαδιού προκύπτει ότι στο 63,5% των

αναλυτών δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική επίδραση του υποστρώματος στη μέτρηση, ενώ σε υπόστρωμα ελιάς το ποσοστό αυτό είναι μικρότερο (53,9%).

9.5. Υπολογισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ)

Το όριο ποσοτικοποίησης υπολογίστηκε ως η συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα για την οποία ο λόγος σήμα / θόρυβος (S/N) έχει την τιμή 10 [European Commission (2009)]. Όλοι οι αναλύτες στο χαμηλότερο επίπεδο και στα 2 υποστρώματα παρουσίασαν S/N μεγαλύτερο από 10.

10. Συγκρίσεις στις επιμέρους χημικές ομάδες δραστικών ουσιών.

Οργανοφωσφορικά: αξιολογήθηκαν 26 αναλύτες. Προσδιορίστηκαν κυρίως με LC-MS/MS και 3 από αυτά με GC-MS/MS. Παρουσίασαν ανακτήσεις 69,4 – 119,8% και τιμές RSD 2,7 - 20,8%. Είχαν καλή γραμμικότητα με $r \geq 0,98$, με εξαίρεση το chlorpyrifos methyl και το malathion τα οποία παρουσιάζουν όμως ικανοποιητική γραμμικότητα). Η η επίδραση του υποστρώματος δεν ήταν σημαντική σε 76,2% από αυτές για υπόστρωμα λάδι και 50% για υπόστρωμα ελιά.

Καρβαμιδικά: αξιολογήθηκαν 15 αναλύτες και είναι φυτοφάρμακα ή μεταβολίτες τους. Προσδιορίστηκαν με LC-MS/MS και παρουσίασαν ανακτήσεις και RSD με τιμές 72 – 112,7% και 8,1 - 19,8% αντίστοιχα. Είχαν καλή γραμμικότητα με $r \geq 0,98$, ενώ η επίδραση του υποστρώματος δεν είναι σημαντική για το 66,7% από αυτές για υπόστρωμα λάδι και 73% για υπόστρωμα ελιά.

Τριαζόλες: αξιολογήθηκαν 13 αναλύτες. Προσδιορίστηκαν με LC-MS/MS και παρουσίασαν ανακτήσεις και RSD με τιμές 69,3 – 120,5% και 5,3 – 20,9% αντίστοιχα. Είχαν καλή γραμμικότητα με $r 0,986 - 0,998$, ενώ η επίδραση του υποστρώματος δεν είναι σημαντική για το 70% αυτών για το λάδι και το 60% για την ελιά.

Οργανοχλωριωμένα: αξιολογήθηκαν 11 αναλύτες. με GC-MS/MS και παρουσίασαν ανακτήσεις και RSD με τιμές 70,3 – 119% και 5,6 - 20,8% αντίστοιχα. Είχαν γραμμικότητα με τιμές r από 0,909 – 0,997. Η επίδραση του υποστρώματος ήταν σημαντική τους περισσότερους αναλύτες τόσο για υπόστρωμα λάδι όσο και για ελιά.

Πυρεθρίνες: αξιολογήθηκαν 10 αναλύτες με GC-MS/MS και παρουσίασαν ανακτήσεις και RSD με τιμές 71 – 120% και 2,2 - 20,7% αντίστοιχα. Είχαν γραμμικότητα με τιμές $r 0,947 - 0,999$. Η επίδραση του υποστρώματος δεν ήταν σημαντική για το σύνολο σχεδόν των αναλυτών και για τα 2 υποστρώματα.

Σουλφονυλουρίες – Φαινυλουρίες – Ουρίες: αξιολογήθηκαν 12 αναλύτες με GC-MS/MS και παρουσίασαν ανακτήσεις και RSD 70,6 – 120,9% και 2,4 – 19,9% αντίστοιχα. Είχαν γραμμικότητα με τιμές $r 0,98 - 0,998$. Η επίδραση του υποστρώματος δεν ήταν σημαντική για το 85% των αναλυτών και για τα 2 υποστρώματα.

