

Αναλύσεις υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων σε τρόφιμα και νερά με χρήση των τεχνικών LC-MS/MS και GC-MSⁿ

Ελένη Μποτίτση, Σ. Αντωνίου, Ε. Κουκέας, Δ. Τσίπη

**Γενικό Χημείο του Κράτους, Αν. Τσόχα 16, Αθήνα 11521
Εργαστήριο Υπολειμμάτων Γεωργικών Φαρμάκων**

Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς

e-mail: pesticides@gcsf.gr

pesticides@gcsf.gr

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Ο έλεγχος τροφίμων και νερών ως προς υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων έχει ιδιαίτερη σημασία σε θέματα προστασίας της δημόσιας υγείας και διεθνούς εμπορίου. Πλήθος χημικών ενώσεων με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες διαφορετικών χημικών τάξεων χρησιμοποιούνται σαν φυτοπροστατευτικές ενώσεις. Ο Ευρωπαϊκός Κανονισμός 396/2005 θέτει ανώτατα επιτρεπόμενα όρια για τα υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων για τουλάχιστον 450 ενώσεις, σε τρόφιμα φυτικής και ζωϊκής προέλευσης, η πλειοψηφία των οποίων είναι στην περιοχή συγκεντρώσεων 0,01-1,0 mg Kg⁻¹. Παράλληλα οι κοινοτικές οδηγίες 80/778/EC, 98/83/EC για τα νερά θέτουν σαν μέγιστο όριο για κάθε δραστική το 0,1 μg L⁻¹. Ο έλεγχος υπολειμμάτων στα διαφορετικά είδη τροφίμων και νερών για τόσο μεγάλο πλήθος ενώσεων απαιτεί την ανάπτυξη και επικύρωση πολυδυνάμων πολυ-υπολειμματικών μεθόδων όπου συνδυάζονται γενικές μέθοδοι εκχύλισης με ενόργανες τεχνικές ανάλυσης όπως LC-MS/MS και GC-MSⁿ. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται ο πειραματικός σχεδιασμός για την ανάπτυξη και επικύρωση πολυ-υπολειμματικών μεθόδων ανάλυσης φυτοφαρμάκων με τις ανωτέρω τεχνικές καθώς και το σχήμα ελέγχου ποιότητας που τηρείται για το συνεχή έλεγχο της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων του εργαστηρίου. Τα κριτήρια επίδοσης των μεθόδων τόσο για την επικύρωση όσο και για τον καθημερινό έλεγχο ποιότητας περιγράφονται σε σχετική Ευρωπαϊκή Κατευθυντήρια Οδηγία (SANCO Doc. No 12495/2011). Κατά την ανάπτυξη των μεθόδων LC-MS/MS και GC-MSⁿ, μελετήθηκε συστηματικά η επίδραση διαφόρων αναλυτικών παραμέτρων, επιλεγμένων κατά περίπτωση, στην απόκριση κάθε αναλύτη για να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή αναλυτική ευαισθησία, ακρίβεια και ανιχνευσιμότητα. Η LC-MS/MS μέθοδος έχει αναπτυχθεί σε σύστημα τριπλού τετραπολικού αναλύτη μαζών (στοχευμένη ανάλυση) για την ταυτόχρονη μελέτη 150 διαφορετικών δραστικών. Η μέθοδος GC-MSⁿ στηρίζεται σε αναλύτη μάζας τύπου παγίδας ιόντων και περιλαμβάνει μέχρι τώρα 80 δραστικές. Οι ενόργανες μέθοδοί μας σε συνδυασμό με τεχνικές

