

Συνδρομή των διεργαστηριακών δοκιμών στην εκτίμηση της αβεβαιότητας των πολυδύναμων μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων στα τρόφιμα

Ελένη Μποτίτση, Σπύρος Αντωνίου, Δέσποινα Τσίπη
Γενικό Χημείο του Κράτους,
Εργαστήριο Υπολειμμάτων Γεωργικών Φαρμάκων
Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς
e-mail: pesticides@ gcsf.gr

Abstract. The evaluation of measurement uncertainty of multiresidue methods is a challenging issue for pesticide residues testing laboratories. Practical “top-down” approaches are proved to be the most suitable in evaluating the measurement uncertainty for all of the pesticides in a consistent way. A “top-down” approach based on experimental data from the quality control work of the laboratory: within-laboratory reproducibility, method validation data and results obtained in proficiency tests, has been applied for calculating the measurement uncertainty compared to the default expanded measurement uncertainty value of 50%. In all cases - different matrices, different analytes, various concentration levels, different analytical techniques applied - the expanded calculated uncertainties were in the range 42 -58%.

Περίληψη Καθώς η εκτίμηση της αβεβαιότητας είναι απαίτηση του προτύπου ISO/IEC 17025, αυτή πρέπει να αντιμετωπίζεται με τρόπο αποτελεσματικό και συμφέροντα για τα εργαστήρια ελέγχου υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων τα οποία κυρίως εφαρμόζουν πολυδύναμες μεθόδους προσδιορισμού. Γενικά για τις πολυ-υπολειμματικές μεθόδους θεωρείται πλέον κατάλληλη η υιοθέτηση της «top-down» προσέγγισης σε σύγκριση με την «bottom-up». Μια από τις «top-down» προσεγγίσεις προτείνει τη χρήση default τιμών (εξίσωση Horwitz, fit-for-purpose σχετική τυπική απόκλιση FFP-RSD) ενώ στη δεύτερη προσέγγιση, χρησιμοποιούνται πειραματικά δεδομένα του εργαστηρίου που προκύπτουν από τον έλεγχο ποιότητας όπως δεδομένα ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, επικυρώσεων και διεργαστηριακών δοκιμών. Στην παρούσα εργασία διερευνάται η αποτελεσματικότητα της χρήσης των δεδομένων των διεργαστηριακών δοκιμών, z-scores τιμές και combined z-scores τιμές, στα οποία έχει συμμετάσχει το εργαστήριό μας τα τελευταία χρόνια στην αξιολόγηση των πολυδύναμων μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων που έχουν αναπτυχθεί με τεχνικές LC-MS/MS, GC-MS/MS, GC-FPD, GC-EC. Ταυτόχρονα γίνεται συγκριτική εκτίμηση της αβεβαιότητας των μετρήσεων των πολυδύναμων μεθόδων χρησιμοποιώντας τα δεδομένα του εσωτερικού ή/και του εξωτερικού ελέγχου σε σχέση με τη κοινά αποδεκτή τιμή διευρυμένης αβεβαιότητας του 50% που εφαρμόζεται για τη διευκόλυνση της συγκρισιμότητας και την εναρμόνιση των αποτελεσμάτων των εργαστηρίων ελέγχου.

Λέξεις-κλειδιά : διεργαστηριακές δοκιμές, πολυ-υπολειμματική μέθοδος, αβεβαιότητα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Υποχρέωση των διαπιστευμένων κατά ISO 17025 εργαστηρίων ελέγχου είναι η συμμετοχή σε διεργαστηριακές δοκιμές ελέγχου ικανότητας (Proficiency tests) για τον έλεγχο της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων τους. Στην ΕΕ, τα επίσημα εργαστήρια ελέγχου υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων των κρατών-μελών, οφείλουν να είναι διαπιστευμένα κατά ISO 17025 και να συμμετέχουν, σύμφωνα με τον Κανονισμό EU 396/2005, ετησίως στα διεργαστηριακά σχήματα ελέγχου ικανότητας (European Union Proficiency Tests, EUPTs) που οργανώνουν τα Ευρωπαϊκά Εργαστήρια Αναφοράς (European Union Reference Laboratories, EURLs) υπό την αιγίδα της DG SANCO (Directorate General for Health and Consumers Protection), βάσει του Κανονισμού EU 882/2004 υπερκαλύπτοντας τις σχετικές απαιτήσεις του ISO 17025.