Στρομπυλουρίες: αξιολογήθηκαν 4 αναλύτες με LC -MS/MS και παρουσίασαν ανακτήσεις και RSD 77,1 – 120,7% και 3,5 – 19,5% αντίστοιχα. Είχαν γραμμικότητα με τιμές $r 0,998 - 0,999$. Η επίδραση του υποστρώματος δεν ήταν σημαντική για το υπόστρωμα λάδι, ενώ ήταν σημαντική για το υπόστρωμα της ελιάς.

Νεονικοτινοειδή: αξιολογήθηκαν 5 αναλύτες με LC -MS/MS και παρουσίασαν ανακτήσεις και RSD 70,5 – 119,4% και 3,5 – 19,5% αντίστοιχα. Είχαν γραμμικότητα με τιμές $r 0,996 - 1,000$. Η επίδραση του υποστρώματος δεν ήταν σημαντική στο 33,3 % των αναλυτών για υπόστρωμα λάδι και 42,8% αυτών για υπόστρωμα ελιά.

11. Βιβλιογραφία

Καλτσίκης Π.Ι., “Πίνακες Γεωργικού Πειραματισμού”, Γ Έκδοση, 1990, Σταμούλης.

Ballesteros E. Sanchez G.A. Martos N.R., “*Simultaneous multidetermination of residues of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/ tandem mass spectrometry*”, J Chromatogr A (1111) 89-96, 2006.

CRL for Single Residue Methods., “*Analysis of Acidic Pesticides in Wheat Flour Samples by LC-MS(/MS) using the QuEChERS Method (including optional alkaline hydrolysis to release covalently bound compounds)*”, Available at: http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/cf/acidicpesticides_wheat_quechers.pdf, accessed in: 02/ 6 /2009.

Di Muccio A. Pelosi P. Barbini DA. Generali T. Girolimetti S. Stefanelli P. Leonelli A. Armándola G. Vergri L. Fresquet EV., “*Determination of pyrethroid pesticide residues in fatty materials by solid-matrix dispersion partition, followed by mini-column size-exclusion chromatography*”, J Chromatogr A, (833) 19–34, 1999.

European Commission, Document No. SANCO/10684/2009, “*Method Validation And Quality Control Procedures For Pesticide Residues Analysis In Food And Feed*”, Available at: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf. Accessed in: 11/7/2010.

Esteve-Turrillas FA. Pastor A. De la Guardia M., “*Determination of pyrethroid insecticide residues in vegetable oils by using combined solid-phases extraction and tandem mass spectrometry detection*”, Anal Chim. Acta, (553) 50–57, 2005.

Ferrer C. Gomez M.J. Garcia-Reyes J.E. Ferrer I. Thurman E.M. Fernandez-Alba A.R., “*Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry*” J. Chromatogr. A, (1069) 183-194, 2005.

García-Sánchez A. Ramos-Martos N. Ballesteros E., “*Multiresidue analysis of pesticides in olive oil by gel permeation chromatography followed by gas chromatography–tandem mass-spectrometric determination*”, Anal Chim Acta (558) 53–61, 2006.

Guardia-Rubio M. Marchal-Lopez R.M. Ayora-Canada M.J. RuizMedina, “*Determination of pesticides in olives by gas chromatography using different detection systems*” J. Chromatogr. A (1145) 195-203, 2007.

Lentza-Rizos C. Avramides E.J. Visi. E., “*Determination of Residues of Endosulfan and Five Pyrethroid Insecticides in Virgin Olive Oil Using Gas Chromatography with Electron-Capture Detection*” J Chromatogr A. (921) 297-304, 2001.

McNaught A.D. Wilkinson A., *"IUPAC Compendium of Chemical Terminology, The Gold Book"*, Second Edition, Eds., Blackwell Science Ltd, 1997 available at: <http://old.iupac.org/goldbook/M03759.pdf> accessed in: 11/7/2010.

Rastrelli L. Totaro K. De Simona F., *"Determination of organophosphorus 570 pesticide residues in Cilento (Campania, Italy) virgin olive oil by capillary gas chromatography"*, Food Chem, (79) p.p.303–305, 2002.

Yagüe C. Bayarri S. Conchillo P. Lázaro R. Pérez-Arquellé C. Herrera A. Ariño A., *"Determination of Pesticides and PCBs in Virgin Olive Oil by Multicolumn Solid-Phase Extraction Cleanup Followed by GC-NPDECD and Confirmation by Ion-Trap GC-MS"*, J Agric Food Chem, (53) p.p. 5105–5109, 2005.