εκχύλισης τύπου QuEChERS και εκχύλισης στερεάς φάσης SPE χρησιμοποιήθηκαν στην επιτυχή επικύρωση μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων σε 2500 συνδυασμούς φυτοπροστατευτικής/υπόστρώματος τροφίμου και νερού με όριο ποσοτικού προσδιορισμού $0,01\text{mg Kg}^{-1}$ στην πλειονότητα των περιπτώσεων των τροφίμων και στην περιοχή $0,001\text{-}0,03\ \mu\text{g L}^{-1}$ στις διαφορετικές κατηγορίες δειγμάτων νερών. Οι μέθοδοι LC-MS/MS και GC-MSⁿ έχουν εφαρμοσθεί επιτυχώς στον έλεγχο χιλιάδων δειγμάτων συντελώντας στην αύξηση της αποτελεσματικότητας των ελέγχων του εργαστηρίου οι δε επιδόσεις τους τόσο στον εσωτερικό (Δείγματα Ελέγχου Ποιότητας) όσο και στον εξωτερικό έλεγχο ποιότητας (Διεργαστηρικά Δείγματα) είναι σταθερά ικανοποιητικές.

Λέξεις-κλειδιά : υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων, LC-MS/MS, GC-MSⁿ.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα επίπεδα της πρόσληψης φυτοπροστατευτικών ουσιών από την κατανάλωση τροφίμων φυτικής και ζωϊκής προέλευσης είναι αντικείμενο συνεχούς μελέτης, έρευνας και παρακολούθησης στις χώρες-μέλη της Ε.Ε. Η προσπάθεια προστασίας της δημόσιας υγείας αλλά και του περιβάλλοντος από την αλόγιστη χρήση φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων αποτυπώνεται στη σχετική κοινοτική νομοθεσία με τους πρόσφατους κανονισμούς – Καν Ε.Ε. 396/2005, 148/2008, 839/2008– για τα ανώτερα επιτρεπόμενα όρια καταλοίπων γεωργικών φαρμάκων στα τρόφιμα. Γενικά, τα μέγιστα επιτρεπόμενα όρια καταλοίπων φυτοπροστατευτικών ουσιών κυμαίνονται στην περιοχή συγκεντρώσεων $0.01\text{-}10\ \text{mg/kg}$ [1]. Πολλαπλές και χημικά διαφορετικές ομάδες φυτοφαρμάκων έχουν εγκριθεί για χρήση στην γεωργική πρακτική όπως τριαζόλες, στρομπιλουρίνες, βενζοϊμιδαζόλες, καρβαμιδικές ενώσεις, πυρεθρίνες, οργανοφωσφορικά, σουλφονουλουρίες, όξινα φυτοφάρμακα, τριαζίνες και άλλα. Για τον έλεγχο καταλοίπων 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].

Στην παρούσα εργασία, παρουσιάζεται η ανάπτυξη, επικύρωση και εφαρμογή πολυ-υπολειμματικών μεθόδων για τον προσδιορισμό διαφορετικών κατηγοριών φυτοπροστατευτικών ουσιών και των μεταβολιτών τους σε διάφορα είδη τροφίμων,

στηριζόμενη στις τεχνικές της υγρής χρωματογραφίας – δίδυμης φασματομετρίας μαζών (LC-MS/MS) και της αέριας χρωματογραφίας διαδοχικής φασματομετρίας μαζών (GC-MSⁿ) σύμφωνα με τις σχετικές οδηγίες της ΕΕ για τον έλεγχο των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές (SANCO 12495/2011) [3]. Το πλήθος των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που το Εργαστήριο διαχειρίζεται με τις πολυ-υπολειμματικές μεθόδους ανέρχεται πλέον στις διακόσιες τριάντα ανεβάζοντας τον αριθμό των επικυρωμένων και διαπιστευμένων συνδυασμών φυτο-προστατευτικής ουσίας/υποστρώματος του πεδίου του εργαστηρίου στους 2500. Οι μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί σε πλήθος δειγμάτων του επισήμου ελέγχου και σε δείγματα διεργαστηριακών σχημάτων ελέγχου ικανότητας.

