ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ LC-Q-TOF-MS ΓΙΑ ΤΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΦΡΟΥΤΑ ΚΑΙ ΛΑΧΑΝΙΚΑ.

Καϊδατζής Ιωάννης [1], Σιανδροπούλου Βασιλική [1], Claes Dorith [2]
[1]Agrolab-rds, Εργαστηριακές και Συμβουλευτικές Υπηρεσίες , Σίνδος Θεσ/νικη
[2] Bruker Daltonik GmbH , Bremen , Application (ESI-TOF)
kaidatzis@agrolab-rds.gr

Περίληψη

Η χρήση της τεχνικής υψηλής διακριτικής ικανότητας φασματομετρίας μάζας LC-Q-TOF-MS αποτελεί ένα νέο ισχυρό εργαλείο για τον ταχύτερο και πληρέστερο έλεγχο της ασφάλειας των τροφίμων, ως προς τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων σε φρούτα και λαχανικά. Το κυρίως πλεονέκτημα της τεχνικής είναι η πλήρη φασματική συλλογή δεδομένων με υψηλή διαχωριστική ικανότητα, υψηλή ακρίβεια μάζας, υψηλή ευαισθησία και υψηλή ταχύτητα. Πλεονέκτημα της τεχνική θεωρείται και το γεγονός ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για στοχευόμενη και μη στοχευόμενη ανάλυση.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται μια πολύ-υπολειμματική μέθοδος προσδιορισμού φυτοφάρμακων βασισμένη στη μέθοδο QuEChERS για την προετοιμασία των δειγμάτων και στην ενόργανη τεχνική της υψηλής διαχωριστικής ικανότητας φασματομετρίας μάζας LC-Q-TOF-MS για την ποσοτικοποίηση-ταυτοποίηση των αποτελεσμάτων. Όσον αφορά την στοχευόμενη ανάλυση για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων η μέθοδος έχει επικυρωθεί για περίπου 550 φυτοφάρμακα σύμφωνα με τις απαιτήσεις της SANTE 11945/2015 και πληρεί όλες τις απαιτούμενες προδιαγραφές. Για την ταυτοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται ο χρόνος κατακράτησης, η πρόδρομος ακριβή μάζα, η ισοτοπική μορφή και μέχρι 3 μεταπτώσεις με κατάλληλη αναλογία μεταξύ τους.

Για την μη στοχευόμενη ανάλυση επειδή γίνεται πλήρη συλλογή των φασματικών δεδομένων του δείγματος ο αριθμός των φυτοφαρμάκων που μπορούν τα ταυτοποιηθούν σε μεταγενέστερο χρόνο αυξάνει σε σημαντικό βαθμό.

Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αναλύσεις ρουτίνας για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων, διότι είναι σύντομη, αξιόπιστη, φτηνή και ευαίσθητη

Λέξεις-Κλείδια : Φυτοφάρμακα, LC-Q-TOF-MS, Υπολείμματα, Φρούτα-Λαχανικά

Abstract

The use of the technique of high-resolution mass spectrometry LC-Q-TOF-MS is a new powerful tool for faster and more complete control of food safety, for pesticide residues in fruits and vegetables. The main advantage of the technique is the full spectral data collection with high resolution ability, high mass accuracy, high sensitivity and high speed. An advantage of the technique is considered that can be used for targeted and un-targeted analysis.

This paper presents a multi-residual Pesticides assay based method QuEChERS for sample preparation and instrumental technique of high-resolution mass spectrometry LC-Q-TOF-

MS to quantify - indentify results. Regarding the target analysis for the quantification of results the method has been validated for 550 pesticides in accordance with the requirements of SANTE 11945/2015 and complete all the required specifications. For identification of the results by the retention time is used, the precursor exact mass, isotopic pattern and up to 3 transitions with a suitable ratio.