Πολλαπλές και χημικά διαφορετικές ομάδες φυτοφαρμάκων έχουν εγκριθεί για χρήση στην γεωργική πρακτική όπως τριαζόλες, στρομπιλουρίνες, βενζοϊμιδαζόλες, καρβαμιδικές ενώσεις, πυρεθρίνες, οργανοφωσφορικά, σουλφονουλουργίες, όξινα φυτοφάρμακα, τριαζίνες και άλλα [1]. Για τον έλεγχο των υπολειμμάτων των ανωτέρω κατηγοριών φυτοπροστατευτικών ουσιών, στα τρόφιμα είναι αναγκαία πλέον η ανάπτυξη 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) ή/και υψηλής διαχωριστικότητας και ακρίβειας, φασματομετρία μαζών (High Resolution mass spectrometry, GC-HRMS, LC-HRMS) [2]. Τα διεργαστηριακά σχήματα (EUPTs) των Ευρωπαϊκών Εργαστηρίων Αναφοράς (EURLs) έχουν «προσαρμοστεί» στις σύγχρονες πολυδύναμες υπολειμματικές μεθόδους καθώς το πλήθος των ενώσεων που εμβολιάζεται το διεργαστηριακό δείγμα είναι τέτοιο ώστε το προκύπτον επίπεδο εμπιστοσύνης να είναι ικανοποιητικό για το σύνολο των ενώσεων της πολυδύναμης μεθόδου [3]. Συνέπεια του μεγάλου σχετικά αριθμού θετικών ευρημάτων στα διεργαστηριακά δείγματα των EUPTs για πολυδύναμες μεθόδους είναι ο μεγάλος αριθμός z-score τιμών που καθιστά την εκτίμηση της συνολικής επίδοσης του εργαστηρίου δυσχερή. Για το λόγο αυτό κρίθηκε αναγκαίο να χρησιμοποιηθεί ένας νέος δείκτης συνδυαστικός και αθροιστικός των επί μέρους επιδόσεων του εργαστηρίου βασισμένος σε μια τέτοια συνάρτηση που θα είναι εύκολη στη χρήση, ικανή να καλύψει την ανάγκη της διαχρονικής αξιολόγησης της επίδοσης του εργαστηρίου, ανιχνεύοντας θετικές ή αρνητικές τάσεις και να συμβιβάζει δίκαια τυχόν ατυχή αποτελέσματα πολυδύναμων μεθόδων. Τέτοιες συναρτήσεις είναι αυτές του αθροίσματος των ζυγισμένων z-score τιμών (sum of weighted z-scores, SWZ) και του αθροίσματος των τετραγώνων των z-score τιμών (sum of squared z-scores, SZ2) οι οποίες χρησιμοποιούνται στην εκτίμηση της επίδοσης των πολυδύναμων μεθόδων των εργαστηρίων. Μια σημαντική παράμετρος που πρέπει να υπολογισθεί από τα εργαστήρια ελέγχου είναι η αβεβαιότητα της μέτρησης. Μεταξύ των “bottom-up” και “top-down” προσεγγίσεων για τον υπολογισμό της αβεβαιότητας προτείνεται στην περίπτωση των πολυ-υπολειμματικών μεθόδων η “top-down” σαν πιο κατάλληλη τεχνική. Στην περίπτωση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της αβεβαιότητας είτε συγκεκριμένες τιμές βασισμένες στην εμπειρία και την ακρίβεια του εργαστηρίου (π.χ. εξίσωση Horwitz, fit-for-purpose σχετική τυπική απόκλιση FFP-RSD) είτε πειραματικά δεδομένα του εργαστηρίου που προκύπτουν από τον εσωτερικό και εξωτερικό έλεγχο ποιότητας όπως δεδομένα ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, δεδομένα επικυρώσεων και διεργαστηριακών δοκιμών [3,4].