ΥΛΙΚΑ

Χρησιμοποιήθηκαν πιστοποιημένες πρότυπες ουσίες φυτοφαρμάκων του οίκου Dr Ehrenstorfer (Ausburg, Γερμανία). Μονήρη διαλύματα παρακαταθήκης προτύπων ουσιών συγκέντρωσης (> 100-400 µg/ml) παρασκευάστηκαν σε pestiscan grade μεθανόλη, ακετόνη ή οξικό αιθυλεστέρα (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, είναι καθαρότητας pesticide grade. Οι στήλες για την εκχύλιση στερεάς φάσης δειγμάτων κρασιών, νερών είναι Oasis HLB 200 mg/6 ml ενώ για τον καθαρισμό στην περίπτωση ελαιολάδων χρησιμοποιούνται στηλάκια N-Alumina 1g/6ml. Στην περίπτωση της μεθόδου QuEChERS χρησιμοποιούνται έτοιμα μίγματα αλάτων.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

QuEChERS EN 15662 [4]: Ποσότητα 10-g ομογενοποιημένου δείγματος εκχυλίζεται με 15 ml ακετονιτρίλιου, οξινισμένου με 1% οξικό οξύ, σε λουτρό υπερήχων υπό ανάδευση για 30 λεπτά. Στην περίπτωση ξηρών δειγμάτων π.χ. δημητριακά, χρησιμοποιείται ποσότητα 5 g του δείγματος το οποίο υφίσταται διαβροχή με νερό πριν την εκχύλιση. Προστίθεται το μίγμα αλάτων και ακολουθεί έντονη ανατάραξη για ένα λεπτό. Το διάλυμα του δείγματος υποβάλλεται σε φυγοκέντρηση, παραλαβή του υπερκειμένου, συμπύκνωση και παραλαβή του υπολείμματος με 5 ml μεθανόλη. Τα εκχυλίσματα αραιώνονται με νερό και αναλύονται με LC-MS/MS.

LC-MS/MS ανάλυση:

Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας αποτελείται από αντλία Surveyor LC και αυτόματο δειγματολήπτη Surveyor (ThermoElectron, Η.Π.Α.). 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 έκλυσης 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 περίπου σαράντα 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, Η.Π.Α.). Το λογισμικό του οργάνου για συλλογή και επεξεργασία δεδομένων είναι το Xcalibur 2.0

GC-MSⁿ ανάλυση:

Το σύστημα αέριας χρωματογραφίας με φασματομετρικό ανιχνευτή μάζας παγίδας ιόντων: αποτελείται από αέριο-χρωματογράφο Trace GC Ultra, με έναν εισαγωγέα δείγματος PTV και με έναν Split/splitless εισαγωγέα (ThermoScientific., Η.Π.Α.) .Ο ανιχνευτής φασματομετρίας μάζας είναι τύπου παγίδας ιόντων (ion trap), Polaris Q,(ThermoScientific., Η.Π.Α.) με δυνατότητα ιοντισμού με ηλεκτρόνια και χημικού ιοντισμού (θετικού/αρνητικού). Ο αυτόματος δειγματολήπτης είναι ο TriPlus - AS, της εταιρείας ThermoScientific. Το λογισμικό για συλλογή και επεξεργασία δεδομένων είναι το Xcalibur (version 2.07). Ο διαχωρισμός των ενώσεων γίνεται σε στήλη τριχοειδή DB-5MS, εσωτερικής διαμέτρου 0,25 mm, μήκους 30 m και πάχος υμενίου 0,25µm.. Ο ιοντισμός γίνεται με Electron Ionization, EI, (electron energy 70 eV) και παρακολουθείται το φάσμα προϊόντων ιόντων επιλεγμένου μητρικού ιόντος για κάθε ένωση.