For un-targeted analysis because it is a complete collection of the spectral data of the sample number of the pesticides may be identified at a later time increases considerably. The method is for use in routine analyzes for the determination of pesticide residues, it is quick, reliable, cheap and sensitive

Keywords: Pesticides, LC-Q-TOF-MS, Rest, Fruit-Vegetables

1. Εισαγωγή

Οι συνεχώς αυξανόμενες απαιτήσεις για καλύτερη ποιότητα τροφίμων σε συνδυασμό με την ευρεία κατανάλωση φυτοπροστατευτικών προϊόντων έχει κάνει επιτακτική την ανάγκη για χρήση νέων τεχνικών ενόργανης ανάλυσης, με απώτερο στόχο την ταχύτερη ανάλυση των προϊόντων, την αύξηση του αριθμού των φυτοφαρμάκων προς ανάλυση και την αύξηση της αξιοπιστίας της ανάλυσης. Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει πλέον θέσει σαν μια από τις προτεραιότητες της, την ασφάλεια των τροφίμων, με αποτέλεσμα οι απαιτήσεις να αυξάνονται όλο και περισσότερο. Αυτό σε συνδυασμό με τις αυξανόμενες απαιτήσεις των μεγάλων Ευρωπαϊκών αλυσίδων σούπερ μάρκετ (που αποτελούν τον κύριο καταναλωτή των Ελληνικών αγροτικών προϊόντων) για την ασφάλεια των τροφίμων και την γρηγορότερη ανταπόκριση στις απαιτήσεις τους, έχει κάνει πλέον αναγκαία την χρήση νέων τεχνικών στις αναλύσεις τροφίμων. Απαραίτητη προϋπόθεση για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων αποτελεί και η διαπίστευση της μεθόδου ανάλυσης. Μια από τις νέες τεχνικές που αρχίζει να χρησιμοποιείται όλο και πιο ευρέως είναι η τεχνική της υψηλής διακριτικής ικανότητας φασματομετρίας μάζας LC Q-TOF MS.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται μια επικυρωμένη πολυδύναμη μέθοδος ανάλυσης υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα και λαχανικά με τη χρήση της τεχνικής LC Q-TOF MS. Το κύριο πλεονέκτημα της τεχνικής που χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση-ταυτοποίηση των αποτελεσμάτων είναι ότι δεν έχουμε απομόνωση ιόντων στο πρώτο τετράπολο MS, με αποτέλεσμα ο αριθμός των φυτοφαρμάκων-ουσιών που μπορεί να ανιχνευτεί σε ένα δείγμα να είναι πολύ μεγάλος. Επίσης, γίνεται πλήρη φασματική καταγραφή των δεδομένων του δείγματος και τα δεδομένα αυτά μπορούν να αξιολογηθούν σε μεταγενέστερο χρόνο, χωρίς να απαιτείται η επανάληψη της ανάλυσης του δείγματος. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση των φυτοφαρμάκων από τα δείγματα είναι η QuEChERS και η επικύρωση της μεθόδου έγινε με βάση τις προδιαγραφές της SANTE /11945/2015 και πληρεί τις απαιτήσεις του προτύπου EN ISO/IEC 17025:2015.