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται τα αποτελέσματα των διεργαστηριακών δοκιμών, z-scores τιμές και combined z-scores τιμές, στα οποία έχει συμμετάσχει το εργαστήριό μας τα τελευταία χρόνια στην αξιολόγηση των πολυδύναμων μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων και ταυτόχρονα γίνεται εκτίμηση της αβεβαιότητας αυτών χρησιμοποιώντας τα δεδομένα του εσωτερικού και του εξωτερικού ελέγχου ποιότητας του εργαστηρίου και σύγκριση των τιμών της διευρυμένης τυπικής αβεβαιότητας σε σχέση με τη κοινά αποδεκτή τιμή διευρυμένης αβεβαιότητας του 50% [4] που εφαρμόζεται για τη διευκόλυνση της συγκρισιμότητας και την εναρμόνιση των αποτελεσμάτων των εργαστηρίων ελέγχου .

Αποτελέσματα-Συζήτηση.

EUPTs, z-scores, SWZ, SZ2 :

Στο εργαστήριο εφαρμόζονται πολυ-υπολειμματικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό διαφορετικών κατηγοριών φυτοπροστατευτικών ουσιών και των μεταβολιτών τους σε διάφορα είδη τροφίμων, με βάση τις τεχνικές της υγρής χρωματογραφίας – δίδυμης φασματομετρίας μαζών (LC-MS/MS) της αέριας χρωματογραφίας διαδοχικής φασματομετρίας μαζών (GC-MSⁿ) και αέριας χρωματογραφίας με ειδικούς ανιχνευτές (GC-FPD-NPD, GC-ECD) σύμφωνα με τις σχετικές οδηγίες της ΕΕ για τον έλεγχο των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές [4]. Μέθοδοι εκχύλισης όπως η QuEChERS [2, 5] ή και συνδυασμοί αυτής με εκχύλιση στερεάς φάσης ανάλογα με το είδος του τροφίμου ή/και παλαιότερες μέθοδοι εκχύλισης όπως η mini-Luke [2] που έχουν δοκιμαστεί και επικυρωθεί στο εργαστήριο χρησιμοποιούνται για την κατεργασία των δειγμάτων. Διαφορετικοί συνδυασμοί μεθόδων κατεργασίας και ανάλυσης κατά περίπτωση, έχουν επικυρωθεί στο εργαστήριο και έχουν εφαρμοστεί σε πλήθος δειγμάτων του επίσημου ελέγχου παράλληλα με δείγματα εσωτερικού ελέγχου ποιότητας καθώς και σε δείγματα διεργαστηριακών σχημάτων ελέγχου ικανότητας. Το πλήθος των διαθέσιμων δεδομένων των επικυρώσεων και του εσωτερικού ελέγχου ποιότητας υπερβαίνει τις 9000 για την τετραετία 2008-2011, η δε κατανομή αυτού ανά τεχνική και έτος απεικονίζεται στο διάγραμμα του σχήματος 1. Η συμμετοχή του εργαστηρίου στα διεργαστηριακά σχήματα των Ευρωπαϊκών Εργαστηρίων Αναφοράς (4 EUPTs ανά έτος) και του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιολάδου αποφέρει ένα πλήθος z-scores τιμών, ήτοι 200 για την ίδια χρονική περίοδο, των οποίων η κατανομή ανά τεχνική και έτος παρουσιάζεται στο σχήμα 2. Για κάθε διεργαστηριακό σχήμα ανά έτος ή και συνολικά για την τετραετία καθώς και ανά τεχνική ή συνδυασμούς τεχνικών κατεργασίας-ανάλυσης

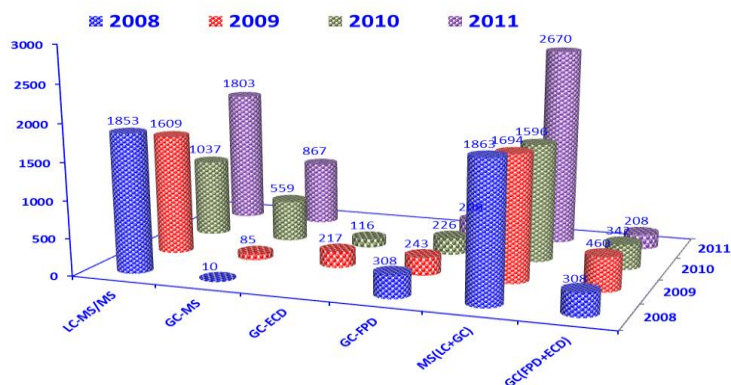
υπολογίζεται ο συνδυαστικός δείκτης SWZ (ή/και ο SZ2) που απεικονίζει συνολικά την επίδοση του εργαστηρίου και των μεθόδων του κατά περίπτωση, με ικανοποιητικά στην πλειονότητα αποτελέσματα.