Πορεία Επικύρωσης:

Η ακρίβεια (ορθότητα και πιστότητα) μελετήθηκε με δοκιμές ανάκτησης σε δείγματα χωρίς κατάλοιπα, εμβολιασμένα με πρότυπο διάλυμα φυτοφαρμάκων (είτε μίγμα 150 ενώσεων για την πολύ-υπολειμματική μέθοδο με την τεχνική LC-MS/MS, είτε μίγμα 80 ενώσεων για την πολυ-υπολειμματική μέθοδο με την τεχνική GC-MS/MS) σε περιοχή συγκεντρώσεων , 0,010 - 0,050 mg/ kg ενώ τα επίπεδα επικύρωσης στην περίπτωση των νερών κυμαίνονται στην περιοχή τιμών 0,01-0,1µg/L. Πραγματοποιήθηκαν έξι με οχτώ επαναλήψεις σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης για κάθε διαφορετικό υπόστρωμα, σε διαφορετικές ημέρες εργασίας σύμφωνα με τις απαιτήσεις της SANCO 12495/2011 [3].

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μέθοδοι ανάλυσης :

Οι φασματομετρικές παράμετροι όπως ενέργεια θραυσματοποίησης, πίεσης και άλλες, που εξαρτώνται από την αναλυτική τεχνική βελτιστοποιήθηκαν για κάθε ουσία κυρίως με

πειράματα έγχυσης μονήρων διαλυμάτων των πρότυπων ενώσεων. Στην περίπτωση της τεχνικής LC ESI -MS/ MS το μοριακό ιόν $[M+H]^+ / [M-H]^-$ των ενώσεων επιλέγεται συνήθως σαν πρόδρομο ιόν ενώ η ανίχνευση γίνεται με παρακολούθηση επιλεγμένων αντιδράσεων μετάπτωσης του , των πιο ισχυρών και χαρακτηριστικών για κάθε ουσία σύμφωνα με το φάσμα προϊόντων ιόντων της. Οι αντίστοιχες φασματομετρικές παράμετροι της τεχνικής GC-MSⁿ βελτιστοποιούνται ομοίως, για κάθε χημική ένωση μελετώντας αρχικά το πλήρες φάσμα της. Επιλέγεται ένα από τα πιο ισχυρά ιόντα με τις λιγότερες δυνατές παρεμποδίσεις και μελετάται το φάσμα των προϊόντων του.

Επικύρωση:

Η ακρίβεια των πολύ-υπολειμματικών μεθόδων μελετήθηκε με πειράματα ανάκτησης στην περιοχή συγκεντρώσεων 0.010-0.050 mg/kg δείγματος. Η ορθότητα (τιμές ανάκτησης στα δύο επίπεδα συγκέντρωσης μεταξύ 70 και 120%) και η πιστότητα της μεθόδου (σχετικές τυπικές αποκλίσεις σε συνθήκες ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας μικρότερες του 20%) κρίνονται ικανοποιητικές σύμφωνα με τα κριτήρια επίδοσης της SANCO 12495/2011 [3], για τους 2500 περίπου συνδυασμούς φυτο-προστατευτικής ουσίας-υποστρώματος του πεδίου του εργαστηρίου. Βάσει των δοκιμών αυτών, όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου ορίστηκε η συγκέντρωση των 0.010 mg/kg για τους περισσότερους από τους επικυρωμένους συνδυασμούς ενώ τα όρια ανίχνευσης κυμαίνονται σε χαμηλότερα επίπεδα συγκεντρώσεων. Σε ειδικές περιπτώσεις συνδυασμών φυτο-προστατευτικής ουσίας-υποστρώματος, όπου απαιτείται βάσει της σχετικής νομοθεσίας όπως στην Οδηγία 2006/125/EC για τις βρεφικές και παιδικές τροφές, έγινε επικύρωση σε χαμηλότερα επίπεδα συγκεντρώσεων της περιοχής τιμών 0.002-0.008 mg/kg [5]. Καθώς το Εργαστήριο είναι διαπιστευμένο σε «ευέλικτο» πεδίο (European Co-operation for Accreditation (EA) , EA-2/05 (2001), EA -2/15 (2008)) οι επιτυχώς επικυρωμένοι συνδυασμοί είναι αυτόματα και διαπιστευμένοι οπότε συμπεριλαμβάνονται άμεσα στις εκθέσεις ανάλυσης του εργαστηρίου. Η δυνατότητα αυτή διευρύνει σημαντικά το πεδίο και τις δυνατότητες του εργαστηρίου συμβάλλοντας σημαντικά στον έλεγχο της ασφάλειας και της ποιότητας των τροφίμων ως προς τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων όπου το ζητούμενο είναι ο έλεγχος των τροφίμων ως προς το δυνατό περισσότερες παραμέτρους-φυτοπροστατευτικές ενώσεις- για την προστασία της υγείας του καταναλωτή.