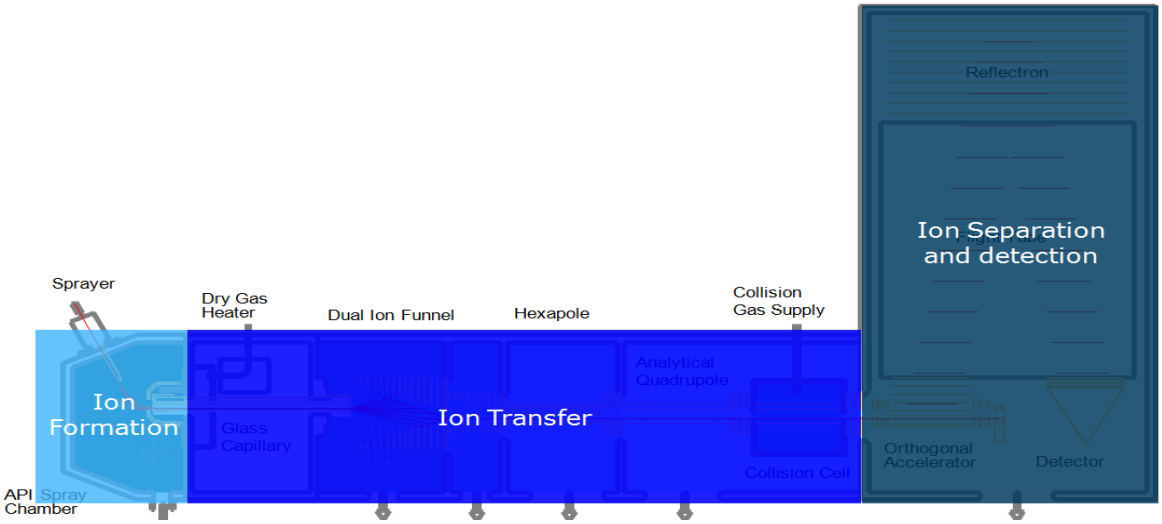
2. Μεθοδολογία

2.1 Βασικές αρχές λειτουργίας της ενόργανης τεχνικής LC-Q-TOF-MS

Η τεχνική Q-TOF-MS μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για στοχευόμενη όσο και για μη στοχευόμενη ανάλυση με εξίσου αξιόπιστα αποτελέσματα. Στο συγκεκριμένο όργανο του οίκου Bruker που διαθέτει το εργαστήριο μας μπορούν να προσαρμοστούν πολλές διαφορετικές πηγές, ανάλογα με τις ουσίες που θέλουμε να προσδιορίσουμε. Η πηγή που διαθέτουμε εμείς είναι **ESI source**. Κάποιες από τις τεχνικές MSMS-mode είναι:

- **MRM :** Στοχευόμενη ανάλυση – ποσοτικοποίηση
- **Auto MSMS :** Μη στοχευόμενη ανάλυση – έλεγχος δομής
- **bbCID :** Μη στοχευόμενη ανάλυση/MSMS

Παρακάτω δίνεται σχηματική απεικόνιση των τμημάτων από τα οποία αποτελείται το Q-TOF-MS, όπου έχουμε την πηγή που γίνεται ο σχηματισμός των ιόντων, το τμήμα που μεταφέρονται τα ιόντα και το τμήμα που είναι ο πύργο πτήσης όπου γίνεται ο διαχωρισμός και η ανίχνευση των ιόντων :