Εκτίμηση της αβεβαιότητας της μέτρησης

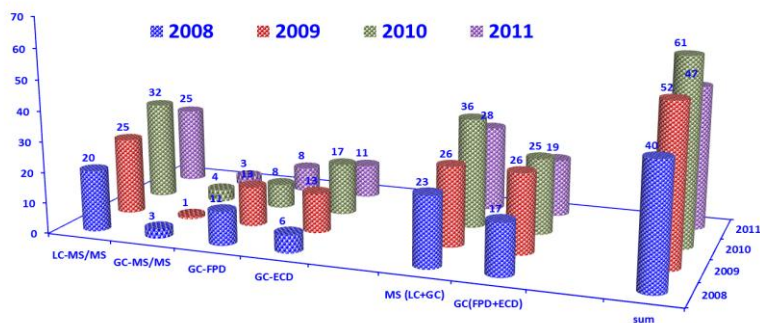
Τα διαθέσιμα δεδομένα των επικυρώσεων και του εσωτερικού ελέγχου ποιότητας της τελευταίας τετραετίας χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της μέσης ανάκτησης και της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (RSD_{WR}) ανά αναλυτική τεχνική ή και ανά συνδυασμό μεθόδου κατεργασίας-τεχνικής και ομάδες αναλυτών, η οποία χρησιμοποιείται σαν τη συνιστώσα της πιστότητας στην εκτίμηση της αβεβαιότητας. Τα δεδομένα των διεργαστηριακών δοκιμών χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της συνιστώσας της αληθότητας ήτοι του σφάλματος (bias) της μεθόδου και του εργαστηρίου στη συνολική αβεβαιότητα της μέτρησης [3,4].

Λαμβάνοντας διαφορετικούς συνδυασμούς χρονικών περιόδων, ομάδων αναλυτών και μεθόδων κατεργασίας υπολογίζεται η συνολική διευρυμένη αβεβαιότητα των βασικών συνδυασμών μεθόδων κατεργασίας και αναλυτικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται στη ρουτίνα όπως π.χ. QuEChERS-LC-MS/MS, mini-Luke-LC-MS/MS ή ακόμα και συνδυασμός των QuEChERS, mini-Luke με LC-MS/MS. Το βασικό σκεπτικό ήταν να καλυφθεί το «χειρότερο πιθανό σενάριο» ανά συνδυασμό ώστε να έχουμε την εκτίμηση της μεγαλύτερης δυνατής τιμής διευρυμένης αβεβαιότητας. Οι τιμές διευρυμένης αβεβαιότητας για $k=2$, (95% επίπεδο εμπιστοσύνης) που προέκυψαν ήταν στην περιοχή τιμών 42-58 % ακόμα και στις «ακραίες» περιπτώσεις γεγονός που δικαιολογεί την υιοθέτηση της default τιμής του 50% για τις αναλύσεις υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων [4].

Σχ. 1. Πλήθος Δεδομένων Εσωτερικού Ελέγχου Ποιότητας ανά τεχνική και έτος .



Σχ.2. Πλήθος z-scores τιμών του εργαστηρίου ανά τεχνική και ανά έτος.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.

1. http://www.europa.eu.int/comm/food/plant/protection/pesticides/index_en.htm
2. Botitsi H.V., Garbis ., S.D., Economou A., Tsipi D.F. .Current Mass Spectrometry Strategies for the Analysis of Pesticides and their Metabolites in Food and Water Matrices. Mass Spectrometry Reviews, 30, (2011) 907– 939.
3. Medina-Pastor P. et al., J. Agric. Food Chem., 2011, 59 (14), 7609-7619
4. “Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed” Document No SANCO 12495/2011.
5. European Standard EN 15662: “Foods of Plant Origin – Determination of Pesticide Residues Using GC-MS and/or LC-MS/MS Following Acetonitrile Extraction/Partitioning and Clean-up by Dispersive SPE (QuEChERS method)” (www.cen.eu).