Καθώς το Εργαστήριο είναι διαπιστευμένο σύμφωνα με το πρότυπο EN ISO/IEC 17025:2005 τηρεί σύστημα εσωτερικού και εξωτερικού ελέγχου ποιότητας .Οι σχετικές επιδόσεις των μεθόδων στα διεργαστηριακά σχήματα ελέγχου ικανότητας (εξωτερικός έλεγχος ποιότητας) της ίδιας χρονικής περιόδου (EU-PTs, FAPAS,COI) μπορούν να χαρακτηριστούν λίαν ικανοποιητικές καθώς η πλειονότητα των z-scores ήταν στην αποδεκτή περιοχή τιμών (|0-2|).

Το Εργαστήριο συμμετείχε σε διεργαστηριακά σχήματα όπου έχει αξιολογηθεί ως προς παραμέτρους-φυτοπροστατευτικές ενώσεις με υψηλό ποσοστό επιτυχίας. Κατά την μελέτη της αβεβαιότητας των μεθόδων για το χρονικό διάστημα που εφαρμόζονται στο εργαστήριο προκύπτει ότι η συνολική επίδοση αυτών των μεθόδων οδηγεί σε εκτεταμένη αβεβαιότητα (σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%) χαμηλότερη/ίση του 50% όπως ορίζεται από τη σχετική κοινοτική κατευθυντήρια οδηγία SANCO 12495/2011 [3].

Οι μέθοδοι εφαρμόστηκαν στη μελέτη δειγμάτων του εργαστηρίου, μεταποιημένων φρούτων και λαχανικών και προϊόντων αυτών, παιδικών τροφών, δημητριακών και προϊόντων αυτών, ελαιολάδων, χυμών, κρασιών, δειγμάτων νερών διαφόρων κατηγοριών.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι πολυ-υπολειμματικές μέθοδοι με τεχνικές LC-MS/MS, GC-MS/MS που αναπτύχθηκαν είναι αρκετά ακριβείς και ευαίσθητες για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των υπολειμμάτων διακοσίων φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων σε τρόφιμα και νερά. Οι επικυρωμένοι συνδυασμοί του πεδίου του εργαστηρίου ανέρχονται στους 2500. Η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων των πολύ-υπολειμματικών μεθόδων αποδεικνύεται μέσω των επιτυχών συμμετοχών στα σχετικά διεργαστηριακά σχήματα (EU-PTs, SCHEMA, COI-PTs). Οι μέθοδοι εφαρμόστηκαν στη μελέτη δειγμάτων μεταποιημένων φρούτων και λαχανικών και προϊόντων αυτών, παιδικών τροφών, δημητριακών και προϊόντων αυτών, ελαιολάδων, χυμών, κρασιών, νερών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.

- (1) http://www.europa.eu.int/comm/food/plant/protection/pesticides/index_en.htm
- (2) Botitsi H.V., Garbis ., S.D., Economou A., Tsiipi 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) “Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed” Document No SANCO 12495/2011.
- (4) Commission Directive 2006/125/EC of 5 December 2006 on processed cereal-based foods and baby foods for infants and young children. Off. J. Eur. Union L339:16-35.
- (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)