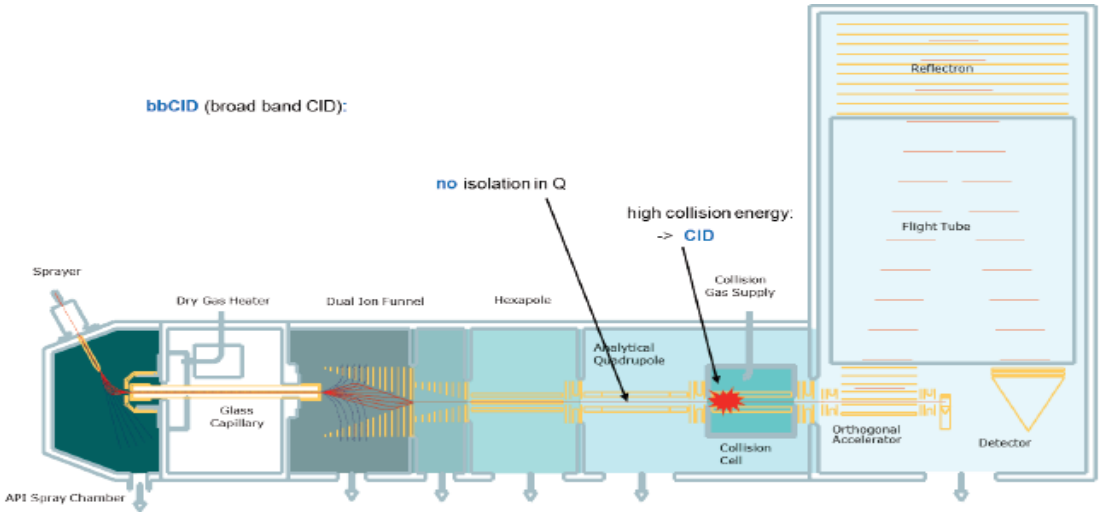


Σχήμα 1 : Σχηματική απεικόνιση Q-TOF MS

Το εργαστήριο μας χρησιμοποίησε την τεχνική **bbCID Untargeted/MSMS** για την επικύρωση της μεθόδου και την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Σε αυτή τη λειτουργία, το σύστημα εναλλάσσεται τακτικά μεταξύ δύο συνόλων παραμέτρων. Το πρώτο σύνολο παραμέτρων είναι η τυπική ρύθμιση πλήρους σάρωσης (full scan mode), ενώ το δεύτερο σύνολο παραμέτρων θα θέσει το όργανο σε μια μη ειδική λειτουργία MSMS, όπου όλα τα ιόντα θα θραυσματοποιούνται ταυτόχρονα χωρίς προηγούμενη απομόνωση, δηλαδή δεν έχουμε καμία απομόνωση ιόντων στο πρώτο τετράπολο. Αποτελεί ένα συνδυασμό στοχευόμενης και μη στοχευόμενης ανάλυσης.

Παρακάτω δίνεται η σχηματική απεικόνιση της τεχνικής **bbCID mode** (broad band):



Σχήμα 2 : Σχηματική απεικόνιση τεχνικής bbCID mode

Η λειτουργία **bbCID mode** αποτελεί μια ισχυρή επιλογή για την ποσοτικοποίηση-ταυτοποίηση των αποτελεσμάτων. Όταν μια ανάλυση πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας **bbCID mode,** τότε το σύστημα θα αποκτάει εναλλάξ ένα φάσμα πλήρους σάρωσης (full scan) ως συνήθως, συν ένα φάσμα, όπου το σύστημα εφαρμόζει ενέργεια στο κελί σύγκρουση, αλλά χωρίς να έχουμε προηγούμενη απομόνωση στο τετράπολο. Κατά συνέπεια, όλα τα ιόντα που περνούν στο κελί σύγκρουση (collision cell) θραυσματοποιούνται ταυτόχρονα, έτσι ώστε ένα "μικτό" φάσμα MSMS δημιουργείται. Στο φάσμα **bbCID** μπορεί στη συνέχεια να γίνεται έλεγχος για την παρουσία του πρόδρομου ιόντος και των μεταπτώσεων αυτού για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος.
Το πλεονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι ότι τα δεδομένα θραυσματοποίησης μπορεί να αποκτηθούν χωρίς την ανάγκη να γνωρίζουν πια ιόντα είναι πράγματι παρόντα στο φάσμα πλήρους σάρωσης. Ο ίδιος αριθμός σημείων κατά μήκος μιας κορυφής λαμβάνεται με διπλασιασμό του ρυθμού απόκτησης αυτών, σε σχέση με την ενέργεια που απαιτείται για το φάσμα πλήρους σάρωσης και έτσι ενώ σε full scan mode είναι 1Hz, σε bbCID mode είναι 2Hz. Λόγω του τρόπου αυτού λειτουργίας της τεχνικής bbCID mode, το σχήμα της κορυφής μιας ένωσης δεν τείθετε σε κίνδυνο, με αποτέλεσμα τα δεδομένα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τους σκοπούς της ποσοτικοποίησης.

Η βαθμονόμηση του MS συστήματος γίνεται με ταυτόχρονη έγχυση στην αρχή κάθε ανάλυσης ενός κατάλληλου διαλύματος βαθμονόμησης μαζί με το δείγμα προς ανάλυση και αυτό επαναλαμβάνεται με κάθε δείγμα.

2.2 Σκοπός – Πεδίο Εφαρμογής

Σκοπός της μεθόδου είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα και λαχανικά με την χρήση της τεχνικής υγρής χρωματογραφίας και υψηλής διακριτικής ικανότητας φασματογραφίας μάζας Q-TOF-MS.

Η μέθοδος έχει επικυρωθεί για 550 φυτοφάρμακα σε φρούτα και λαχανικά σύμφωνα με το πρότυπο EN ISO/IEC 17025:2005 και το Guidance document on analytical

quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed SANTE/11945/2015.

2.3 Υλικά – Εξοπλισμός

Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε για την ενόργανη ανάλυση είναι:

Υγρός χρωματογράφος : UHPLC Ultimate 3000 Thermo

Φασματογράφος μάζας : High Resolution Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry, ESI mode, Bruker Daltonics, Compact

Χρωματογραφική στήλη : Acclaim RSLC 120 C18 2.2μm 120A 2.1x100mm
Προστήλη : Acquity UPLC BEH C18 1.7μm 2.1x5mm

Οι πρότυπες ουσίες φυτοφαρμάκων που χρησιμοποιούνται είναι όλες πιστοποιημένες.

Τα αντιδραστήρια είναι υψηλής καθαρότητας LC-MS και Pestanal grade, όπου απαιτείται.

Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός.

2.4 Διαδικασία ανάλυσης

2.4.1 Προετοιμασία δείγματος

Η προετοιμασία των δειγμάτων και τα τμήματα του δείγματος που θα πρέπει να αναλυθούν έγινε με βάση τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 396/2005 Παράρτημα 1

2.4.2 Εκχύλιση

Η μέθοδος βασίζεται στην εκχύλιση του δείγματος με διάλυμα 1% οξικού οξέως σε ακετονιτρίλιο . Στο δείγμα προστίθεται άνυδρο θειϊκό μαγνήσιο και άνυδρο οξικό νάτριο. Ακολουθεί ανακίνηση του δείγματος και φυγοκέτρηση. Παραλαβή μίας ποσότητας από το υπερκείμενο προσθήκη PSA, ανακίνηση του δείγματος, φυγοκέτρηση και παραλαβή του υπερκείμενου για την ενόργανη ανάλυση.

Ζυγίζονται 15.00 ± 0.05g ομογενοποιημένου δείγματος σε φυγοκεντρικό σωλήνα των 50ml (FEP). Προστίθενται 15ml 1% οξικού οξέος σε ακετονιτρίλιο (v/v). Το δείγμα ανακινείται πάρα πολύ καλά για 15 λεπτά σε δονούμενη τράπεζα. Ο ζυγός ζύγισης των αντιδραστηρίων είναι σε κάθε περίπτωση διαφορετικός από τον ζυγό ζύγισης των προτύπων ουσιών αναφοράς και αυτό καθορίζεται από τον προϊστάμενο του εργαστηρίου. Προστίθενται 6g άνυδρου θειϊκού μαγνησίου και 1.5g άνυδρου οξικού νατρίου (κατά την προσθήκη προσέχουμε έτσι ώστε να μην δημιουργούνται σβώλοι ή συσσωματώματα). Πωματίζετε ο σωλήνας και το δείγμα ανακινείται πάρα πολύ καλά σε δονούμενη τράπεζα για 15 λεπτά. Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 5000 στροφές για 5 λεπτά. Παραλαμβάνονται 5ml από το υπερκείμενο και τοποθετούνται σε φυγοκεντρικό σωλήνα των 15ml, στον οποίο προστίθενται 250mg PSA (50mg/ml) και 750mg άνυδρου θειϊκού μαγνησίου (150mg/ml). Πωματίζετε ο σωλήνας και το δείγμα ανακινείται πάρα πολύ καλά σε δονούμενη τράπεζα για 15 λεπτά. Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 5000 στροφές

για 5 λεπτά. Μεταφέρεται 1ml από το υπερκείμενο υγρό του δείγματος σε κατάλληλο φιαλίδιο για την ενόργανη ανάλυση.

2.4.3 Ανάλυση LC-Q-TOF-MS

Στήλη : Acclaim RSLC 120 C18 2.2μm 120A 2.1x100mm
Προστήλη : Acquity UPLC BEH C18 1.7μm 2.1x5mm
Θερμοκρασία στήλης : 30 ^{0}C
Θερμοκρασία δείγματος : 5 ^{0}C

Κινητές φάσεις για βαθμιδωτό πρόγραμμα:

Θετικός ιονισμός
A : Νερό/Μεθανόλη 90/10 με 5mM μυρμηκικό αμμώνιο και 0.01% μυρμηκικό οξύ
B : Μεθανόλη με 5mM μυρμηκικό αμμώνιο και 0.01% μυρμηκικό οξύ

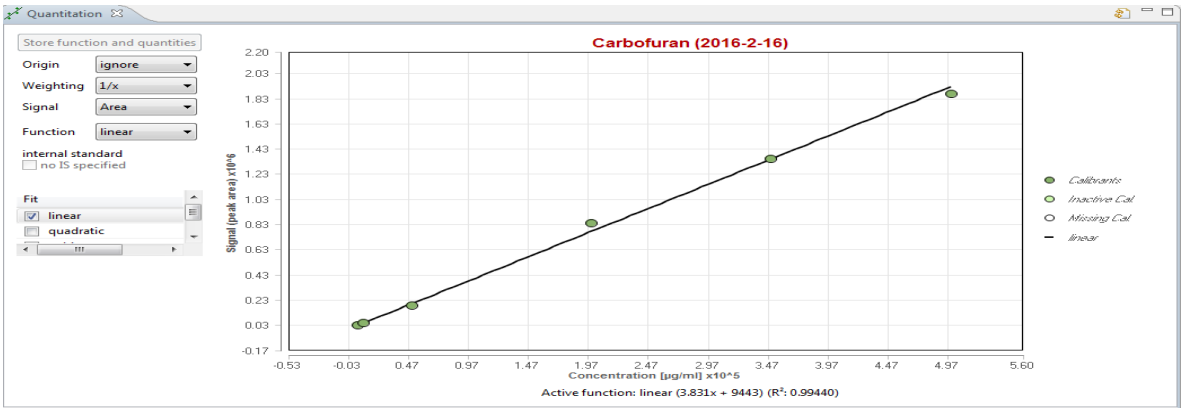
Αρνητικός Ιονισμός
C : Νερό/Μεθανόλη 90/10 με 5mM οξικό αμμώνιο
D : Μεθανόλη με 5mM οξικό αμμώνιο

Ροή : Βαθμιδωτή ροή από 5% - 99,9% σε 15λεπτά (κύκλος 20λεπτά)

Λογισμικό : Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό TASQ 1.0

2.4.4 Καμπύλη βαθμονόμησης

Παρασκευάζεται καμπύλη βαθμονόμησης έξι σημείων με το χαμηλότερο της καμπύλης να είναι το όριο αναφοράς της μεθόδου. Η καμπύλη βαθμονόμησης δεν αναγκάζεται να περάσει από την αρχή των αξόνων. Σε γενικές γραμμές, συνιστάται η χρήση της σταθμισμένης γραμμικής παλινδρόμησης (1/x). Η καμπύλη βαθμονόμησης παρασκευάζεται σε κατάλληλο διαλύτη. Κατά την επικύρωση της μεθόδου έχει γίνει αξιολόγηση της επίδρασης του υποστρώματος στην καμπύλη βαθμονόμησης και έχει βρεθεί ότι δεν επηρεάζεται από το υπόστρωμα.



Σχήμα 3 : Ενδεικτική καμπύλη βαθμονόμησης

2.4.5 Ταυτοποίηση αποτελεσμάτων

Για ταυτοποίηση των αποτελεσμάτων βασιζόμαστε σε τέσσερεις διαφορετικές παραμέτρους :

- Ακρίβεια μάζας , ≤ 5ppm
- Ισοτοπική μορφή (Isotopic Pattern)
- Θραυσματοποιημένα ιόντα, υπάρξει τουλάχιστον 2, με αναλογία ιόντων ±30%
- Χρόνος κατακράτησης, με όριο ± 0,1λεπτό

Οι προδιαγραφές για όλες αυτές τις παραμέτρους έχουν τεθεί και παρακολουθούνται από το λογισμικό και σε περίπτωση εκτροπών υπάρχουν οι κατάλληλες ενημερώσεις ότι δεν τηρούνται οι προδιαγραφές (flags).

2.5 Επικύρωση μεθόδου

2.5.1 Διαδικασία επικύρωσης μεθόδου

Η διαδικασία επικύρωσης της μεθόδου είναι η ακόλουθη:

Έχει γίνει η επικύρωση όλων των αναλυτών της μεθόδου περίπου 550 σε πέντε διαφορετικά αντιπροσωπευτικά υποστρώματα φρούτων και λαχανικών.

Πειραματικά έχουν γίνει τα ακόλουθα:

Λευκό αντιδραστήριο
1 δείγμα μάρτυρας (δείγμα καθαρό από φυτοφάρμακα)
6 εμβολιασμένα δείγματα στο όριο αναφοράς της μεθόδου 0,010 mg/kg
6 εμβολιασμένα δείγματα σε όριο x5 αναφοράς της μεθόδους 0,050 mg/kg

Τα εμβολιασμένα δείγματα είναι υποδείγματα από ένα αρχικά εμβολιασμένο δείγμα και οι αναλύσεις έγιναν σε διαφορετικές ημέρες.

2.5.2 Στοιχεία επικύρωσης μεθόδου

Τα κριτήρια αποδοχής της απόδοσης της μεθόδου παρουσιάζονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1 : Κριτήρια και παράμετροι επίδοσης επικύρωσης

Παράμετρος	Διαδικασία	Κριτήριο
Ευαισθησία / Γραμμικότητα	Καμπύλη βαθμονόμησης 6 σημείων	Residuals < ±20%
Επίδραση Υποστρώματος	Σύγκριση της απόκρισης (εμβαδόν) των προτύπων σε διαλύτη και σε υπόστρωμα	(±20 %)

Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ)	Χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού που ικανοποιεί τα κριτήρια της μεθόδου για ορθότητα και πιστότητα	≤ MRL (ανώτατο όριο καταλοίπων)
Ορθότητα (bias)	Μέσος όρος ανακτήσεων από τα εμβολιασμένα δείγματα	70-120%
Πιστότητα (RSD_r)	Επαναληψημότητα RSD_r από τα εμβολιασμένα δείγματα	≤ 20%

- **<u>Γραμμικότητα</u>**

  Η γραμμικότητα του οργάνου εξετάζεται με την ανάλυση έξι προτύπων διαλυμάτων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε κατάλληλο διαλύτη. Γίνεται ανάλυση των αποτελεσμάτων και υπολογίζονται η κλίση, το σημείο τομής και ο παράγων R^2 για κάθε δραστική. Για το σύνολο των ουσιών ισχύει ότι $R^2 \geq 0.99$. Τιμές του $R^2 \geq 0.95$ είναι αποδεκτές, καθ' ότι σε κάθε περίπτωση ανάλυσης η συγκέντρωση δείγματος και προτύπων φέρονται στο ίδιο περίπου επίπεδο. Κάθε ξεχωριστό σημείο της καμπύλης δεν θα πρέπει να αποκλίνει περισσότερο από ± 20% από την καμπύλη αναφοράς.

- **<u>Όριο ποσοτικού προσδιορισμού</u>**

  Από τα πειραματικά δεδομένα έχει βρεθεί ότι το όριο ποσοτικού προσδιορισμού της μεθόδου για το σύνολο των ουσιών είναι το 0,010 mg/kg

- **<u>Ορθότητα</u>**

  Η ορθότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με πειράματα ανακτήσεων σε δύο διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων 0,010 και 0,050 mg/kg. Από τον υπολογισμό των ανακτήσεων βρέθηκε ότι για το σύνολο των ουσιών, στα διάφορα υποστρώματα και στα δύο επίπεδα συγκέντρωσης οι τιμές των ανακτήσεων είναι μέσα στα αποδεκτά όρια 70-120%.

- **<u>Πιστότητα</u>**

  Η πιστότητα μεθόδου υπολογίζεται από τα εμβολιασμένα δείγματα, όπου βρέθηκε ότι οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις σε συνθήκες ενδο-εργαστηριακής επαναληψιμότητας είναι μικρότερες του 20%

- **<u>Υπολογισμός Αβεβαιότητας</u>**

  Για υπολογισμός της αβεβαιότητας ακολουθήθηκε ο οδηγός :
  EURACHEM / CITAC Guide CG 4
  Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Third Edition, QUAM:2012.

  Για τον υπολογισμό της συνολικής αβεβαιότητας της μεθόδου μελετήθηκε η αβεβαιότητα τύπου Α και τύπου Β και βρέθηκε ότι η συνολική αβεβαιότητα για το σύνολο των ουσιών είναι μικρότερη από το 50%, όπως ορίζεται από την κατευθυντήρια οδηγία SANTE 11495/2015.

  <u>Τύπου Α</u>

  Υπολογίζεται ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση και η σχετική τυπική απόκλιση των ανακτήσεων.
  Η συνεισφορά της επαναληψιμότητας στην αβεβαιότητα δίδεται από τον τύπο :

$$RSD = u_{rep} = S_{rep} / R_{av} \quad (1)$$

όπου,
R_{av} (ή x) ο μέσος όρος των ανακτήσεων και
S_{rep} (ή S) η ανάλογη τυπική απόκλιση.

Η συνεισφορά στην αβεβαιότητα από το bias δίδεται από τον τύπο:

$$u_b = S_b / \sqrt{n} \quad (2)$$

όπου:
S_b (ή S) είναι η τυπική απόκλιση των σχετικών αποκλίσεων κάθε μέτρησης της ανάκτησης από την "αληθή" τιμή του 100%
n ο αριθμός των επαναλήψεων.

Η **συνδυασμένη σχετική αβεβαιότητα** δίνεται από τον τύπο:

$$u_C = \sqrt{[u^2_{rep} + (u_b/\mu)^2]} \quad (3)$$

Όπου μ η αληθής τιμή που για την περίπτωση των ανακτήσεων είναι το 100.

Η **διευρυμένη σχετική αβεβαιότητα** για επίπεδο εμπιστοσύνης 95% υπολογίζεται από τον τύπο:

$$u = 2 * u_C \quad (4)$$

Οπότε για συγκέντρωση C ουσίας **η ποσοστιαία διευρυμένη αβεβαιότητα** δίνεται από τον τύπο:

$$CV\% = (u/C)*100 \quad (5)$$

<u>Τύπου Β</u>

Οι αβεβαιότητες τύπου Β που μελετήθηκαν είναι :

- Αβεβαιότητα της καθαρότητας του αντιδραστηρίου
- Αβεβαιότητα της μέτρησης όγκου
- Αβεβαιότητα της μέτρησης μάζας

Από την μελέτη των αβεβαιοτήτων τύπου Β βρέθηκε ότι η συνεισφορά τους στην συνολική αβεβαιότητα είναι αμελητέα και άρα δεν λαμβάνονται υπόψη κατά των υπολογισμό της συνολικής αβεβαιότητας της μεθόδου.

3 Συμπεράσματα

Η χρήση της τεχνικής υψηλής διακριτικής ικανότητας φασματομετρίας μάζας LC-Q-TOF-MS αποτελεί ένα νέο ισχυρό και αξιόπιστο εργαλείο για τον έλεγχο ύπαρξης υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα και λαχανικά. Η μέθοδος μπορεί για χρησιμοποιηθεί σε αναλύσεις ρουτίνας, διότι είναι σύντομη, αξιόπιστη, φτηνή και ευαίσθητη.

4 Βιβλιογραφία

1. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables.
   Lehotay ET AL. : Journal of AOAC International Vol. 88, No. 2, 2005
2. EURACHEM / CITAC Guide CG 4
   Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Third Edition, QUAM:2012.
3. Guidance document on analytical quality control and method validation
   procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11945/2015